T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

FRAGİLE X SENDROMLU HASTALARDA *FMR1* GENİNDEKİ 3'LÜ TEKRAR ARTIŞ SAYI MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Yasin ADA

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2014
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

FRAGİLE X SENDROMLU HASTALARDA *FMR1* GENİNDEKİ 3'LÜ TEKRAR ARTIŞ SAYI MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Yasin ADA

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-12-3886 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Temmuz 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Yasin ADA

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK

"**Frajil X Sendromlu Hastalarda *FMR1* Genindeki 3'lü Tekrar Artış Sayı Mutasyonların Belirlenmesi**" adlı **Yüksek Lisans** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Yasin ADA

Danışman
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

KABUL ONAY

Prof. Dr. Munis DÜNDAR danışmanlığında **Yasin ADA** tarafından hazırlanan **"Frajil X Sendromlu Hastalarda *FMR1* Genindeki 3'lü Tekrar Artış Sayı Mutasyonların Belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

16/07/2014

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Munis DÜNDAR (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Çetin SAATÇI (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Hakan GÜMÜŞ (Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nöroloji Bilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 24.07.2014 tarih ve 633 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

24.../07.../2014

Prof. Dr. Sabit ÖZDAMAR

Y. Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin meydana gelişinde yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladığım ilk günden beri eğitimime katkı sağlayan hocalarım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a ve Doç. Dr. Çetin SAATÇİ'ye,

Tez çalışmalarım sırasında değerli bilgileri ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Yagut AKBAROVA'ya

Hasta seçimindeki yardımlarından dolayı başta DR. Rüksan BÜYÜKOĞLAN'a her konu da yardımlarını esirgemeyen DR. Oğuzhan BAHADIR'a, DR. Muhammed Ensar DOĞAN'a ve tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Asistanlarına,

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ekibine,

Çalışmalarda yardımını esirgemeyen sayın Tanju BASMACI ve değerli ekibine,

İkinci ailem olan Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ailesine...

Ve bu süreçte bana destek olan herkese ayrı ayrı teşekkür ederim.

Bugüne kadar ve bundan sonrada yanımda olacak olan sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, bu aşamada kahrımı çeken anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim...

Yasin ADA
Kayseri, Temmuz 2014

FRAJİL X SENDROMLU HASTALARDA *FMR1* GENİNDEKİ 3'LÜ TEKRAR ARTIŞ SAYI MUTASYONLARIN BELİRLENMESİ

YASİN ADA
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2014
Danışman: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

ÖZET

Frajil X Sendromu (FXS) (OMIM 300624); mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır. Toplumda ki sıklığı erkeklerde yaklaşık 4000'de 1 ve kadınlarda yaklaşık 8000'de 1 olduğu bilinmektedir. Hastalığın %98-99'u X kromozomu üzerinde yer alan Frajil X Mental Retardasyon 1 (*FMR1*) genin 5' ucunda translate olmayan bölgesindeki (UTR) CGG (sitozin, guanin, guanin) tekrarının genişlemesinin ve anormal metillenmesinin nedenidir. %1-2'si ise gendeki delesyonlar ve nokta mutasyonları oluşturur.

FXS'nda klinik bulgular mental retardasyon, belirgin kulaklar, uzun ince bir yüz, davranış bozuklukları, pubertal dönemden itibaren makroorşitizm ile karakterizedir.

FXS'dan sorumlu gen Xq27.3'e lokalize edilmiş *FMR1* adı verilen 38 kb büyüklüğünde ve 17 ekzon içeren bir gendir. Gen, *5'* ucunda CpG metilasyon bölgesi ve birinci ekzon'un translate olmayan kısmında CGG üçlü tekrarları içerir. Yaklaşık 4.4 kb büyüklüğündeki mRNA 70 kDa'luk bir protein sentezler. *FMR1* proteini (*FMRP*) çeşitli dokularda ifade edilen ve nöronal ve zihinsel gelişimi için gerekli, mRNA bağlayıcı bir proteindir.

CGG tekrar uzunlukları ~5 - ~44 arasında olan bireyler normaldir yani etkilenmemişlerdir, ~45 - ~54 arasındaki tekrarlar "gri bölge" denir, ~55 - ~200 arasında olan bireyler premutasyon yani FXS taşıyıcısıdır. Premutasyon bayanlarda olursa bir sonraki jenerasyona aktarılırken mayoz bölünme esnasında CGG dizileri artarak bireye geçer " buna antisipasyon denir" bu şekliyle bu sendromun kalıtımı diğer X'e bağlı kalıtımlı hastalıklardan farklı kılar. 200 ve üzeri CGG tekrarı olan bireyler ise full mutasyon olarak sınıflandırılır ve FXS ile ilişkilendirilir.

Bu çalışmada, FMR1 Sizing PCR (ABBOTT) ve SNP DETECTIVE FRAGİLE X (GML) kitleri kullanılarak FXS'na neden olan FMR1 genindeki CGG trinükleotit sayısı ve metilasyon durumu incelendi ve yaş ortalaması 7.5 olan 50 çocuktan 40 erkek çocuğun %15'ında full mutasyon, %2.5'inde premutasyon, ve 1 erkek çocukta ise size mozaisizmi bulunmuştur. Toplam 9 kız çocuğunun %11.11'inde full mutasyon görülmüştür. Full mutasyonların hepside metillenmiş olarak bulundu.

Anahtar kelimeler: FMR1 Geni, Frajil X Sendromu, Xq27.3, Mental Retardasyon, CGG üçlü tekrarı

IDENTIFICATION OF MUTATIONS WITH INCREASED NUMBER OF TRIPLET REPEATS IN THE FMR1 GENE IN PATIENTS WITH FRAGILE X SYNDROME

Yasin ADA
Erciyes University, Institute of Health Sciences
Medical Genetics Department
M.Sc. Thesis, July 2014
Supervisor: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

ABSTRACT

Fragile X Syndrome (FXS) (OMIM 300624) ranks in second place, after Down syndrome, among the factors of mental retardation and ranks first in familial mental retardation. It is seen about 1 in 4000 among men and 1 in 8000 among women. The fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene at the 5' non-translated region (UTR) CGG (cytosine, guanine, guanine) repeat expansion and abnormal methylation are the cause for 98-99 % of the disease on X chromosome while 1-2% are due to deletions and point mutations in the gene forms.

Clinical findings of FXS are characterized by mental retardation, prominent ears, a long, thin face, behavior disorder, and macroorchidism since puberty.

The gene responsible for FXS is called FMR1, which is localized on Xq27.3 and 38 kb in size, and comprised of 17 exons. The gene, which is at the 5' region and the first exon of CpG methylation in non-translated portion, includes CGG triplet repeat. mRNA in size of approximately 4.4 kb synthesizes 70 kDa protein. FMR1 protein (FMRP), which is expressed in various tissues required for neuronal and mental development, is an mRNA binding protein.

CGG repeat length of ~ 5 - ~ 44 is considered normal, meaning that individuals are not affected, while repeat length of ~ 45 - ~ 54 is called as "gray zone" . Individuals with repeat length of ~ 55 - ~ 200 are thought to have premutation, meaning that they are FXS carriers. If premutation occurs in women during meiosis division, then it is transferred to the next generation of individuals through increased CGG sequences. This is called "anticipation". This form of inheritance makes this syndrome different from other inherited X-linked diseases. Individuals with 200 or more CGG repeats are classified as people with full mutation and are associated with FXS.

In this study, by using FMR1 Sizing PCR (ABBOTT) and SNP DETECTIVE Fragile X (GML) kits, CGG trinucleotide number and methylation status in FMR1 gene, which cause FXS, were examined. Out of 50 children with a mean age of 7.5, 15% of 40 boys had full mutation, 2.5% of them had premutation, and mosaicism was found in one boy. Full mutation was observed in 11.11% of 9 girls in the study. All mutations were found to be fully methylated.

Keywords: FMR1 gene, the Fragile X Syndrome, Xq27.3, Mental Retardation, CGG triplet repeat

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ..... **i**
YÖNERGEYE UYGUNLUK ..... **ii**
KABUL ONAY ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xvi**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. FRAJİL X SENDROMU VE TARİHÇESİ **4**
2.2. FRAJİL X SENDROMUNUN KLİNİK BULGULARI **8**
2.2.1. Hasta Erkekler 9
2.2.1.1. Yenidoğan Dönemi 9
2.2.1.2. Prepubertal Dönemi 9
2.2.1.3. Postpubertal Dönemi 11
2.2.2. Taşıyıcı Erkekler 11
2.2.3. Hasta Kadınlar 12
2.2.4. Taşıyıcı Kadınlar 12
2.2.5. Frajil X Sendromunda Skorlama Sistemi 12
2.3. FRAJİL X SENDROMUNUN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ **16**
2.3.1. Frajil X Mental Retardasyon 1(*FMR1*) Geni 16
2.3.2. Frajil X Sendromunda DNA Metilasyonun Önemi 18
2.3.3. Frajil X Sendromundaki Mutasyonlar 20
2.3.3.1. Frajil X Sendromundaki Mutasyon Tipleri 20
2.3.3.1.1. *FMR1* Genindeki CGG Trinükleotid Mutasyonları 21
2.3.3.1.1.1. Normal (Yaygın) Aleller 21
2.3.3.1.1.2. Ara Aleller (intermediate- sınır-grey zone) 22

2.3.3.1.1.3. Premutasyon 22
2.3.3.1.1.4. Full Mutasyon 23
2.3.3.1.1.5. Mozaisizm 23
2.3.3.1.1.5.1. Size/Boyut Mozaisizm 23
2.3.3.1.1.5.2. Metilasyon Mozaisizm 24
2.3.3.1.2. *FMR1* Genindeki Delesyon ve Nokta Mutasyonları 24
2.3.4. Triplet Tekrar Ekspansiyonun/Genişlemenin Oluşum/Moleküler Mekanizmaları 25
2.3.5. *FMR1* Proteini ve Fonksiyonu 36
2.4. PREMUTASYONLARIN FENOTİPLERİ/KLİNİK YANSIMALARI ... 39
2.4.1. Frajil X'e Bağlı Tremor/Ataxia Sendromu (FXTAS) 41
2.4.2. Prematür Over Yetmezliği 1 / Frajil X'e Bağlı Primer Over Yetmezliği (POF1/FXPOI) 45
2.4.3. Premutasyon İle İlişkili Diğer Sorunlar 47
2.4.4. Premutasyon Hastalıklar için Temel olan RNA Toksik Kazanç/Yüksek Fonksiyon Modeli 48
2.5. FRAJİL X SENDROMUNUN TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER 50
2.5.1. Sitogenetik Yöntemler 50
2.5.1.1. Frajil Alanlar 50
2.5.1.1.1. FRAXA-Xq27.3 54
2.5.1.1.2. FRAXE-Xq28 56
2.5.1.1.3. FRAXF-Xq28 57
2.5.2. Moleküler Yöntemler 58
2.5.2.1. Altın Standart-Southern Blot 58
2.5.2.2. PCR-Bazlı *FMR1* Genotipleme Metotları 59
2.5.2.2.1. *FMR1* Genotipleme Karmaşıklığı 60
2.5.2.2.1.1. Size/Boyut Mozaisizm 61
2.5.2.2.1.2. Metilasyon Mozaisizm 62
2.5.2.3. Laboratuvar Testlerinde Yeni Gelişmeler 62
2.5.2.3.1. İmmünohistokimya 62
2.5.2.3.2. Optimal PCR Tahlilleri ve MS/PCR 63
2.5.2.3.3. Southern Blot Kapilleri ile PCR Kombinasyonu 63
2.5.2.3.4. TRP-PCR/Üç Tekrarlı Primer-PCR 63

2.5.2.3.5. Metilasyon Spesifik PCR/ MS-PCR 63
2.5.2.3.6. MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi 64
2.5.2.3.7. Diğer Metodlar 64
2.6. GENETİK DANIŞMANLIK 65
2.6.1. Frajil X Sendromun ve *FMR1* Gen Mutasyonların İnsidansı 65
2.6.1.1. Full Mutasyonların İnsidansı 65
2.6.1.2. Premutasyon İnsidansı 67
2.6.1.3. Ara Alellerin (intermediate- sınır-grey zone) İnsidansı 69
2.6.2. Frajil X Sendromunda Nomenklatür 70
2.6.3. FXS'da Prenatal ve Pre-implantasyon Genetik Tanı 71
2.6.4. Kalıtım Şekli ve Kalıtılabilirlik Oranı/Tekrarlama Riski 72
2.6.4.1. Erkek Vakalarda 81
2.6.5. Genetik Danışmanlar için Öneriler 81
2.6.5.1. Danışmanlık Hususları 82
2.6.6. Tedavi ve Yardımcı Kaynaklar 84
2.6.7. Yaşam Süresi 86
2.6.8. *FMR1* Test Algoritması ve Kılavuzu 86
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 88
3.1. GEREÇLER 88
3.1.1. Demirbaş Malzemeler 88
3.1.2. Sarf Malzemeler 89
3.2. YÖNTEMLER 91
3.2.1. Örneklerin Alınması 91
3.2.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu 91
3.2.2.1. Protokol 91
3.2.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi 92
3.2.4. FMR1 Sizing PCR Uygulaması 93
3.2.4.1. Protokol 93
3.2.4.1.1. PCR Aşaması 93
3.2.4.1.2. Agaroz Jel Elektroforez Aşaması 94
3.2.4.1.3. PCR Ürünlerini Saflaştırma/Temizlenme Aşaması 96
3.2.4.1.4. Örnekleri ABI 3130 Serisi Genetik Analizör İçin Hazırlama Aşaması 96

3.2.4.1.4.1. Örneklerin Denatürasyon Basamağı 96
3.2.4.1.4.2. Örneklerin ABI 3130 Serisi Genetik Analizör Cihazına Yükleme Basamağı 97
3.2.4.1.5. GeneMapper™ Programında Örneklerin Analizi 98
3.2.5. SNP Detective Fragile X Kiti Uygulaması 99
3.2.5.1. Genomik DNA'ya Sodyum Bisülfit Uygulaması 100
3.2.5.2. Bisülfitlenmiş DNA'nın Temizlenmesi 101
3.2.5.3. SNP Detective Fragile X Kit Prosedürü 102
3.2.5.3.1. PCR Aşaması 102
3.2.5.3.2. Örnekleri ABI 3130 Serisi Genetik Analizör İçin Hazırlama Aşaması 103
3.2.5.3.2.1. Örneklerin ABI 3130 Serisi Genetik Analizör Cihazına Yükleme Basamağı 103
3.2.5.3.3. GeneMapper™ Programında Örneklerin Analizi 105
3.2.5.3.3.1. SNP Detective Fragile X Analiz Panelini Oluşturma 105
3.2.5.3.3.2. SNP Detective Fragile X Analiz Projesi Oluşturma ve Analizi 105

4. BULGULAR 108
4.1. FMR1 SİZİNG PCR KİTİ (ABBOTT) ÇALIŞMA BULGULARI 110
4.2. SNP DETECTİVE FRAGİLE X KİTİ (GML®) ÇALIŞMA BULGULARI 122
4.3. FMR1 SİZİNG PCR KİTİ (ABBOTT) İLE SNP DETECTİVE FRAGİLE X KİTİ (GML®) ÇALIŞMA BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI 130
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 134
6. KAYNAKLAR 144
EKLER 171
ÖZ GEÇMİŞ 173

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Mental Retardasyon Düzeyleri 5
Tablo 2.2: FXS'da gözlenen fenotipik özelliklerin görülme yüzdeleri 8
Tablo 2.3: FXS'da sık gözlenen 10 fiziksel özellik 9
Tablo 2.4: Hagerman (1987) skorlama sistemi 13
Tablo 2.5: FXS Fenotipik Tarama Listesi 14
Tablo 2.6: FXS için önerilen ve hedeflenen aile anketi 15
Tablo 2.7: Kararsız tekrar ekspansiyon/genişleme gösteren triplet tekrar hastalıkların moleküler ve klinik özellikleri 28
Tablo 2.8: FXTAS için mevcut tanı kriterleri 43
Tablo 2. 9: FXTAS var olan/resmileşmiş ve genişletilmiş/yeni çıkan klinik bulgular 44
Tablo 2.10: Tablo 2.8 de sunulmuş olan FXTAS tanı kriterlerine önerilen modifikasyonlar 45
Tablo 2.11: X kromozomu üzerindeki nadir ve yaygın frajil alanlar 53
Tablo 2.12: Öğrenme güçlüğü olan kişilerde FXS yaygınlığı 66
Tablo 2.13: 1992 ve 2006 yılları arasında yapılan 119,232 *FMR1* testlerin özeti 67
Tablo 2.14: Premutasyon sıklığı ile ilgili yapılan/yayınlanan çalışmalar 68
Tablo 2.15: Ara (intermediate- sınır-grey zone) sıklığı ile ilgili yapılan/yayınlanan çalışmalar 69
Tablo 2.16: 664 premutasyon anneden 678 transmisyon olan çocuklarda full mutasyon genişleme yüzdeleri 74
Tablo 2.17: 936 premutasyon anneden 1,338 transmisyon olan çocuklarda full mutasyon genişleme yüzdeleri 75
Tablo 2.18: Maternal premutasyon alellerin full mutasyon genişleme çalışmaların karşılaştırılması 76
Tablo 2.19: Unstabil olan Ara (intermediate- sınır-grey zone) aleller 76
Tablo 2.20: *FMR1* premutasyonlu erkeklerde yaşa bağlı FXTAS riski 80
Tablo 2.21: *FMR1* premutasyonlu kadınlarda tekrara bağlı FXPOI riski 80

Tablo 2.22: *FMR1* ilişkili bozukluklar için önerilen ve hedeflenen aile öyküsü soruları 83
Tablo 2.23: *FMR1* test kılavuzu 86
Tablo 3.1: PCR reaksiyon kompozisyonu 93
Tablo 3.2: FX PCR termal cycle profili 94
Tablo 3.3: FX PCR ürünü Saflaştırma/Temizleme thermal cycler profili .. 96
Tablo 3.4: PCR ürünlerin denatürasyon reaksiyon kompozisyonu 96
Tablo 3.5: FX Denatürasyon termal cycler profili 97
Tablo 3.6: ABI 3130/3130xl'de FMR1 Sizing PCR (Abbott) yürütme modülü ve şartları 97
Tablo 3.7: Bisülfit reaksiyon kompozisyonu 100
Tablo 3.8: Bisülfit dönüşüm termal cycler profili 100
Tablo 3.9: Floresan Met-PCR reaksiyon kompozisyonu 102
Tablo 3.10: Floresan NonMet-PCR reaksiyon kompozisyonu 102
Tablo 3.11: Floresan mTP-PCR reaksiyon kompozisyonu 102
Tablo 3.12: SNP Detective Fragile X PCR termal cycler profili 103
Tablo 3.13: PCR ürünlerini ABI 3130 Genetik Analizör Cihazına yüklemede kullanılan reaksiyon kompozisyonu 103
Tablo 3.14: 3130/3130xl'de SNP Detective Fragile X Kiti (GML) PCR ürünlerin yürütme modülü ve şartları 104
Tablo 4.1: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına FXS şüphesiyle başvuran 3-15 yaş arası 50 çocukta FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre yüzdeleri 109
Tablo 4.2: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına FXS şüphesiyle başvuran 3-15 yaş arası 50 çocukta alel bazlı FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre tekrar ortalaması ve yüzdeler ... 109
Tablo 4.3: FMR1 Sizing PCR kiti ile yapılan çalışmanın bulguları 110
Tablo 4.4: SNP Detective Fragile X kiti ile yapılan çalışmanın bulguları 122
Tablo 4.5: FMR1 Sizing PCR kiti ve SNP Detective Fragile X kiti ile yapılan çalışmaların karşılaştırılması 131

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: *FMR1* geni ve bölgesinin genomik yapısı 17
Şekil 2.2 : DNA metilasyon mekanizması 18
Şekil 2.3: Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum 19
Şekil 2.4: İnsanlardaki *FMR1* genin dört alellik formunun sınıflandırılması 21
Şekil 2.5: İnsan hastalıklarından sorumlu genişleyebilen tekrarlarının konumu 30
Şekil 2.6: Genişleyebilir tekrarlar için oluşturulan olağandışı DNA yapıları *32*
Şekil 2.7: Tekrar genişlemesi için replikasyon mekanizmaları..... 33
Şekil 2.8: Bölünme olmayan hücrelerde tekrar artışlar/genişlemeler için boşluk tamir modeli 34
Şekil 2.9: Tekrar artışları/genişlemeleri için rekombinasyon modelleri 35
Şekil 2.10: Genişleyebilir tekrarlar içersinde ki kesintiler ile stabilize kaybı 35
Şekil 2.11: İnsan *FMR1* geni ve *FMR1* protein (FMRP) yapıları 38
Şekil 2.12: Premutasyon taşıyıcıların molekül değişiklikleri ve klinik tutulum spektrumu 40
Şekil 2.13: CGG tekrar uzunluğuna göre erken yumurtalık yetmezliğinin yaşa özgü yaygınlığı 47
Şekil 2.14: FXTAS için RNA toksik kazanç/yüksek fonksiyon modeli şematize edilmiştir 49
Şekil 2.15: X kromozomu üzerindeki nadir frajil bölgeler 54
Şekil 2.16: Nükleotid metabolizmasına katılan folat duyarlı fragil bölgelerin ifadelenmesi 56
Şekil 2.17: FXS hastaların kadın yakınları arasında premutasyon (PM) risk modeli 74
Şekil 2.18: Ara (intermediate- sınır-grey zone) alellerin anne iletimi 77
Şekil 2.19: Genel populasyonda ve FXS'lu ailelerdeki premutasyon alellerin tekrar sayılarının dağılımı 78

Şekil 2.20: *FMR1* Test Algoritması 87
Şekil 3.1: Normal, Premutasyon ve Full mutasyonlu Erkek ve Kadınlarda beklenen desenler 107
Şekil 4.1: 28 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü 112
Şekil 4.2: 28 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü 113
Şekil 4.3: 29 ve 31 Tekrarlı Kız çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü 114
Şekil 4.4: 29 ve 31 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü 115
Şekil 4.5: 90 Tekrarlı Premutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü 116
Şekil 4.6: 90 Tekrarlı Premutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü 117
Şekil 4.7: 91 ve 297 Tekrarlı Size Mozaisizm olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü 118
Şekil 4.8: 91 ve 297 Tekrarlı Size Mozaisizm olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü 119
Şekil 4.9: 286 Tekrarlı Full mutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü 120
Şekil 4.10: 286 Tekrarlı Full mutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü 121
Şekil 4.11: 29 tekrarlı Normal Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 124
Şekil 4.12: 28 ve 36 tekrarlı Normal Kız çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 125
Şekil 4.13: 89 tekrarlı Premutasyonlu Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 126
Şekil 4.14: 88 tekrarlı ve Metillenmiş Size Mosaisizmli Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 127
Şekil 4.15: 28 tekrarlı ve Metillenmiş Full Mutasyonlu Kız çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 128

Şekil 4.16: Metillenmiş Full Mutasyonlu Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü 129

SİMGELER VE KISALTMALAR

FXS :	Frajil X sendromu
***FMR1* :**	Frajil X Mental Retardasyon 1 geni
UTR :	Translate olmayan bölge
CGG :	Sitozin, Guanin, Guanin
FMRP:	Frajil X Mental Retardasyon 1 proteini
MTX :	Methotrexate
FM :	Full mutasyon
PM :	Premutasyon
FRAXA:	X kromozom
PCR :	Polimeraz zincir reaksiyonu
IQ :	Intelligence Quotient
XMLR:	X bağlantılı mental retardasyon
RFLP :	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri
Mb :	Mega baz
bç :	Baz çift
GABA:	Gamma-aminobütirik asit
SAM :	S-adenozil metiyonin
DNMT1:	DNA metiltransferazların1
5-azadC:	5-azadeoksisitidin
NMR :	Nükleer magnetik rezonans
RGG :	Arg-Gly-Gly domain
NLS :	Nükleer lokalizasyon dizisi
NES :	Nükleer export sinyali
KH1 :	hnRNP K-protein homoloji domainleri
RNA :	Ribonükleik asit
DNA :	Deoksiribonükleik asit
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
MRI :	Manyetik Rezonans Görüntüleme
FXTAS:	Frajil X'e bağlı tremor/ataksi sendromu
FXPOI:	Frajil X'e Bağlı Primer Over Yetmezliği
POF1 :	Prematür Over Yetmezliği 1

POS :	Prematür over senescence/yaşlılığı
AMH :	Anti-Müller'ien Hormon
FSH :	Folikül stimilasyon hormonu
BrdU :	Bromodeoksiüridin
FUdR :	Fluorodeoxiuridine
CDP :	Sitidin difosfat
EDTA :	Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr :	Etidyum bromür
UV :	Ultraviyole ışını
TBE :	Tris-Borate elektroforezis buffer
ms-PCR:	Metil spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
kb :	Kilo baz
kDa :	Kilo dalton
TR-PCR:	Trinükleotit tekrar polimeraz zincir reaksiyonu

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Frajil X Sendromu (FXS) (OMIM 300624); X kromozomu üzerinde yer alan Frajil X Mental Retardasyon 1 (*FMR1*) genin 5' ucunda translate olmayan bölgesindeki (UTR) CGG (sitozin, guanin, guanin) tekrarının genişlemesinin nedenidir (1,2). FXS mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır. Toplumda ki sıklığı erkeklerde yaklaşık 4000 de 1 ve bayanlarda yaklaşık 8000 de 1 olduğu bilinmektedir. (3, 4, 5, 6, 7). Hastaların %99-98'de CGG tekrarın genişlemesi sebebiyle ve %1-2 'lik kısmının ise nadir bildirilen tek nokta mutasyonların ve genetik varyasyonların FXS neden olduğu bildirilmiştir (8, 9, 10).

FXS özgün klinik bulguları; zayıf göz teması, el çırpma ve el ısırma gibi otistik davranışlarla özgün mental retardasyon, makroorşidizm, belirgin kulaklar, uzun yüz, öne doğru çıkık çene ve eklemlerde hiperekstansibilitedir. Bu bulgular genellikle çocukluk sonrası dönemlerde daha belirgin hale gelir (11). Klinik bulgular bir çok mental retardasyon sendromları ile benzerlik gösterdiklerinden dolayı ayırıcı tanı için sitogenetik ve moleküler genetik testler son derece önemlidir (12).

FXS'dan sorumlu gen Xq27.3'e lokalize edilmiş *FMR1* adı verilen 38 kb büyüklüğünde ve 17 ekzon içeren bir gendir (13). Gen, *5′* ucunda CpG metilasyon bölgesi ve birinci ekzon'un translate olmayan kısmında CGG üçlü tekrarları içerir (1, 2). Yaklaşık 4.4 kb büyüklüğündeki mRNA 70 kDa'luk bir protein sentezler. *FMR1* proteini (*FMRP*) çeşitli dokularda ifade edilen ve nöronal ve zihinsel gelişimi için gerekli, mRNA bağlayıcı bir proteindir (14). Bu sendromun sitogenetik bulgusu düşük folatlı ya da folat metabolizmasını inhibe eden maddelerle (methotrexate (MTX), fluorodeoxyuridine) indüklenmiş hücre kültürlerinde Xq27.3 bölgesindeki frajil bölge ile ilişkilidir (15).

FXS'lu hastalarda *FMR1* geni, moleküler açıdan farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar;

CGG dizilerindeki artma ile bu tekrar dizilerinin, 250 bp proksimalinde bulunan CpG adasındaki anormal metilasyonu (1, 2) ve ayrıca nadir olsa da nokta mutasyonlar ve genetik varyasyonlardır (8, 9, 10).

CGG tekrarları ~5 - ~44 arasında olan bireyler normaldir yani etkilenmemişlerdir, ~45 - ~54 arasındaki tekrarlar "gri bölge" denir, ~55 - ~200 arasında olan bireyler premutasyon (PM) yani FXS taşıyıcısıdır. PM bayanlarda olursa bir sonraki jenerasyona aktarılırken mayoz bölünme esnasında CGG dizileri artarak bireye geçer " buna antisipasyon denir" bu şekliyle bu sendromun kalıtımı diğer X'e bağlı kalıtımlı hastalıklardan farklı kılar, PM erkekler de olursa bir sonraki jenerasyona normal yada tekrar sayılarının azalarak geçiş gösterdiği bilinmektedir. 200 ve üzeri CGG tekrarı olan bireyler ise full mutasyon (FM) olarak sınıflandırılır ve FXS ile ilişkilendirilir (16). PM ve FM dışında birde mozaik vakalar vardır, mozaik vakalarda zigot oluştuktan sonra PM halde bulunan hücrelerden, biri veya bir bölümü mitoz sırasında kararsız hale geçerse FM gelişir ve sonuçta mozaik (PM / FM) bireyler oluşur. Bu bireylerde fenotip ılımlıdır (17).

Düşük folatlı ya da folat metabolizmasını inhibe eden maddelerle (MTX gibi) indüklenmiş hücre kültürlerinde Xq27.3 bölgesindeki (FRAXA) frajil nokta her metafaz da görülmemektedir. Bu bölgede yer alan folik asit yokluğuna duyarlı diğer frajil bölgeler (FRAXD, FRAXE ve FRAXF), sitogenetik tanıyı güçleştirmektedir (18). Aynı zamanda premutasyon taşıyıcılarında sitogenetik inceleme yetersiz kalmaktadır (19). Çünkü; CGG tekrar sayısı 200'den büyük olduğunda sitogenetik olarak frajil bölgenin gözlendiği bilinmektedir. Frajil bölgenin oluşumuyla ilgili olarak ileri sürülen bir hipoteze göre, indüklenen kültür şartlarında frajil bölgenin replikasyonu güçleşmekte ve bu segmentteki DNA eksik olarak replike edilmektedir. Bunun sonucunda kromatin kondenzasyonu lokal olarak zarar görmekte ve sitogenetik frajil bölge ortaya çıkmaktadır (20).

FXS'un prenatal tanısı, taşıyıcı tayini ve klinik tanısında uygulanan DNA testi kısa sürede yapılabilmesi ve ekonomik oluşu nedeniyle sitogenetik testten daha kullanışlıdır. Ayrıca sitogenetik teste göre daha güvenilirdir. Çünkü taşıyıcılarda ve nadiren, CGG sayısının artmasına rağmen metilasyonun olmadığı etkilenmiş bireylerde sitogenetik anomali (frajil X) görülmez. Böyle kişiler ancak DNA testi ile belirlenebilir (21,22).

FXS moleküler tanısı iki temel yöntemle ile konulmaktadır. Bu yöntemler Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi ve Southern blot analizidir. Southern blot analizinde tekrar sayısı ve metilasyon durumu aynı çalışmayla belirlenebilmektedir. Bu yöntemde metilasyona duyarlı bir enzim kullanılarak metilasyona uğramış allel ile metile olmayan allel ayırt edilebilmektedir. Ancak southern blot analizinde, PCR'a oranla daha çok DNA'ya gereksinim duyulmakta ve aynı zamanda bu teknik, PCR tekniğine göre daha zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir (23). Southern blotla, her büyüklükteki allel güvenilirlikle çalışılabilmekte ancak, artış sayısı kesin olarak belirlenmemektedir (24). PCR yönteminde ise tekrar bölgesine özgün primerler kullanılarak allellerin tekrar sayısı saptanabilmektedir. PCR reaksiyonun başarısı CGG tekrar sayısı ile ters orantılıdır. 15/15 PCR saykıl yöntemi ile 200 ve üzeri tekrarları daha net görülebilmektedir ve az miktarda DNA ile, kısa sürede ve çok fazla maliyete gereksinim duymadan, sitogenetik analize göre daha kesin ve PM, FM belirlemede kullanılan ideal bir yöntemdir. Bu yöntemle taşıyıcı (PM) bireyler tespit edilebildiğinden bu kişilerin daha sonraki dönemlerde çocuk sahibi olma gibi bir durum söz konusu olduğunda preimplantasyon genetik tanı yöntemiyle tamamen sağlıklı bir gebelik süreci geçirme imkanları mevcuttur.

FXS için spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Bunun yerine tıbbi tedavi, konuşma tedavisi, özel eğitim, uğraşı tedavisi ve spor çalışmaları gibi uygulamalar, hastalığın semptomlarını hafifletir (25). Bu yüzden erken tanı konulması etkilenmiş birey için çok önemlidir. Ayrıca bu testin yaygın olarak yapılması hatta evlilik öncesi, yeni doğan ve prenatal tarama testlerinde yer alması ve hastalıktan etkilenen çocukların risk altındaki akrabalara ve aileye genetik danışmalık verilerek bu hastalığın sıklığının azaltılması için gereklidir.

Bu nedenle çalışmamızda; FXS ön tanısı ile gelen çocuklarda moleküler analizi yapılarak üçlü tekrar sayılarının belirlenerek genetik danışmanlık verilmesi ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalımızın bu eksikliğinin kapatılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FRAJİL X SENDROMU VE TARİHÇESİ

FXS mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır (3). Mental retardasyon, Amerikan Zeka Yetersizliği Birliği (American Association on Mental Deficiency, AAMD)'nin yaptığı tanımlamaya göre, gelişim döneminde meydana gelen, uyumsal davranıştaki bozukluklarla birlikte bulunan ortalamanın altındaki zeka işlevidir (26).

Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) tarafından hazırlanan zeka bozuklarının tanısal ve istatistiksel mental bozukluklar kılavuzu, dördüncü baskısında (DSM-IV), ölçüt kriterleri belirlenmiştir.

Buna göre:

1. Ortalamanın önemli derecede altında zeka işlevselliği: Bireysel olarak uygulanan Intelligence Quotient (IQ) testinde IQ değerinin yaklaşık 70 ya da altında bir zeka seviyesinin olması.

2. İletişim, kendine bakım, ev yaşamı, toplumsal/kişiler arası beceriler, toplumun sağladığı olanakları kullanma, kendi kendini yönetip yönlendirme, okulla ilgili işlevsel beceriler, iş, boş zamanlar, sağlık ve güvenlik gibi alanlardan en az ikisinde uyum ve eşzamanlı yetersizliklerin ya da bozuklukların olması.

3. Başlangıcının, 18 yaşından önce olması, kriterlerine göre her birey mental retardasyon özelliği gösterir (27).

Mental retardasyon Wechsler zeka testi (IQ) puanlarına göre dört gruba ayrılır (Tablo 2.1) (26, 27).

Tablo 2.2. Mental Retardasyon Düzeyleri

Mental Retardar Düzeyi	Weshsler Zeka Testi (IQ) Puanı
Hafif mental retarde	50-55 ile70
Orta mental retarde	35-40 ile 50-55
Ağır mental retarde	20-25 ile 35-40
İleri mental retarde	20-25 ile altında olması

İnsan populasyonunun yaklaşık % 3 'ünü etkileyen yaygın bir rahatsızlıktır (28). X bağlantılı mental retardasyon (XLMR) erkeklerdeki mental retardasyonun yaklaşık % 25'ni oluşturur. XLMR'nin sıklığının erkeklerde 1.83/1000, taşıyıcı kadınlarda 2.4/1000 olduğu tahmin edilmektedir. En az 95 XLMR tipi belirlenmiştir. Bunun 70'den fazlası belirgin sendromlar olarak tanımlanmıştır. Frajil X' in XLMR'nun % 40'nı oluşturduğu varsayılmaktaydı (29). Daha sonraki araştırmaya göre, FXS, tüm XLMR'nun % 15-20'sini oluşturmaktadır (28). Mental retardasyonluların çoğunun erkeklerden oluştuğu uzun zamandır bilinmektedir. Johnsonn 1897 yılında Amerika'da mental retarde erkeklerin kadınlara göre % 24 daha fazla olduğunu öne sürmüş fakat buna yeterli bir açıklama getirememiştir.

İlk olarak 1938 yılında Penrose, erkeklerin kadınlara göre mental retardasyonun daha fazla olduğunu öne sürmüş ve belirlemiştir (30).

1943 yılında Londra'daki Queen Square Hastanesinde J. Purdon Martin and Julia Bell XLMR gösteren mental retardasyon bozukluğunu (FXS) rapor etmişlerdi ve bu bozukluğa Martin ve Bell sendromu olarak tanımlamışlardır. Rapor edilen hastanın birinde makroorşitizm ve hepsinde büyük yüz ve çene vardı. Rapor edilen ailede bulunan erkeklerden en az 9'u etkilenmiş ve anne tarafındaki dedeler (2 erkek kardeş) etkilenmemişlerdi. Martin ve Bell etkilenmiş erkek çocukların dedelerinin etkilenmemiş olmasında bazı baskılayıcı faktörlerin olabileceği hipotezini öne sürdüler (31, 32).

Lubs (1969), bir ailede üç jenerasyonda da etkilenmiş olan erkeklerde bir markır kromozom (X kromozomunun uzun kolu, distal bölgesinde bir daralmış-kırılabilir bölge) olduğunu belirlemiştir.

Sutherland'ın (1977) çalışmalarında daha iyi bant elde etmek için medium 199 yerine F-10 kültür medyumu kullandığında, Frajil-X kromozomunu, gösterememesi onun folatın kritik rolünü keşfetmesine yol açtı. Sutherland ve arkadaşları, folat yokluğunda eksprese olan frajil bölgeyi Xq27.3-q28 bölgesinde olduğunu tespit ederek X kromozom üzerindeki kırıklığı yani markırı açıklamışlar.

XLMR'nin bazı formlarının makroorşitizm ile ilişkili olduğu belirlenmiş (33, 34, 35). Büyük testislerde endokrin ve germinal fonksiyonların normal olduğu gözlenmiştir. Daha sonra, makroorşitizmin sitogenetik markır ile karakterize edilen XLMR'li bazı aileler ile ilişkili olduğu gösterilmiş (36, 37). Bütün bunların ışığında, Martin ve Bell tarafından orijinal olarak yayınlanan pedigri yeniden değerlendirilerek, makroorşitizm ve X kromozomu üzerindeki sitogenetik markırın her ikisinin de birlikte bulunduğu gözlenmiştir (38). İlk yayınlanan bu pedigrinin tanımlanmasında, X kromozomu sitogenetik markır ile ilişkilendirilen XLMR, Martin-Bell sendromu olarak adlandırılmıştır. Bu sendrom şimdi genellikle FXS olarak tanımlanmakta ve tek sitogenetik markır ilişkisine uygun olan, frajil bölge olarak açıklanmaktadır. Rutinde FXS ile birleştirilen klasik karakteristik yüz görünümü ile tanımlanan Martin-Beli fenotipi adlandırması kullanılmaktadır (30).

Glover (1981) ve Tommerup ve arkadaşları (1981) normal folik asit düzeyli medyuma fluorodeoksiuridin (FUdR) kullanımı ile frajil noktanın ekspresyonunun arttığını gösterdiler. Blomquist ve arkadaşları (1982) normal kültürlere metotraksat (MTX) ilavesi ile de aynı etkinin alındığını bildirdiler.

1983'te, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) analizleri ile başlayan DNA incelemeleri frajil X ile G6PD ve hemofili B arasında yakın bir bağlantı olduğunu gösterdi (39). Oberle ve arkadaşları (1991) RFLP analizlerinde en informatif markerin StB probu olduğunu bildirdiler. 1988'de Thibodeau ve arkadaşları DXS51, F9, DXS98 ve DXS52 markırları ile frajil X lokusu arasında bağlantı olduğunu gösterdiler.

Fryns (1982 ve 1984), Frajil X bölgesinin, normal erkekler tarafından kalıtıldığını gösterdi. Johnson ve arkadaşları tarafından (1991), aynı şekilde geniş bir ailede normal erkeklerden kalıtılan, Frajil X sendromlu olgular bildirdiler.

1991 yılında, Poustka ve arkadaşlan Xq27.3'den telomere kadar olan bölgeyi kapsayan, 12 Mb büyüklüğünde fiziksel haritayı tanımladılar.

Aynı yıl Yu ve arkadaşları frajil bölgeyi içeren, iki prob hazırlayarak YAC kütüphanesini taradılar. Frajil bölgeyi ve muhtemelen ilgili geni içerdiğini düşündükleri, 275 kb uzunluğundaki insan DNA'sını içeren YAC'ı izole ettiler ve geni 15 kb'lik bir dizide saptadılar. Buradan elde ettikleri 15 kb'lik bölgeyi EcoRI ile kestikten sonra, elde ettikleri 5 kb'lik DNA parçasını izole ettiler. Bu parçayı işaretleyip prob (pfxal) olarak kullanarak, normal kişilerde ve FXS'lu kişilerde DNA dizisindeki yeniden düzenlenmelerin, sadece FXS'lu kişilerde olduğunu gösterdiler. Bu yeniden düzenlenmelerde, araştırma yapılan dizinin boyunda artmalar olduğunu ve aile içindeki bireyler arasında da boyutlarda farklılıklar olduğunu gösterdiler.

Oberle ve arkadaşları (1991) da aynı yıl metilasyonun, muhtemelen CpG adasında olduğunu ve bunun CpG adasının ait olduğu gen ürününde eksikliğe yol açtığı ve böylece hastalık fenotipinin ortaya çıktığını ileri sürdüler. İki probla (StB12.3, F33) yaptıklan çalışmada, bu CpG adasının frajil bölgenin içinde ya da çok yakınında olduğunu gösterdiler. DNA'daki değişikliklerin, 550 bp'lik zengin GC içeren bölgede olduğunu açıkladılar. Fenotipik olarak normal olan taşıyıcı (transmiter) erkeklerde, 150-509 bp uzunluğu olduğunu ve bunların bu parça uzunluğunu kızlarına hiç değişmeden veya çok küçük değişiklerle kalıtıldığını bildirdiler. Aynı şekilde Vincent ve arkadaşlan (1991) ile Beli ve arkadaşları (1991) da frajil X geni yakınlarında DNA metilasyonunda artış olduğunu ve bu bölgelerde tekrarlayan CpG adaları olduğunu gösterdiler.

Verkerk ve arkadaşları, 1991 yılında ilk kez *FMR1* genin cDNA'sını pozisyonal klonlama ile izole ettiler ve Frajil Bölge Mental Retardasyon (*FMR1*) terimini kullandılar.

Richard ve Sutherland 1992'de yaptıkları çalışmalarında, Frajil-X sendromunda CGG tekrar artışı, Kennedy hastalığı ile miyotonik distrofin de ise AGC tekrarlan olduğunu ve bunların "dinamik mutasyon" özelliği taşıdığını açıkladılar.

Eichler ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada, ekzon-ekzon PCR restriksiyon analizi ile FMRI geninin toplam 38 kb'lik 17 ekzon'dan oluştuğunu gösterdiler. Dizileme çalışmaları ile de ekzon-intron sınırlarını belirlediler. Ayrıca, *FMR1*'de alternatif kırpılma görülebileceğine dikkat çektiler.

Ashley ve arkadaşları, 1993 yılında yaptıkları çalışmada, sıçanda insan *FMR1* genine homolog gen bölgesini tanımladılar ve cDNA'sını izole ettiler.

2.2. FRAJİL X SENDROMUNUN KLİNİK BULGULARI

Mental retardasyon, belirgin kulaklar, uzun ince bir yüz, davranış bozuklukları, pubertal dönemden itibaren makroorşitizm ile karakterize bu sendromun özelliği, olguların dişi veya erkek oluşu, erkeklerin premutasyon veya full mutasyon taşımaları ile yeni doğan, prepubertal ya da post pubertal dönemde bulunmalarına göre klinik bulgular değişkenlik gösterir (40, 41, 42).

FXS'da gözlenen fenotipik özelliklerin görülme yüzdeleri Tablo 2. 2' de (43) ve sık gözlenen 10 fiziksel özellik Tablo 2.3'de verilmektedir (44).

Tablo 2.2: FXS'da gözlenen fenotipik özelliklerin görülme yüzdeleri (43)

Fenotipik Özellikler	Görülme Yüzdeleri (%)
Mental retardasyon	100
Dışa çıkık büyük kulak	95
Makroorşitizm (Büyük testis)	84
Düz taban	83
Aile Öyküsü	74
Hiperaktivite	74
Dokunmaya tepki	63
Kısa dikkat	63
Hiperekstansibilite	58
Sürekli konuşma	53
El sallama	47
Soluk mavi göz	42
Elini ısırma	37
Göz göze gelememe	37

2.2.1. Hasta Erkekler

Mozaik ya da full mutasyon taşıyıcısı erkek olguların tümünde mental retardasyon söz konusudur.

Tablo 2.3: FXS'da sık gözlenen 10 fiziksel özellik (44)

Sık Gözlenen 10 Fiziksel Özellikler
Uzun, ince yüz
Dışa çıkık ve büyük kulaklar (>7 cm)
Geniş baş çevresi
Yüksek kavisli damak
Düz taban
Hiperekstansibil parmak eklemleri
Çift eklemli başparmak yada başparmaklar
Elde nasırlar
Tek el çizgisi (sidney veya simian çizgisi)
Kalpte üfürüm

2.2.1.1. Yenidoğan Dönemi

Frajil X sendromunun yeni doğan dönemde tanısı çok zordur. Bu olguların doğum tartısının normal kardeşlerine göre daha fazla ve baş çevresinin normalin üstünde olduğu bildirilmektedir (45). Göz etrafındaki şişlik ve hipotoni en önemli diğer bulgulardır. Aynca, Frajil X yenidoğanların yarık dudak, yumru ayak, konjenital kalça çıkığı ve fıtık için artmış riskleri olduğu ve bu bulguların Frajil X sendromundaki bağ dokusu displazisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (41). Frajil X pozitif bebeklerin çoğunda sinirlilik, kucağa alınmaya-dokunmaya aşırı hassasiyet ve beslenme güçlüğü olduğu gözlenmiştir (11, 42).

2.2.1.2. Prepubertal Dönemi

Puberte öncesi erkeklerin fizik muayenesinde en dikkat çekici özellik malforme olmayan belirgin ya da büyük kulaklar, her yaştaki Frajil X erkeklerin yaklaşık %80'inde görülür fakat, kulak genişliği tanıda daha sağlıklı sonuç verir ve anti helikal kıvrımın kaybolması ile bir çukurlaşma söz konusudur (42). Uzun ve dar yüz puberte

öncesi bireylerde nadiren görülür. Metakarpoflangeal eklemlerde hiperekstansibilite sık rastlanılan (%60) diğer bir bulgudur (11). Genellikle tüm ligamentlerde anormal bir gevşeklik bulunabilir. Düz tabanlık olguların %50'sinden fazlasında ve göğüsteki hafif bir pektus ekskavatus deformitesi ise %43 oranında görülür. Deri biyopsilerinin mikroskopik incelemesinde, anormal elastin fibril yapılarına rastlanmıştır.

Prepubertal dönemdeki çocukların 113 'ünde testis volümü normalden fazladır. Prepubertal erkeklerde anlamlı bir makroorşitizmden bahsedilebilmek için testis volümünün 4 ml' den fazla olması gerekir.

Epilepsi, hastaların %20' sinde gözlenmesine rağmen, nedeni henüz kesin olarak bilinmemektedir. Serebellar vermis' deki defektin olgularda yaygın olarak görülmesinin etiolojisi de etken olabileceği varsayılmaktadır. Ayrıca serebellumdaki başlıca nörotransmitter olan gamaaminobutirik asit'in GABA A reseptör subünit geninin, Xq27.3'deki frajil bölgeye yakın olarak bulunması ve bazı epilepsilerin patofizyolojisinde GABA nöronlarının inhibisyon eksikliğinin bulunması, Frajil X mutasyonunun GABA A reseptör subünit geninin fonksiyonunu da etkilediğini düşündürmektedir (46).

Okul öncesi dönemlerde daha hafif olan mental retardasyon puberte ve postpubertede belirginleşir. Etkilenmiş erkeklerde zeka düzeyleri öğrenme güçlüğü olan normal zeka düzeyinden ağır zeka geriliklerine kadar çeşitlilik gösterir. Rousseau ve arkadaşlarının (1994) 274 full mutasyon taşıyan erkeklerde yaptıkları çalışmada olguların %87' sinde orta-ağır derece zeka geriliği olduğu gözlenmiştir.

Fiziksel bulgulara oranla davranış bulguları prepubertal dönemde tanıda daha yardımcıdır.

İki yaş civarı çocuklarda konuşma geriliği ve hiperaktivite dikkat çeker ve aileler genellikle bu nedenle doktora başvururlar. Hiperaktivite daha çok pubertal döneme ait bir bulgudur ve ilerleyen yaşla azalır. Konuşma zorlayıcı, dağınık, tekrarlayıcı, kekeleyerek ve patlayıcı bir tarzdadır. Dokunmaya aşırı duyarlılık, dikkat süresi azlığı, huzursuzluk, zayıf göz kontağı, çekingenlik, sosyal uyumsuzluk, ağlarken ya da sinirlendiğinde el ısırma, el çırpma, utanma ve stereotipik hareketler gibi otistik

bulgular yaygındır. Otistik bulgular pubertal erkeklerin önemli bir kısmında olmasına rağmen otizm, Frajil X erkeklerin yaklaşık %16'sında görülür. Buna karşın otistik erkeklerde yapılan Frajil X sendromu taramasında, Frajil X sendromu %10 oranında saptanmıştır. Bu nedenle, etiyolojisi bilinmeyen otizm veya mental retardasyon olgularının Frajil X sendromu açısından değerlendirilmeleri önerilmektedir (11).

2.2.1.3. Postpubertal Dönemi

Prepubertede gözlenen fiziksel bulgular bu dönemde daha da belirginleşir. Kulaklar büyük, alın yüksek, çene belirgin ve yüz görünümü ince, uzun ve dardır. Büyük belirgin kulaklar ve olguların %80'inde makroorşitizm gözlenir. Makrorşiti, postpubertal dönemde testiküler volümün 30 ml' den daha fazla olması ile tanımlanır (11). Tipik olarak, yetişkin Frajil X erkeklerin testis volümü 50-60 ml olmasına rağmen 100 ml'lik testis volümüne sahip hastalarda bildirilmiştir. Makroorşitizm bu sendromda sıklıkla görülmekle birlikte özgün bir bulgu değildir. Araştırmalar mental retardasyonlu erkeklerde makroorşitizmin prevalansının %29 gibi yüksek oranda olduğunu ve makroorşitili erkeklerin sadece %4-27'sinin Frajil X pozitif olduğunu göstermiştir. Belirgin mental retardasyonu olan FXS'lu erkekler nadiren çocuk sahibi olurlar. Makroorşitizm sekonder gelişen spermatogenezde azalma, malforme spermatitlerin artışı fertilitenin azalmasına yol açmaktadır (40, 11)

On sekiz yaşın üzerindeki hastaların %80'inde mitral valf prolapsusu ve %18-52' sinde progresif olmayan hafif aort kökü dilatasyonu vardır. Bu bulgular bağ dokusu displazisi ve anormal elastin yapısı ile açıklanmaktadır.

Mental gerilik ve öğrenme güçlüğü bu dönemde daha da belirginleşmiştir ve etkilenmiş olguların IQ değerleri değişkenlik gösterir (47). Postpubertal dönemde hiperaktivite azaldığı için Frajil X' li hastalar daha sakindir. Konuşma bozukluğu ve otistik davranışlar bu dönemde de gözlenir.

2.2.2. Taşıyıcı Erkekler

Premutasyon olan erkekler, normal zeka düzeyine sahip olup klinik olarak normaldir ve kromozomal frajil bölge gözlenmez. Böyle klinik olarak normal hemizigot erkekler, orijinal olarak "transmitting males" olarak adlandırılmaktadır (20)

2.2.3. Hasta Kadınlar

Frajil X full mutasyon taşıyan kadınlar, çok değişken fenotip gösterirler. Full mutasyon taşıyan kadınların yaklaşık % 50'sinde mental yetersizlik görülür. Frajil X full mutasyonunu taşıyan, zeka geriliği görülen kadınlarda, ayrıca bir karakteristik davranışın olmadığı belirlenmiştir. Etkilenmiş erkeklerde görülen benzer yüz görünümü mental retarde heterozigot kadınlarda da görülür.

Full mutasyon taşıyan kadınlarda, full mutasyonun ekspresyonundaki değişkenliği açıklayan bir hipoteze göre, mental retardasyonun derecesi X inaktivasyon modeline bağlıdır: klinik olarak etkilenmiş kadınlar, yüksek sıklıkta frajil X mutasyonu taşıyan aktif X kromozomuna sahiptirler (20, 48).

FXS için heterozigot tek yumurta ikizi kızlardan biri mental retardasyon iken diğeri zihinsel olarak normal olan iki vaka rapor edilmiştir. İkizlerin her ikisinde de sitogenetik olarak % 7 frajil X ekspresyonu görülüyor. Fakat normal olan kızda, hücrelerin sadece % 30'unda aktif X kromozomunun frajil olduğu, mental retardasyonlu kız kardeşte ise hücrelerin % 85'inde aktif X' in frajil olduğu belirlenmiştir (20).

IQ'su 70'in altında olan frajil X pozitif kızlarda davranış problemleri, öğrenme güçlüğü, psikosomatik, impulsive-hiperktivite, ankisiyete ve hiperaktivite indeksi oranı artmaktadır (49). Erkeklerde olduğu gibi kadınlarda da konnektif doku problemleri ve tiroid endokrin anormallikleri görülmüştür (50).

2.2.4. Taşıyıcı Kadınlar

Premutasyon olan kadınlar, genel olarak normal zeka düzeyine sahip olup klinik olarak normaldir ve kromozomal frajil bölge gözlenmez. FXS'lu çocukların kesin taşıyıcı annelerinde depresyon % 26 oranında görülmektedir (47). FXS taşıyıcısı normal IQ'ya sahip kadınlarda erken menapoz girme oranı % 13, kontrollerde ise % 5 olarak belirlenmiştir (51).

2.2.5. Frajil X Sendromunda Skorlama Sistemi

FXS'u için sitogenetik ve moleküler genetik çalışma yapılmadan önce klinik muayenede fiziki kriterlerin değerlendirildiği skorlama sistemi geliştirilmiştir.

FXS'lu hastaların tanısında skorlama sistemi ilk olarak SanDiego'da Rimiand (1984) tarafından kullanılmıştır. Yıllar içinde modifiye edilip Hagerman (1987) skorlama sistemi 13 kriteri kapsamaktadır (Tablo 2. 4) (52).

Tablo 2.4. Hagerman (1987) skorlama sistemi

SKORLAMA	Hiç Yok (0)	Biraz (1)	Kesin Var (2)
1-Mental retardasyon			
2-Hiperaktivite			
3-Kısa dikkat süresi			
4-Dokunmaya aşırı reaksiyon			
5-El çırpma			
6-El ısırma			
7-Göz kontağı kurmama/ilşimin zayıf olması			
8-Zorlanarak aşırı, hızlı, tekrarlayıcı konuşma			
9-Eklemlerde hiperekstansibilite			
10-Büyük ya da belirgin kulaklar			
11-Makroorşidi			
12-Simian ya da sydney çizgisi			
13-Ailede mental retardasyon öyküsü			

Hazırlanan 13 kriterlik bu listenin ilk uygulaması olan 107 ağır mental retarde erkekte yapılmış bir çalışmanın sonuçlarına göre, skorlamada saptanan Frajil X pozitiflik oranlar;

2-5 puan alanlarda %0

6-10 puan alanlarda %2.6

11-15 puan alanlarda %3.9

16-18 puan alanlarda %45

19-21 puan alanlarda %60

22-23 puan alanlarda %50 bildirilmiştir (52).

Fenotipik kriter listesi gelişim geriliği olan bireylerin FXS tanısı için moleküler testlere uygun adayları tespit etmek amacıyla kurulmuştur (76). Aşağıdaki fenotipik kriter listesi

Maes ve arkadaşları (Tablo 2.5) tarafından nedeni bilinmeye gelişimsel gecikmeler olan her yaştaki erkekte kullanılabilecek olan bir skorlama sistemi hazırlamışlardır (81).

Tablo 2.5. FXS Fenotipik Tarama Listesi (Maes ve arkadaşları-2000) (81)

FENOTİPİK KRİTERLER	EVET	HAYIR	PUAN
Dar Ve Uzun Yüz			
Geniş Alın			
Belirgin Alt Çene			
Büyük Çıkıntılı Kulaklar			
Makroorşitizm (Büyük Testis)			
Parmak Eklemlerinde Hiperextensible			
Diğer Eklemlerde Hiperextensible			
Hiperaktivite			
Duyulara Aşırı Duyarlılık			
Dürtüsellik (İmpulsivite)			
Düzensiz Olmak (Being Chaotic)			
Utangaçlık/Çekingenlik			
Fazla Yardımsever Olmak (Being Too Helpful)			
Yakınlaşma-Uzak Durma Uyuşmazlığı			
Korkaklık			
Eğlenceli, Neşelilik			
Değişikliklere/Değişimlere Aşırı Duyarlılık			
El Isırma			
Stereotipik El Hareketleri			
El Ve Kolları Çırpmak/Sallamak			
Göz Temasından Kaçınma			
Yüzünü Çevirme			
Dokunulmaya Karşı Aşırı Savunucu/Savunan			
Seri Ve Hızlı Şekilde Konuşma			
Konuşkan Olmak			
Bir Şeyi Surekli Tekrarlayıp Durma (Perseverasyon)			
Anlamsız Şekilde Söylenen Sözleri Aynen Tekrarlaması (Ekolali/ Echolalia)			
Kendi Dilinde Taklit Etmesi			

Listedeki kriterlere uygun olarak "EVET" veya "HAYIR" olarak cevaplandırılmalı, her "evet" 1 puana her "hayır" 0 puana denk gelmektedir. FXS düşünülmesi için referansta en az 17 puan tevsiye edilir, 26 ve daha yüksek puanda kesin düşünülmesi

gerektiğini gösterir. Bu FXS'nda tek tip veya ayırt edici olmadığı kabul edilmelidir. Listedeki kriterler erken çocukluk döneminde tanımlanmayabilir ve zamanla ortaya çıkabilir (81).

Bu tarama listeleri biraz tanısal verimi arttıranılır ama bazı çocukların belirgin fiziksel özellikler sahip olmayabilir ancak gelişme geriliği, mental retardasyon veya otistik olan tüm çocukların bu testin uygulanması FXS için %1-2 tanı verimini arttırabilir (76).

Hareket bozuklukları, öğrenme güçlüğü, zeka geriliği veya primer over yetmezliği gibi probanda sahip ailelerde *FMR1* mutasyonunun mevcudiyetinin olması şüphesini arttırmaktadır. Bu öneride aile öyküsü anketi yapılmalıdır (76,82) (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. FXS için önerilen ve hedeflenen aile anketi (McConkie-Rosell ve arkadaşları-2005)(82).

1-Kavrama İle İlgili Özellikler **Zeka geriliği, gelişme geriliği, öğrenme güçlülüğü, matematik ile ilgili özel problemler**
2-Konuşma gecikmesi veya olağan dışı konuşma deseni/modeli
3-Otistik spektrum bozuklukları veya otistik benzeri davranışlar (Kaçınma, el çırpma, tekrarlayıcı davranışlar, el ısırma, dokunmalardan kaçma)
4- Dikkat eksikliği bozukluğu veya dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu
5- Dismorfik Özellikler **Makrosefali, büyük kulaklar, uzun yüz, geniş alın, belirgin çene ve şaşılık**
6- Gevşek Bağ Dokusu Özellikleri **Hiperextansiyon eklemler, düz ayak, hipotoni, mitral kapak prolapsusu, büyük testisler, fıtıklar, tekrarlayan kulak enfeksiyonları**
7-Nörolojik Semptomlar **Nöbetler, geç başlangıçlı ilerleyici titremeler, ataksi, yürümede zorluk, denge sorunları, kısa süreli hafıza kaybı, bacaklarda duyu kaybı**
8- Akıl Hastalığı / Kişilik Bozuklukları **Depresyon, şizofreni, bipolar bozukluk, obsesif-kompülsif bozukluk, şizoaffektif bozukluk, şizoid kişilik**
9-Davranış Problemleri **Dürtüsellik, öfke patlamaları, şiddet davranışları, soliter davranış, davranışsal sorunlar için ilaç kullanımı veya psikolojik danışmanlık almaları**
10-Utangaçlık, sosyal anksiyet, aşırı endişe, duygusal sıkıntılar için ilaç kullanımı veya danışmanlık almaları
11- Erken menopoz, fertilite (üreme) sorunları

Bu anket FXS, tansı doğrulanmış ailelerin durumlarında ve taşıyıcılığı bilinen veya taşıyıcı riski olan gibi şüpheli durumlarda kullanım için uygundur. Her bir aile üyesi için başlama yaşı ve tarihler dikkat edilmelidir (82).

2.3. FRAJİL X SENDROMUNUN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Verkerk ve arkadaşları 1991 yılında İlk kez FXS' una neden olan genin cDNA pozisyonel kolanlama ile yerini tespit ederek Frajil X Mental Retardasyon 1 (*FMR1*) geni olarak adlandırmışlardır (2). Eichler ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada *FMR1* geninin toplam 38 kb'lık 17 ekzondan oluştuğunu gösterdiler (53).

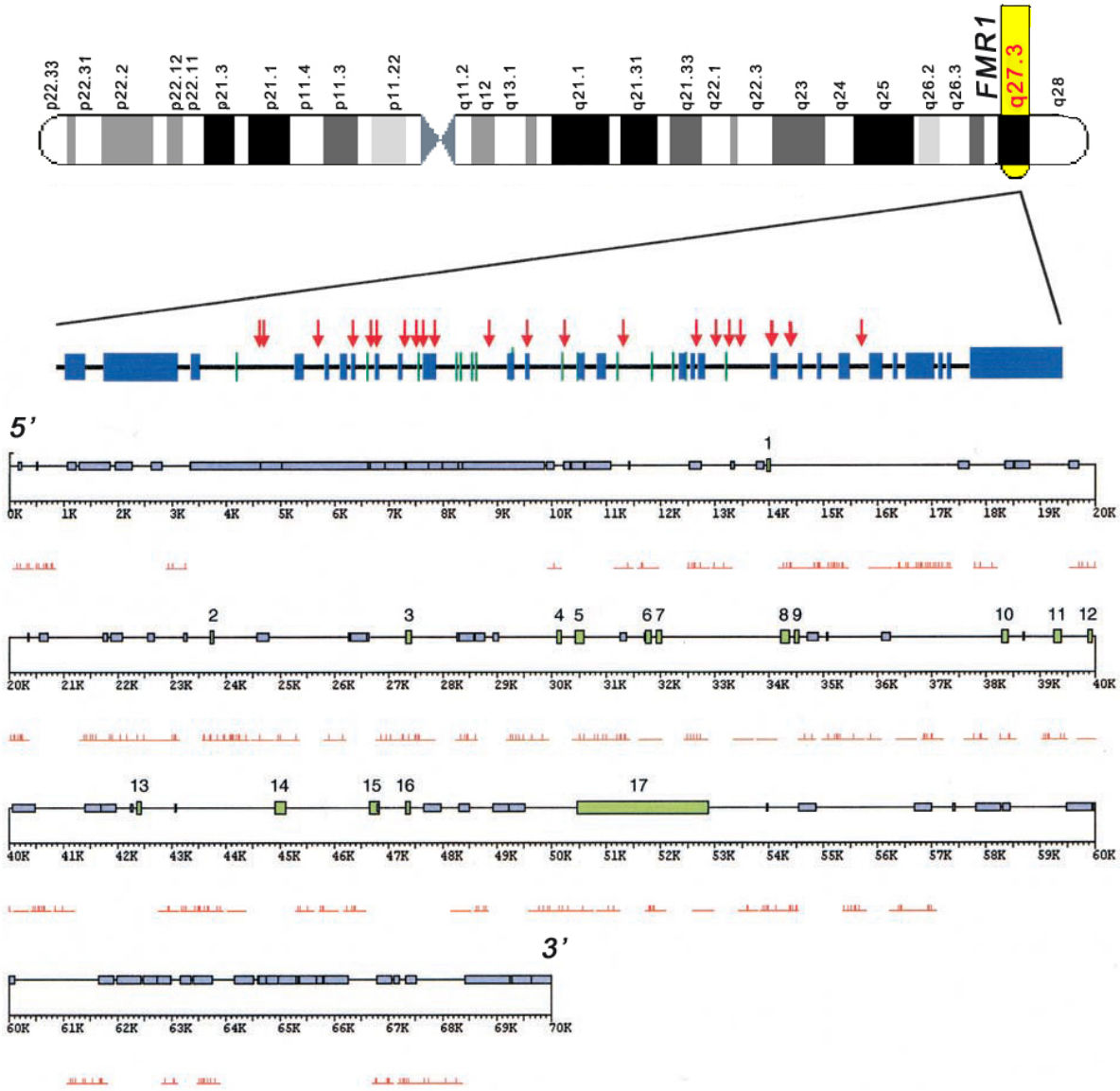
2.3.1. Frajil X Mental Retardasyon 1(*FMR1*) Geni

FMR1 geni (OMIM 309550) 17 ekzonlu 38 kb büyüklüğünde Xq27.3 bölgesine yerleşmiş bir gendir (53, 54, 55) (Şekil 2.1) (56).

CGG tekrar bölgesi, genin 1. ekzonu içinde ve CpG adasının 250 bp aşağısındadır. Bu bölge FXS'lularda anormal olarak metillenmiş olup *FMR1* geninin promotörü olarak görev yapmaktadır (1, 53). *FMR1* geni CpG adasının metilasyonu, geninin aktive olmasına neden olmaktadır (57). Genel olarak DNA metilasyonu, X inaktivasyonu ve farklılaşmada rol oynamaktadır (58, 59, 60).

FMR1 'de dikkate değer bir çok özellik vardır. Çoğunlukla CGG içeren değişik sayıdaki trinükleotid tekrarları 5' uca yakın başlar. Bu tekrar bölgesinin genişlemiş hali etkilenmiş erkek ve kadınlarda bulunur. Translasyonun başladığı bölge CGG tekrar bölgesinin 69 bp aşağısında yer alır.

FMR1 geninin çok sayıda türün yapısında, yüksek düzeyde korunduğu bulunmuştur. İnsan cDNA'sı, solucan *(Caenorhabditis elegans),* maya *(Saccharomyces cerevisiae),* tavuk, tavşan, hamster, sığır, domuz, maymun, goril ve şempanzelerden elde edilen genomik DNA'lar ile hibridizasyon göstermektedir. *FMR1* geni, sitoplazma ve nükleus arasında harekete karıştığı belirlenen nüklear translokasyon sinyali için bir konsensüs dizisine (KKXK) sahiptir (61).

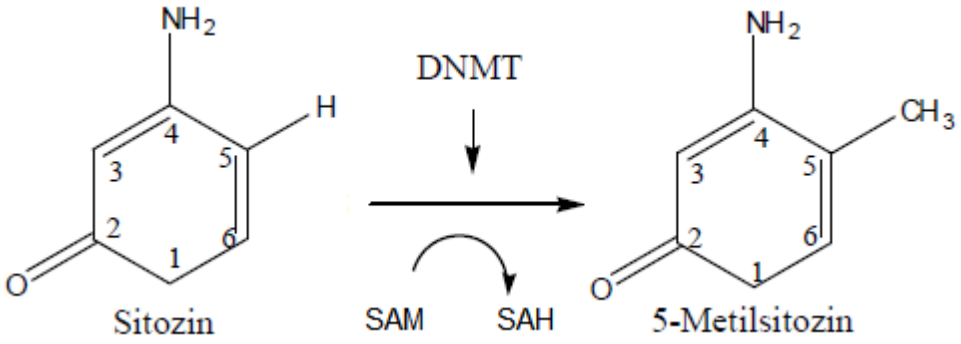


Şekil 2.1. FMR1 geni ve bölgesinin genomik yapısı (56).

FMR1 geninde SP1, AP-2α, α-Pal/Nrf1, USF1/2 gibi bazı transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri tanımlanmıştır. Bu bölgeler *FMR1* transkripsiyonunun aktivasyonu için önemlidir. *FMR1* promotoruna NF1, Max gibi *silencer* elementler de bağlanır. USF1/2'in *FMR1* transkripsiyonunda aktivatör ya da baskılayıcı rol oynayabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (62).

2.3.2. Frajil X Sendromunda DNA Metilasyonun Önemi

DNA metilasyonu memeli genomunda meydana gelen epigenetik olaylarının en yaygınıdır (63). İlk olarak 1948 yılında tanımlanmıştır. Transkripsiyonel kontrolün önemli bir mekanizmasıdır (64). DNA metillenmesi, enzimatik bir değişim olup sitozinlerin 5'-metil sitozine dönüşmesidir (65). Yani DNA metilasyonu; S-adenozil metiyonindeki (SAM), Metil grubunun, guaninden (G) önce yerleşmiş sitozine (C) transferi ile katalizlenir ve 5-metil sitozin (5mC) oluşur (66, 67, 68, 69) (Şekil 2.2) (64). 5mC; A, T, G, C'den sonra beşinci baz olarak adlandırılmaktadır (71). 5mC oluşumu kovalent kimyasal bir modifikasyondur (64,70).

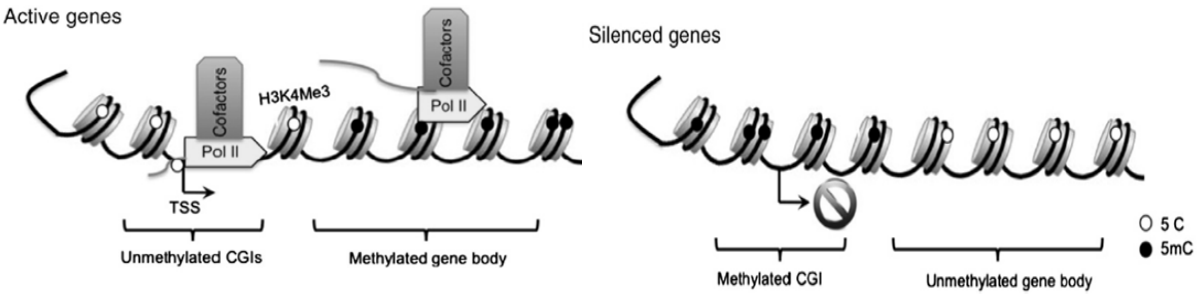


Şekil 2.2. *DNA metilasyon mekanizması.* Sitozinin karbon-5 pozisyonuna SAM'daki bir metil grubunun (CH3) transferini katalize eden DNA metiltransferazların (*DNMT1*) etkisi ile 5-metilsitozin meydana gelir (64).

DNA metilasyonu esas olarak CpG ikili nükleotidleri olarak da isimlendirilen 5'-CG-3' dinükleotid bölgelerinde yerleşmiş olan Sitozin rezidülerinde meydana gelir. CpG dinükleotidleri genomda istatistiksel olarak az sayıda bulunmakla birlikte, CpG adaları olarak adlandırılan sıklıkla promotör veya gen regülatör bölgelerde bulunan C+G'den zengin bölgelerde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte CpG dinükleotidlerinin tek tek olanlarının çoğu, özellikle tekrar dizileri ve transposable elementlerin içinde olmak üzere DNA'nın intergenik veya intronik bölgelerinde bulunur. İnsanda normal somatik hücrelerde CpG dinükleotidlerin %69- 90'ı metiledir (68). CpG adacıkları fonksiyonel genlerin 5' ucuna lokalizedir (64). Sitozin metilasyonu tek haldeki nükleozomları daha kondanse hale getirebilen dinamik süreçte kromatin değişimleri yaparak gen regülasyonunda önemli bir rol alır. DNA metilasyonu kromatini sıkıştırarak gen

ekspresyonunu baskılayabilir. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının metile olmayışı geni aktif kılarken, metile oluşu geni sesizleştirir (Şekil 2. 3) (72).

FXS'da *FMR1* genin 5' düzenleyici kısmı CpG adacığı içerir ve bu CpG adacıkları metillendiği zaman *FMR1* genini susturur. *FMR1* geninin 5' düzenleyici kısmında bulunan CGG üçlü tekrarleri ve CpG adacıkları içeren baz dizileri aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.3: Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının unmetile oluşu geni aktif kılarken, metile oluşu geni sesizleştirir (63).

>chromosome:GRCh37:X:146992869:147033245:1

146992869 tggtgagagagggcgtagacgcctcaccttctgcctctacgggtcacaaaagcctgggtc 146992928

146992929 accctggttgccactgttcctagttcaaagtcttcttctgtctaatccttcacccctatt 146992988

146992989 ctcgccttccactccacctcccgctcagtcagactgcgctactttgaaccggaccaaacc 146993048

146993049 AAACCAAACCAAACCAAACCAAACCAGACCAGACACCCCCTCCCGCGGAATCCCAGAGAG 146993108

146993109 GCCGAACTGGGATAACCGGATGCATTTGATTTCCCACGCCACTGAGTGCACCTCTGCAGA 146993168

146993169 AATGGGCGTTCTGGCCCTCGCGAGGCAGTGCGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCCCGC 146993228

146993229 CCTCCACCAAGCCCGCGCACGCCCGGCCCGCGCGTCTGTCTTTCGACCCGGCACCCCGGC 146993288

146993289 CGGTTCCCAGCAGCGCGCATGCGCGCGCTCCCAGGCCACTTGAAGAGAGAGGGCGGGGCC 146993348

146993349 GAGGGGCTGAGCCCGCGGGGGGAGGGAACAGCGTTGATCACGTGACGTGGTTTCAGTGTT 146993408

146993409 TACACCCGCAGCGGGCCGGGGGTTCGGCCTCAGTCAGGCGCTCAGCTCCGTTTCGGTTTC 146993468

146993469 ACTTCCGGTGGAGGGCCGCCTCTGAGCGGGCGGCGGGCCGACGGCGAGCGCGGGCGGCG 146993528

146993529 CGGTGACGGAGGCGCCGCTGCCAGGGGGCGTGCGGCAGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGCG 146993588

146993589 GCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGGCCTCGAGCGCCCGCA 146993648

146993649 gcccacctctcgggggcgggctcccggcgctagcagggctgaagagaagatggaggagct 146993708

146993709 ggtggtggaagtgcggggctccaatggcgctttctacaaggtacttggctctagggcagg 146993768

Turkuaz metin vurgusuyla boyanan kısım CGG tekrarı genişleme bölgesini, Sarı metin vurgusuyla boyanan kısım CG harfleri genin 5' kısmında bulunan metilasyon hedef bazı olan CpG adaları (13, 2, 53).

FMR1 geni metilasyonu, doğrudan ya da dolaylı olarak gen aktivasyonunu baskılar. Doğrudan yolda, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önler, dolaylı yolda ise kromatin kondensasyonunun uyarılmasını sağlayarak transkripsiyon düzeneğinin bağlanmasını önler.

FXS'nun patogenezinde, *FMR1* promotöründeki hipermetilasyonunun kritik rolünü belirlemek amacıyla, erkek frajil X hastaları, lenfoblastoid hücre dizilerinde *in vitro* bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 5-azadeoksisitidin (5-azadC) kullanılarak hipermetillenmiş *FMR1* gen bölgesi demetile edilerek yeniden aktive edilmiş ve spesifik mRNA ve protein ürünü gösterilmiştir. Ayrıca promotörün demetile olup olmadığı metilasyona duyarlı enzimler ile yapılan restriksiyon analizi ile de belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, full mutasyonlu fakat metillenmemiş *FMR1* genine sahip IQ düzeyleri normal olan erkekler için de önemli bir açıklama getirmiştir (74).

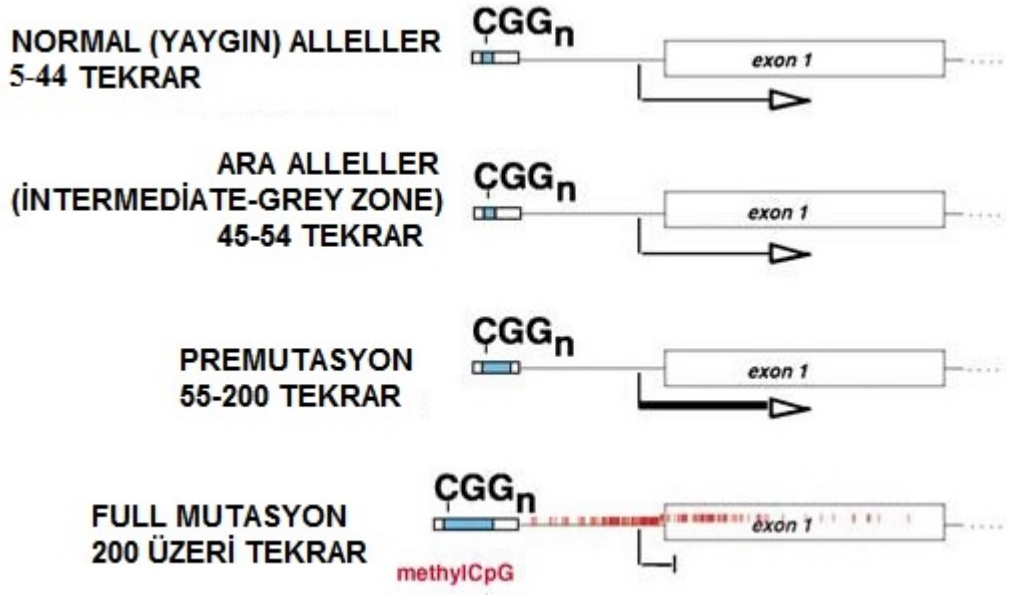
2.3.3. Frajil X Sendromundaki Mutasyonlar

2.3.3.1. Frajil X Sendromundaki Mutasyon Tipleri

1991 'de FXS'na yol açan mutasyon belirlenip, gen izole edildikten sonra vakalar üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda, %95'den fazlasında *FMR1* geninin 5' ucu transle edilmeyen bölgesinde kararsız CGG trinükleotid tekrarı dizi mutasyonu olduğu bulunmuştur (1, 2). Daha sonraki araştırmalara göre ise CGG trinükleotid tekrarına dayalı olan FXS tipi tüm FXS'lu vakaların %98 -%99'nu oluşturduğunu ve geriye kalan %2-%1'lik kısmının ise delesyon ve nokta mutasyonların oluşturduğu bildirilmiştir (8, 9, 10,75).

2.3.3.1.1. *FMR1* Genindeki CGG Trinükleotid Mutasyonları

Frajil X trinükleotid tekrarları ile oluşan bozuklukların içinde bilinen ilk örneğidir. *FMR1* geninin 5' UTR (transle olmayan bölgesi)' deki CGG dizi tekrarlarının, ACMG (Amerikan Koleji Tıbbi Genetik ve Genomik Birimi) standart yönergelerine göre dört alellik formu vardır. Bunlar normal (yaygın alel), intermedit (intermediate-ara alel-grey zone), premutasyon ve full mutasyon şeklindedir (Şekil 2. 4) (76, 77).



Şekil 2.4. İnsanlardaki FMR1 genin dört alellik formunun sınıflandırılması. Her bir alel için FMR1 genin 5' UTR deki CGG tekrar büyüklüğü mavi renkte gösterilmiştir. Transkripsiyon düzeyi her bir alel için şekildeki okun genişliği ile gösterilmiştir. Kırmızı karma işaretleri ile belirtildiği gibi tam mutasyonlar hipermetile ve transkripsiyoneli susturulmuştur oysa artan transkripsiyon mutasyon alel ile ilişkilidir. ACMG tanımına karşın tek bir jenerasyonda tam mutasyon genişlemesi için bilinen en küçük premutasyon aleli 59 tekrarlıdır. (76)

2.3.3.1.1.1. Normal (Yaygın) Aleller

Normal alellerin aralığı ~5 - ~44 tekrardan oluşur. En sık görülen tekrar uzunluğu 29 ve 30 CGG tekrarlarıdır. Normal alellerin mayotik ve mitotik instabilitesi yoktur. Normal alellerde stabil CGG bölgesi her 9 veya 10 CGG tekrarlardan sonra AGG üçlüsü ile kesintiye uğrar. AGG üçlüsü bölgeye bağlanarak replikasyon esnasında zincirin

kaymasını önlediği düşünülmektedir. AGG üçlüsü için doğrudan test mevcut iken, rutinde klinik yararına doğru olduğu henüz belirlenmemiştir (77).

2.3.3.1.1.2. Ara Aleller (intermediate- sınır-grey zone)

Ara alellerin (intermediate-sınır-grey zone) aralığı ~45 - ~54 tekrardan oluşur. Bu aralıktaki aleller FXS ile bağlantısı yoktur, bir jeneresyona aktarılırken full mutasyon genişlemesi göstermemiştir ve normal olarak kabul edilir (77). Önceki çalışmalarda bu aralık Frajil X'e bağlı primer over yetmezliği (FXPOI) ile bir ilişki olduğunu önerilmesine rağmen bir sonraki daha kapsamlı çalışmalarda bu önermeye destek bulunamadı (78, 79). Bu boyutttaki alellerin bir sonraki nesile aktarılırken tekrar sayısında küçük artış ve azalmalar oluşabilir ancak FXS'lu bir çocuk olma riski yoktur. Ama bu boyuttaki alellere sahip bireyin uzak akrabaların ve ya gelecek nesillerin FXS ile ilişkisi olabilir. Bu aralıktaki alellerin mutasyon olabilmesi için aile çalışması ile teyit edilerek premutasyon olarak ifade edilebilir (77). 52 tekrarlı grey zone alelline sahip ve 56 tekrarlı premutasyon alellerine sahip bir jenerasyonun gelecek nesillere tekrarlarının genişlemesiyle full mutasyonlu alellere dönüştüğü bildirildi (80). Risk altında olan ara alelli (intermediate-sınır-grey zone) olan kişilerin akrabaları test yaptırarak ailedeki alel stabiletesini belirleyebilir. Ancak ara alellerin (intermediate-sınır-grey zone) genişleme oranı iyi anlaşılmış değildir (77).

2.3.3.1.1.3. Premutasyon

Premutasyon alellerin aralığı ~55 - ~200 tekrardan oluşur. Bu aleller stabil olmayan uzun tekrar halinde ebeveynden çocuklarına geçebilir. Premutasyon boyut aralığından full mutasyona genişlemesi/ekspansiyonu genellikle maternal tarafından geçiş gösterir (77). Full mutasyona ekspansiyon maternal mayoz veya erken embriyogenezis sırasında meydana gelir (94). Bir premutasyon tespit edildiğinde somatik mozaizim olma ihtimali nedeniyle full mutasyon aralığına dikkat edilmesi gerekiyor. *FMR1* alelleri premutasyon boyut aralığında ise FXS ile ilişkisi yoktur ve hipermetile değildir (77). Premutasyonlu kadın ve erkeklerin FXS'nun belirtilerini bildirilmesine rağmen daha ileri bir çalışmalara ihtiyaç vardır (83). Bu aralıkta alelleri olan kadınların etkilenmiş çocuk sahibi olmaları yönünden çok büyük risk altındadır (84, 85). Tek bir jenerasyonda full mutasyona genişlemiş en küçük *FMR1* premutasyon aleli 56 tekrardan

oluştuğu rapor edilmiştir (86). *FMR1* premutasyon taşıyan kadın tüm gebeliklerinde prenatal tanı yapılması önerilmelidir. Bilinen taşıyıcıların bütün aile üyeleri risk altında olabilir bu yüzden risk taşıyan kişilerin durumlarını belirlemek için test önerilmelidir.

Premutasyonun üst sınırı bazı zamanlar ~230 tekrar olduğu söyleniyor aslında her iki tekrarda (200 ve 230) normalden daha fazla üçlü tekrar ~170 - 200 ima edilir, büyük premutasyonlar 0,5-0,6 kb artış ile ölçülen Southern Blot ile elde edilen tahmini değerlerdir (77).

2.3.3.1.1.4. Full Mutasyon

Full mutasyon 200-230'dan fazla tekrarlardan, tipik olarak da birkaç yüzden birkaç bin tekrarlardan oluşur. Her hastanın içinde genellikle geniş somatik varyasyonlar vardır (77) ve anormal olarak yüksek düzeyde metillenmiştir. Bu nedenle mRNA oluşturamazlar (87, 88, 89). Full mutasyon oluşan bölgeler genomik instabilite bölgeleridir ve *FMR1* genini inaktive edebilir (90). Transkripsiyonu inaktive ettiği için mRNA ve proteinin azalmasına hatta üretilmemesine neden olur bu da mental retardasyona sebep olur (91).

2.3.3.1.1.5. Mozaisizm

De novo somatik mutasyonlar nedeniyle mozaisizm *FMR1* CGG tekrar bölgesinde oluşmaz ancak boyut/size mozaikleri ve metilasyon mozaikleri gözlenmiştir (92, 93). Mozaiklik olduğu zaman dokuya özgü farklılık görülebilir. Boyut/size veya metilasyon mozaisizm olan bireyler full mutasyonlu tam metile olan bireylerden daha yüksek fonksiyonel olabilir (77).

2.3.3.1.1.5.1. Size/Boyut Mozaisizm

Bu terim, bazı hücreler full mutasyonlu olup metillenmiş, bazı hücreler ise premutasyonlu olup metillenmemiş alt populasyonlu bireyler için kullanılır. Bazen normale yakın ya da normal uzunluktaki küçük subpopulasyonda olabilir. Bu nedenle normal ve gri bölge/grey zone aleller standart PCR yöntemi kullanılarak tespit edildiğinde, daha büyük alelleri incelemek için dikkat edilmelidir (77).

2.3.3.1.1.5.2. Metilasyon Mozaisizm

Bu terim, full mutasyon boyut aralığındaki bir *FMR1* alel ile metillenmemiş full mutasyon ve metillenmiş full mutasyon içeren hücreleri ihtiva eden subpopulasyonlu bireyler için kullanılır (77). Bu mutasyon tipi oldukça nadirdir. Genelde full mutasyon düzeyinde CGG tekrar sayısına sahip olmaktadır. Bu olgularda gende metillenme olmadığından yüksek fonksiyonlu erkekler adı verilmiştir. Bu durum full mutasyona rağmen *FMR1* in proteininin ekspresyonunu açıklamaktadır. FXS mutasyonel homojenite gösterir.

2.3.3.1.2. *FMR1* Genindeki Delesyon ve Nokta Mutasyonları

FXS tüm vakaların %1-2'sini *FMR1* genindeki delesyonlar ve nokta mutasyonları oluşturur. *FMR1* geninde delesyon sonucu ortaya çıkan birkaç vaka belirlenmiştir (95, 96, 97, 98, 99, 100).

Genin fonksiyonel domaininde oluşan nokta mutasyonlar *FMR1* genin fonksiyon kaybına neden olmakta buda FXS fenotipi oluşumu için yeterlidir (9).

2010 yılına kadar rapor edilmiş *FMR1* geninde sadece 4 nokta mutasyonu bildirilmiştir; bunlar p.Ile304Asn olan missens mutasyon, 5. ekzon üzerinde 1 bp (baz çiftlik) c.373delA delesyon olmasıyla çerçeve kayma muatsyonuna neden olup proteinin erken sonlanmasına sebep olmuştur, 2. ekzonun ekzon/intron sınırlarında 2 bp'lık değişim g.23714GG>TA olmuştur ve p.Arg138Gln olan missens mutasyon (9, 102, 104).

2011 yılında ki bir çalışmada klasik FXS semptomları gösteren 35 yaşında ki bir erkek bireyde CGG tekrar sayısına bakılmış ve 29 tekrar çıkmış bunun üzerine annenin de CGG tekrar sayısına bakılmış 29 ve 33 tekrar çıkmış ve erkek bireyde FMRP antibadi çalışılarak FMRP proteinin eksprese olmadığını görmüşler ve *FMR1* genini sekanslayarak genin 2. ekzonunda c.80C>A bir değişim olduğunu buda stop kodunu oluşturduğundan p.Ser27X istenilen protein oluşmadığını bununda bir nonses mutasyon olduğunu rapor etmişlerdir (105).

Başka bir vakada annenin perifer kanından elde edilen DNA da delesyon olmadığı halde FXS iki oğlunun *FMR1* geninde delesyon bulunmuştur. Annede postzigotik olarak

ortaya çıkan bu delesyon için annenin germinal mozaik olduğu belirlenmiştir. Bu durumdaki aileler için danışmalık verilirken çok dikkat edilmesi gerekir (103).

2.3.4. Triplet Tekrar Ekspansiyonun/Genişlemenin Oluşum/Moleküler Mekanizmaları

Ekspansiyon/genişleme genel olarak tekrarlayan üniteler içinde kararsız geçiş işlemi olarak tanımlanmakta olup, zamanımızın insan hastalıklarında önemli bir mekanizma olarak gösterilmektedir (106, 107, 108).

Frajil X DNA'sında triplet tekrarının [$(GGC)_n$,$(GCC)_n$, $(CGG)_n$], çok fazla ekspansiyonu ve hipermetilasyonu için bir model, G (guanin) ve C (sitozin)'ce zengin tek zincirli DNA'nın "hairpin" (saç tokası) yapısı oluşturmasıdır. "Hairpinler", replikasyon sırasında "leading" zincir sentezlenirken ekspansiyonlara veya "lagging" zincirde delesyonlara neden olabilir. Sonra DNA polimeraz tekrar üzerinde kaymaya veya duraklamaya başlar ve sürekli ekspansiyonlar oluşur. Bu olay ya sperm ve yumurta oluşumunu sağlayan mayoz bölünme sırasında ya da erken embriyonun somatik hücrelerinin hızlı bölünmesi sırasında meydana gelebilir (109).

Nükleer magnetik rezonans (NMR) ve iki boyutlu gel elektroforezi çalışmalan sonucunda, fizyolojik şartlar altında hairpin formu G ve C'ce zengin her iki zincirde de görülmüştür. Ancak hairpin yapısının, G'ce zengin zincirden daha çok C'ce zengin zincirde olduğu belirlenmiştir. "Hairpin" yapıda kayma daha olasıdır ve replikasyon sırasında asimetrik zincir ekspansiyonu görülür. Aynı zamanda NMR verileri, hairpinlerin C'ce zengin zincirlerin katlanmasıyla oluştuğunu göstermiştir ve bu yolla CpG bölgesindeki sitozinler C-C çifti oluşturmaktadır. CpG bölgesinde C-C yanlış eşleşmeleri lokal esneklik oluşturur. O nedenle C'ce zengin hairpinler insan metil transferazı için çok iyi substrattır. Bundan dolayı hairpin yapısı, frajil X tekrarı içinde CpG adasının spesifik metilasyonundan sorumludur. Bu durumda *FMR1* geni inaktive olur ve sendrom ortaya çıkar (108).

"Hairpinler", frajil X sendromu ile ilişkili üç büyük olay için yapısal temel oluştururlar.

- Site-spesifik (bölgeye-özgü) frajilite
- Özellikle C'ce zengin zincir bölgesinin ekspansiyonunun tercih edilmesi
- *FMR1*'e bitişik CpG adasının hipermetilasyonu (110)

Günümüzde, iki büyük tip ekspansiyon karakterize edilmiştir.

- Tip 1 (Genellikle 10 tekrardan büyüktür): Kararsız geçiş büyük artış şeklinde olur.
- Tip 2 (Genellikle 4 tekrardan küçüktür): En küçük değişimin olduğu sınıftır. Bunun sıklığı insersiyon ve delesyon mutasyonlarının sıklığına yakındır.

Tip 1 değişimleri FXS ve buna benzer triplet tekrar hastalıkları (Tablo 2. 7) (111), (Şekil 2. 5) (117) ile ilişkilidir (108).

FMR1 geni CGG tekrarları içinde yer yer AGG trinükleotidler vardır. *FMRl* (CGG)n tekrarındaki kararsızlığın AGG kayıplarından meydana geldiği öne sürülmüştür (112, 113).

Normal populasyonda AGG sayısını belirlemek amacıyla FRAXA içindeki haplotip markırları (FRAXCı, FRAXC2 ve DXS548 markırlan kullanılmış) karşılaştınlarak yapılan dizi analizi çalışmasında AGG diziliminin $(CGG)_{10}AGG(CGG)_9AGG(CGG)_9$ şeklinde olduğu belirlenmiştir. Buna göre her CGG'de bir AGG vardır. Bu da 29-30 CGG tekrarına karşılık gelmektedir (55, 113).

Araştırıcılar bu verilere dayanarak frajil X full mutasyonunun 4 safha sonucunda oluştuğunu öne sürmüşlerdir (112):

I. Ara alel uzunluğuna sahip olan (45-54 tekrar) ancak bir AGG trinükleotit veya hiç içermeyen aleller meyilli (predispozan) alellerdir.
II. predispozan aleller derece derece kayarak küçük premutasyonlara (small/S alellere) dönüşür.
III. S alellerden büyük premutasyonlara (Z alellere) dönüşür.

IV. Z alellerden full mutasyona (L aleller) dönüşerek büyük ekspansiyon meydana gelir.

AGG triplet kaybının replikasyon sırasındaki kayma sonucu oluşan delesyondan dolayı meydana geldiği ve bu kaybın DNA sentezi sırasında geciken (lagging) zincirde meydana geldiği öne sürülmektedir (114). *FMR1* geni CGG tekrar bölgesi içinde dağılmış olan AGG'ler diziyi sağlamlaştırarak replikasyon sırasında kaymayı önler (115).

AGG varyasyonlarını tayin için yapılan bir çalışmada, 133 normal kontrol grubunun AGG pozisyonları % 91 heterozigozite ile oldukça polimorfiktir.

Kontrollerin
%1,5'in de AGG dizisi yoktu
%25'in de 1 tane AGG dizisi
%71'in de 2 tane AGG dizisi
%3'ün de 3 tane AGG dizisi vardı.

Frajil X premutasyon örneklerinin %63'ünde AGG dizisi yokken %37'sinde 1 tane AGG dizisi vardı (54, 116).

Tekrar uzunluğunun ani ekspansiyonunu açıklamak için olası bir model de Okazaki fragmentlerindeki kaymadır. Bu modele göre tekrarlayan dizilerin replikasyonu sırasında polimerazın kayması triplet tekrar artışına sebep olmaktadır (116).

Gen amplifikasyon mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir. DNA polimeraz GC' ce zengin tekrarlayan dizilerin replikasyonunda zorlanmaktadır.

Tablo 2.7. Kararsız tekrar ekspansiyon/genişleme gösteren triplet tekrar hastalıkların moleküler ve klinik özellikleri (111)

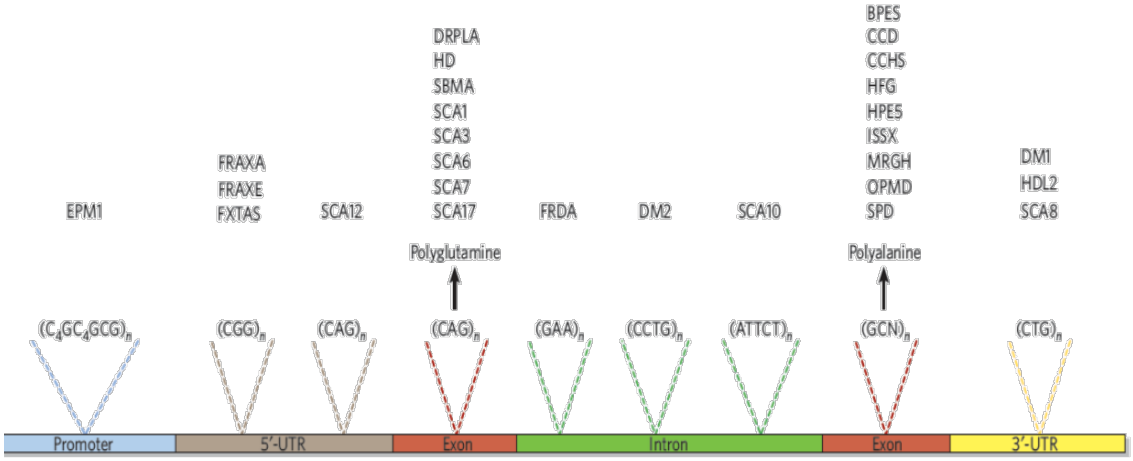
Hastalık	Kalıtılım Şekli	OMIM numarası	Mutasyon /tekrar dizisi	Genin İsmi (protein ürünü)	Genin Fonksiyonu	Normal tekrar boyutu	Patojenik Tekrar boyutu	Başlıca Klinik Özellikleri
Protein Fonksiyonunun Kaybına Neden Olan Hastalıklar								
FRDA	OR	229300	$(GAA)_n$	*FRDA* (frataxin)	Mitokondriyal demir metabolizması	6-32	200-1700	Duyu ataksi, Kardiyomiyopati, Diyabet,
FRAXA	X'e Bağlı	309550	$(CGG)_n$	*FMR1* (FMRP)	Translasyon regülasyonunda	6-44	>200 (full mutasyon)	Mental retardasyon, Makroorsidizim, Bağ dokusu displazi, Dikkat ve davranış bozuklukları
FRAXE	X'e Bağlı	309548	$(CCG)_n$	*FMR2* (FMR2)	Trasnkripsiyon ?	4-39	200-900	Hafif zeka geriliği, Öğrenme bozukluğu
Protein Fonksiyonunun Değişmesine Neden Olan Hastalıklar								
SCA1	OD	164400	$(CAG)_n$	SCA1 (ataxin 1)	Transkripsiyon	6-39	40-82	Ataksi, Konuşma bozukluğu, Spastisite, Bilişsel bozukluk
SCA2	OD	183090	$(CAG)_n$	SCA2 (ataxin 2)	RNA metabolizması	15-24	32-200	Ataksi, yavaş göz hareketleri, Refleks azalması, Polinöropati, Motor nöropati,Bebeksi varyant
SCA3/MJD	OD	109150	$(CAG)_n$	SCA3 (ataxin 3)	Ubiqutinasyon aktivitesini düşürme	13-36	61-84	Ataksi, Parkinson, Şiddetli spastisite
SCA6	OD	183086	$(CAG)_n$	*CACNA1A* ($CACNA1_A$)	P/Q tipi α1A kalsiyum kanalının alt ünitesi	4-20	20-29	Ataksi, Dizartri, Nistagmus, Titreme/tremor
SCA7	OD	164500	$(CAG)_n$	*SCA7* (ataxin 7)	Transkripsiyon	4-35	37-306	Ataksi, Retina dejenerasyonu, Bebeksi varyany ile kalp tutulumu
SCA17	OD	607136	$(CAG)_n$	*SCA17* (TBP)	Transkripsiyon	25-42	47-63	Ataksi, Davranış değişiklikleri veya psikoz Zihinsel bozulma, nöbetler
DRPLA	OD	125370	$(CAG)_n$	*DRPLA* (atophin 1)	Transkripsiyon	7-34	49-88	Ataksi, Epilepsi, Koreoatetozis,Bunama
SBMA	X'e Bağlı	313200	$(CAG)_n$	*AR* (androjen reseptörü)	Steroid hormon reseptörü			Motor güçsüzlüğü, Yutma güçlüğü, Jinekomasti,Hipogonadizm
HD	OD	143100	$(CAG)_n$	*HD* (huntingtin)	Sinyal iletimi, transport, transkripsiyon	11-34	40-121	Şiddetli hareket anormallikleri, Kore, Distoni, Bilişsel gerileme, Psikiyatrik özellikler

CACNA1A, calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, α1A subunit; ***DMPK,*** dystrophia myotonica protein kinase; **DRPLA**, dentatorubral-pallidoluysian atrophy; **DM**, dystrophia myotonica; **ER**, endoplasmic reticulum; **FRDA**, Friedreich ataxia; **FMRP**, fragile X mental retardation protein; ***FMR1***, fragile X mental retardation 1; ***FMR2***, fragile X mental retardation 2; **FXTAS**, fragile X tremor/ataxia syndrome; **HD**, Huntington disease; **HDL2**, Huntington disease-like 2; **MJD**, Machado–Joseph disease; **PM**, plasma membrane; ***PPP2R2B***, protein phosphatase 2 (formerly 2A) regulatory subunit B; **SBMA**, spinal and bulbar muscular atrophy; **SCA**, spinocerebellar ataxia; **TBP**, TATA box binding protein; ***ZNF9***, zinc-finger protein 9.

Tablo 2.7'nin devamı: Kararsız tekrar ekspansiyon/genişleme gösteren triplet tekrar hastalıkların moleküler ve klinik özellikleri (111)

Hastalık	Kalıtılım Şekli	OMIM numarası	Mutasyon /tekrar dizisi	Genin İsmi (protein ürünü)	Genin Fonksiyonu	Normal tekrar boyutu	Patojenik Tekrar boyutu	Başlıca Klinik Özellikleri
RNA Fonksiyonunun Değişmesine Neden Olan Hastalıklar								
DM1	OD	160900	$(CTG)_n$	*DMPK* (DMPK)	RNA-hücre aracılığı	5-37	50-1000	Miyotoni, Halsizlik, Erime, Kardiyak iletim anomalileri, Testiküler atrofi, İnsülin direnci, Katarak, Doğuştan olan form, Mental retardasyon ile potansiyel ciddi merkezi sinir sistemi tutulumu
DM2	OD	602668	$(CCTG)_n$	*ZNF9* (ZNF9)	RNA-hücre aracılığı	10-26	75-11000	DM1 hastalığına benzer, Doğuştan olan form değil
FXTAS	X'e Bağlı	309550	$(CGG)_n$	*FMR1* (FMRP)	RNA-hücre aracılığı	6-44	55-200	Tremor/ataksi, Parkinson, Bilişsel defekler
Patolojisi Mekanizmaları Bilinmeyen Hastalıklar								
SCA8	OD	608768	$(CTG)_n$	*SCA8* (trancribed/ untranslated)	Bilinmiyor	16-34	>74	Ataksi, Konuşma bozukluğu, Nistagmus
SCA10	OD	603516	$(ATTCT)_n$	Bilinmiyor	Bilinmiyor	10-20	500-4500	Ataksi, Nöbetler
SCA12	OD	604326	$(CAG)_n$	*PPP2R2B* (PPP2R2B)	Fosfotaz regülasyonunda	7-45	55-78	Titreme, Ataksi, Demans
HDL2	OD	606438	$(CTG)_n$	*JPH3* (junctophilin3)	PM/ER bağlantı proteini	7-28	66-78	HD hastalığına benzer

CACNA1A, calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, α1A subunit; ***DMPK***, dystrophia myotonica protein kinase; **DRPLA**, dentatorubral-pallidoluysian atrophy; **DM**, dystrophia myotonica; **ER**, endoplasmic reticulum; **FRDA**, Friedreich ataxia; **FMRP**, fragile X mental retardation protein; ***FMR1,*** fragile X mental retardation 1; ***FMR2***, fragile X mental retardation 2; **FXTAS**, fragile X tremor/ataxia syndrome; **HD**, Huntington disease; **HDL2**, Huntington disease-like 2; **MJD**, Machado–Joseph disease; **PM**, plasma membrane; ***PPP2R2B***, protein phosphatase 2 (formerly 2A) regulatory subunit B; **SBMA**, spinal and bulbar muscular atrophy; **SCA**, spinocerebellar ataxia; **TBP**, TATA box binding protein; ***ZNF9***, zinc-finger protein 9.



BPES, blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus; **CCD**, cleidocranial dysplasia; **CCHS**, congenital central hypoventilation syndrome; **DM**, myotonic dystrophy; **DRPLA**, dentatorubral-pallidoluysian atrophy; **EPM1**, progressive myoclonic epilepsy 1; **FRAXA**, fragile X syndrome; **FRAXE**, fragile X mental retardation associated with ***FRAXE*** site; **FRDA**, Friedreich's ataxia; **FXTAS**, fragile X tremor and ataxia syndrome; **HD**, Huntington's disease; **HDL2**, Huntington's-disease-like 2; **HFG**, hand–foot–genital syndrome; **HPE5**, holoprosencephaly 5; **ISSX**, X-linked infantile spasm syndrome; **MRGH**, mental retardation with isolated growth hormone deficiency; **OPMD**, oculopharyngeal muscular dystrophy; **SBMA**, spinal and bulbar muscular atrophy; **SCA**, spinocerebellar ataxia; **SPD**, synpolydactyly.

Şekil 2.5. İnsan hastalıklarından sorumlu genişleyebilen tekrarlarının konumu(117)

Tekrar artışların/genişlemelerin moleküler mekanizmaları için bir kaç model öne sürülmüştür.

I. Genişleyebilir tekrarlayan bölgelerde olağandışı DNA yapısının oluşması
   a. Haripin/ Saç tokası şeklindeki yapılar (Şekil 2. 6a).
   b. Quadruplex-like / dört katlı benzer- G quartert motif şeklindeki yapılar (Şekil 2. 6b).
   c. Saç tokası şeklinde kaymış iplik yapısı (Şekil 2. 6c).
   d. Negatif süpersarmal etkisi altında H-DNA yapısı (Şekil 2. 6d).
   e. H-DNA yapısında yapışkan DNA uçları nedeniyle oluşan birleşik tripleks yapı (Şekil 2. 6e).
   f. Klasik DNA zincir gevşeme yapısı (Şekil 2. 6f).

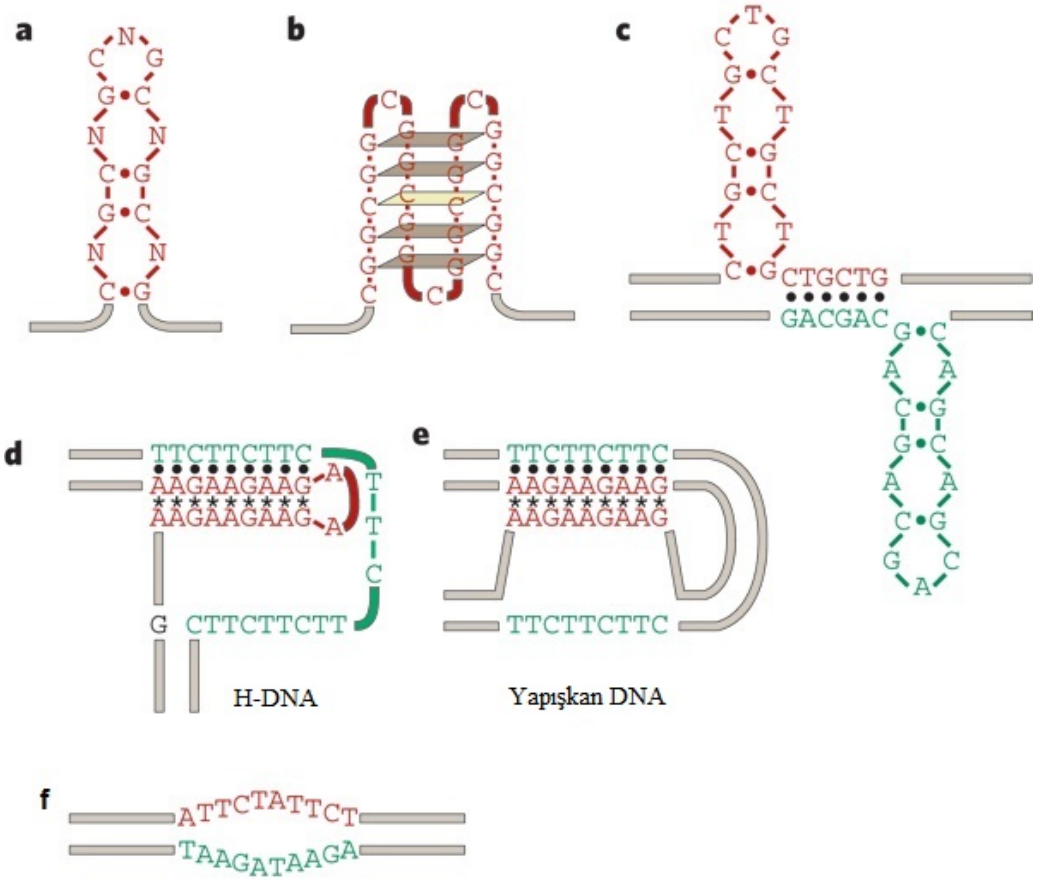
II. DNA replikasyon modelleri
    a. DNA çoğalma sırasında iki tekrarlı iplikler arasında yanlış hizalanma sonucu tekrarlayan bölgelerin dışarıya kayma gibi alışılmadık biçimlerin oluşması daha stabilizeye yol açmaktadır (Şekil 2. 7a).
    b. Replikasyon çatalı gecikmesinde tekrar instabilitinin yeniden çalışmasına dayalı model (Şekil 2. 7b).

III. DNA tamir modelleri
    a. Bölünme olmayan hücreler de tekrar artışlar/genişlemeler için boşluk tamir modeli (Şekil 2. 8).

IV. DNA rekombinasyon modelleri
    a. Eşit olamayan krossing-over modeli (Şekil 2. 9a).
    b. Stabil DNA yapısının kıvrılarak geciken ipliğe şablon görevi görerek bir istenmeyen invazyon oluşur buda tekrar bölgelerinin genişlemesine yada kısalmasına yol açar (Şekil 2. 9b).

V. İlk baştan beri düşünülen ilk model olan DNA zincir kayma modeli
    a. Bu kayma onarılmamış olsaydı dışa çıkmış eşleşmeyen bölge kayıp olacaktı ve replikasyon devam edecekti (Şekil 2. 10a).
    b. Bu kayma onarılıp dışarı çıkmış yapı yeniden kazandırılarak tekrar bölgelerin genişlemesine neden olur (Şekil 2. 10b).

Slipped strand mispairing (SSM) (kaymış zincir eşleşmesi) ve benzer DNA replikasyon hataları ve kardeş kromatidiler arasında eşit olmayan krossing-over gibi öne sürülen bu modellerdeki mekanizmalar tekrarlayan dizinin artmasına veya birkaç tekrarın azalmasına neden olur (117)

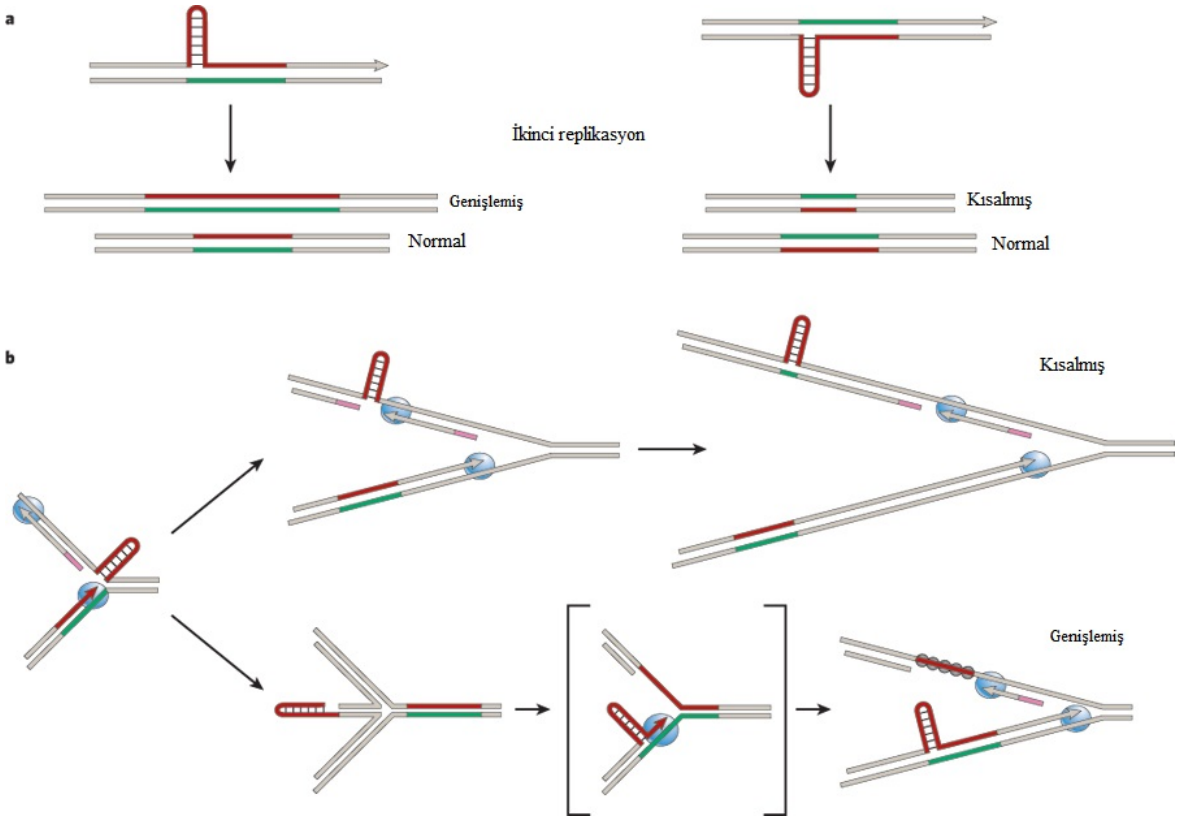


Şekil 2.6. Genişleyebilir tekrarlar için oluşturulan olağandışı DNA yapıları (117).

Kırmızı ile gösterilen iplikler genişleme eğilimini gösteren bölgelerdir, yeşil olan ise kırmızı ile gösterilen ipliklerin komplementeri **a)** $(CNG)_n$ tekrarlarından oluşan kusurlu saç tokası yapısı. **b)** $(CGG)_n$ tekrarlarından oluşan quadruplex-like yapı. Kahverengi yapılar G dörtlüsünü, sarı dikdörtgen bir İ motifi gösterir. **c)** $(CTG)_n$•($CAG)_n$ tekrarlarından oluşan kaymış iplik şeklindeki yapı. **d)** $(GAA)_n$•$(TTC)_n$ (homopurin-homopirimidin) tekrarlarından oluşan H-DNA yapısı. **e)** $(GAA)_n$•$(TTC)_n$ (homopurin-homopirimidin) tekrarlarından oluşan yapışkan uçlu H-DNA yapısı. f) $(ATTCT)_n$•$(AGAAT)_n$ tekrarlarından oluşan DNA zincir gevşeme gösteren yapı.

FXS'nun, ebeveynden çocuğa geçişinde $(CGG)_n$'nin boyunun azaldığının belirlendiği birkaç vaka rapor edilmiştir. Bunlarda $(CGG)_n$ ekspansiyonları ve redüksiyonların oluşumunda SSM gibi proseslerin rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Bu redüksiyonlann bazılan incelendiğinde sadece parental germinal mozaisizmden kaynaklandığı belirlenmiştir (1, 118, 119, 120).

Etkilenmiş erkeklerde *FMRl* 'in replikasyonunun geciktiği görülmüştür. Normal *FMRl* aleileri S fazında geç replike olurken etkilenmiş erkeklerin alelleri daha geç replike olur. Etkitenmiş erkeklerde, flow sitometri fraksiyonu sırasında *FMRl* replikasyonunun G2/M fazında olduğu ve replikasyonun gecikmesinin tek yönde değil replikasyon çatalının her iki yönünde de meydana geldiği gözlenmiştir (121).



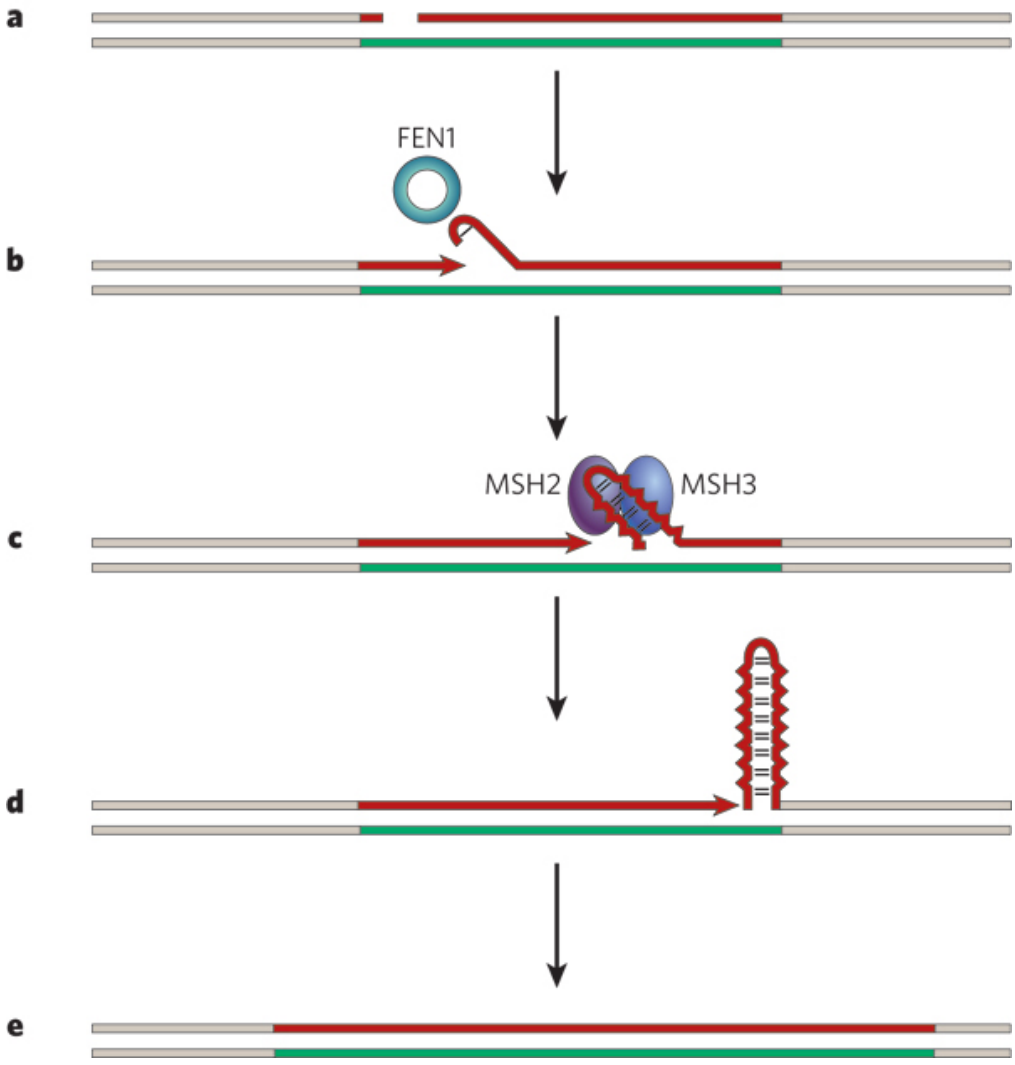
Şekil 2.7. Tekrar genişlemesi için replikasyon mekanizmaları.

a) Tekrarlayan saç tokası şeklindeki yapı ikinci replikasyon sonucu tekrar bölgeleri genişlemiş bir iplik meydana gelir (soldaki şekil). Oysa aynı yapı şablon ipliğinde gerçekleştiğinde tekrar bölgeleri kısalmış bir iplik meydana getirir (sağdaki şekil). **b)** Replikasyon çatalı gecikmesinde tekrar instabilitenin yeniden çalışmasına dayalı model. (Üst yoldaki) Dna polimeraz geri kalmış ipliğin üzerindeki tekrarlı saç tokası şeklindeki ipliğin üzerinden atlayarak sentezine devam eder ve sonunda kısalmış tekrar bölgeleri kısalmış iplik meydana gelir. (Alt yoldaki) replikasyon çatalı ters yönden ve yeniden başlımış olmasıyla lider zincir üzerindeki tekrarlı saç tokası şeklindeki ipliğin sentezine devam eder ve sonunda tekrar bölgeleri genişlemiş bir iplik meydana gelir. saç tokası şeklindeki tekrar bölgeleri kırmızı ile gösterilmiştir. Yeşil ile komplementer iplik, Okazaki fragmanları için primerler pembe ile, single-stranded-DNA-binding proteinleri mavi daireler ile gösterilmiştir (117).

Diğer bir yorum da matemal imprinting'dir. İmprinting *FMR1* geninin ekspresyonunda rol oynar. Erkeklerden geçen X-linked mutasyonun ekspresyonu zorunlu değildir. Mutasyonun eksprese olması için kadınlardan geçmesi gerekmektedir (122). Matemal imprinting, matemal premutasyonlann somatik ekspansiyonuna yol açar. Full mutasyonlu oositler taşıyıcı kadınların ovaryumlarında gözlenmiştir (54).

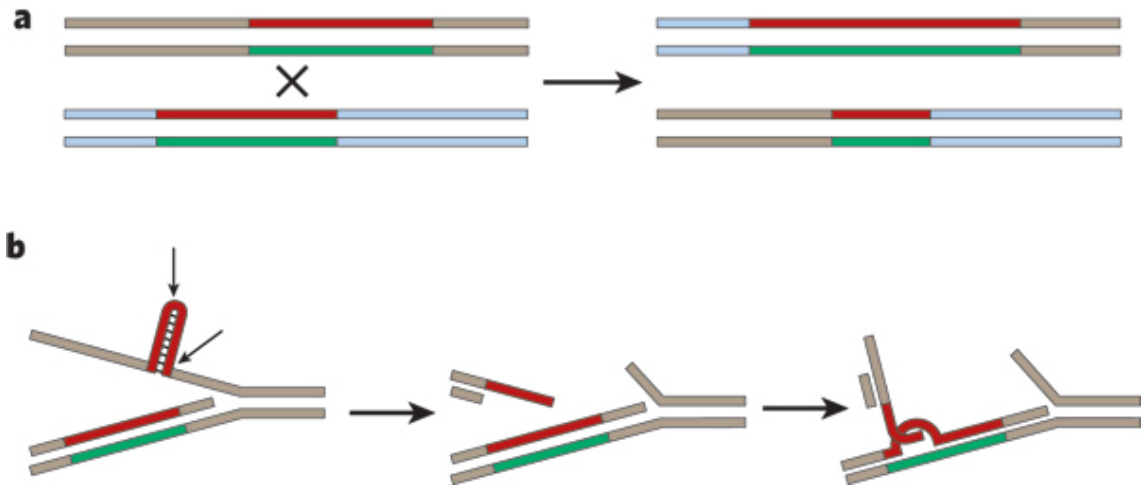
Büyük premutasyonların full mutasyona ekspansiyonunun, kadında sadece mayoz sırasında değil aynı zamanda erken embriyogenezis sırasında da oluştuğu öne sürülmektedir (94, 123, 124). Nesiller arasında full mutasyona ekpansiyonun (cis-acting elementler mutasyonel rnekanizmaya karıştığından) postzigotik aşamada

gerçekleşebileceği (106, 125), mutasyon boyunda (CGG tekrarında) azalmanın ise embriyogenezis öncesinde mayoz bölünme sırasında meydana gelebileceği öne sürülmüştür (125).



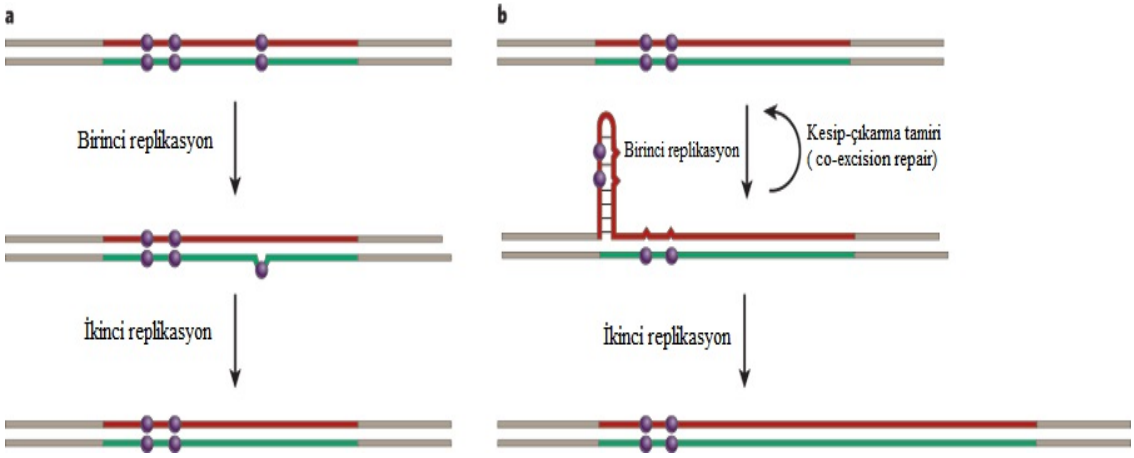
Şekil 2.8. Bölünme olmayan hücrelerde tekrar artışlar/genişlemeler için boşluk tamir modeli.

a) Oksitieyici radikaller yapıdaki meyilli bölgede bir boşluk oluştururlar. **b)** DNA tamiri sırasında FEN1 üzerinde bir saç tokası meydana gelir ve sentez bozulur. **c)** MSH2-MSH3 bağlanarak kanadın kaldırılması önleyerek saç tokasını dengeler. **d)** Kararlı kaymış iplik tamiri ile ara DNA sentezini tamamlanır. **e)** Kaymış sarmalllı ara madde hata meyilli onarım yolağı ile tekrar bölgesinde genişlemeye neden olur. Saç tokası şeklindeki tekrar bölgeleri kırmızı, komplementer iplik yeşil ile sınır DNA'da bej renginde gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Tekrar artışları/genişlemeleri için rekombinasyon modelleri

a) Eşit olamayan krossing-over sonucu genişlemiş ve kısalmış tekrarların karşılıklı görüntüsü. Homolog kromozomlar bej ve mavi renkte ve tekrarlayıcı DNA iplikleri kırmızı ve yeşil renkte gösterilmiştir. **b)** geçiken iplik şablon (solda) görevi görerek DNA replikasyonu sırasında oluşan Stabil DNA yapısının bölünmesi tek iplikçikli bir 3' tekrarlı genişleme (merkezde) oluşturur. Kardeş kromatidlerin içine böyle bir uzantı (sağda) kayıt dışı invazyonu tekrarların genişlemesine veya kısalmasına neden olur.Tekrarlama eğlimi olan iplik kırmızı ile, tamamlayıcı iplik yeşil ile bunları kuşatan DNA parçası da bej renkte gösterilmiştir. Küçük olanlar olası bölünme bölgelerini göstermektedir



Şekil 2.10. Genişleyebilir tekrarlar içersinde ki kesintiler ile stabilize kaybı

Kesintiler ile stabilize kaybı için olası iki mekanizma.**a)** Kalıp olarak kullanılan iplikte (yeşil) dışa kaymış bir kesinti (mor daire) DNA replikasyonu sırasında kaybolur.**b)** Uzun ve normal alellerde kalıp olarak görev yapan DNA ipliğinde saç tokası/hairpin yapısının oluşması ve çoğaltma sırasında kaymış iplikli yapının dubleks kesiminde uyumsuzluklar oluşturur. Bu yanlış eşleşmeler ko-eksizyon tamiri ile tamir edilebilir. onarım sırasında 3' ucunda tekrarlayan bölgelerde ki başarısızlığı genişlemeye neden olur.Tekrar eğilimli olan iplik yapısı kırmızı ile komplementer iplik yeşil ve komşu DNA bej renkte gösterilmiştir.

2.3.5. *FMR1* Proteini ve Fonksiyonu

Yaklaşık 38 kb'lik 17 ekson içeren *FMR1* geni 4.4 kb'lik mRNA kodlar ve bu mRNA 70 kDa'luk frajil X mental retardasyon proteini (FMRP) sentezler (53).

FMR1 geni çoğu dokularda farklı düzeyde olsa da 4.4 kb'lık bir transkript olarak ifade edilmektedir. Northern analiziyle insan dokularında, beyin, plasenta, testis, akciğer ve böbrekte yüksek düzeyde eksprese olduğu gözlenmiştir. Ekspresyonun karaciğerde, iskelet kaslarında ve pankreasta düşük olduğu gözlenmiştir (55).

Fetal insan beyninde *FMR1* ekspresyonunun majör bölgeleri üzerine yapılan bir çalışmada; 8-9 haftalık gebelikte 2 normal fetüsün doku parçalarında, cDNA probları ve antisens oligonükleotid kullamlarak yapılan in situ hibridizasyonla *FMRl* mRNA'sının dağılımı analiz edilmiştir. Aynı çalışma 25 haftalık normal tek yumurta ikizlerinin beyin dokusu bölümlerinden yapılmıştır. 25 haftalık fetüsde, *FMR1*'in merkezi sinir sisteminde ve özellikle nükleus bazalis magnosellularis (NBMYin kolinerjik nöronları ve hipokampusun piramidal nöronlarında) yüksek düzeyde ifade edildiği ve ayrıca serebral korteks içinde talamik ve subtalamik nükleusta ve serebellumda da anlamlı düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir. *FMR1* gen ekspresyonunun 8-9 haftalık fetüsün ganglia ve spinal kordunda yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Yine bazı sinir sistemi dışındaki dokularda ve retinada da eksprese olduğu belirlenmiştir (73).

Farede FXS için bir knockout model yapılmıştır. Knockout farede normal *FMR1* proteini yokluğunda, makroorşitizm, öğrenme güçlüğü ve hiperaktivite görülmüştür. Bu çalışma, *FMR1* 'in fizyolojik rolünün kolayca anlaşılmasına yardım etmiş ve makroorşitizm, abnormal davranış ve mental retardasyon mekanizmasının anlaşılmasını kolaylaştırmıştır.

FMRP daha çok sitoplazmada lokalize olduğu belirlendi ancak bazen çekirdekte de bulunduğu tespit edilmiştir (126).

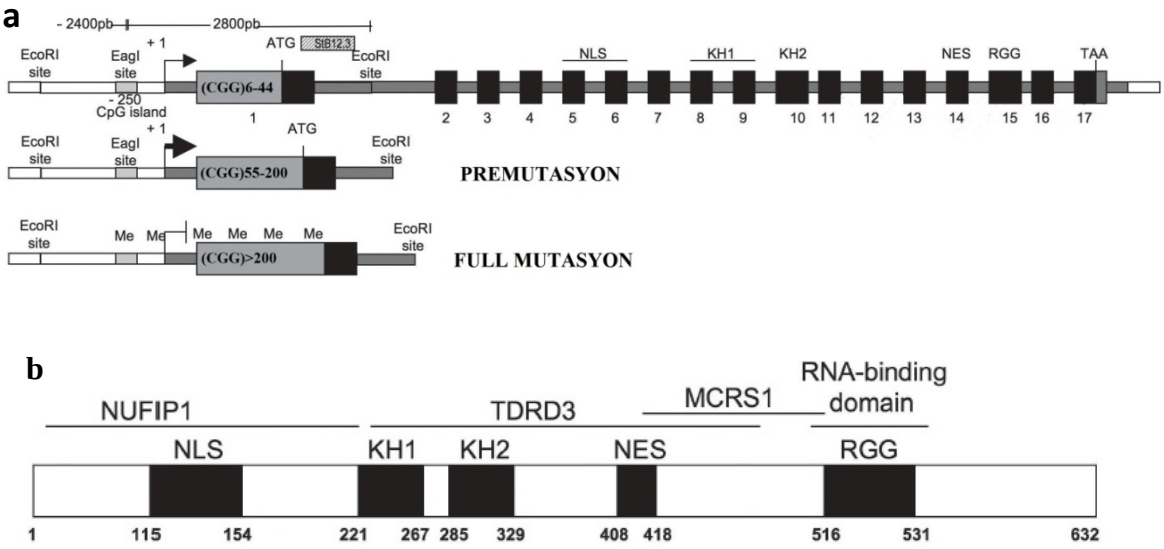
FMRP ribozomlarla ilişkili olduğu bilinen fakat fonksiyonu kesin olarak bilinmeyen bir RNA bağlanma proteinidir (127, 128, 129, 130,131). Sukroz Gradient analizi ile FMRP

ribozom ilişkisinin RNA-bağımlı olduğu gösterilmiş ve FMRP, EDTA işlemini takiben ribonükleoprotein partikülleri içinde bulunmuştur. Bu çalışmaya göre FMRP, bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve bir de nükleer eksport sinyali (NES) içerir. RNA bağlanma özelliği ribozomlar ile ilişkilidir. Bu veriler birleştirildiğinde FMRP önce ribonükleoprotein (RNP) partikülleri içinde toplanarak nükleusa girer bunu sitoplazma içine taşıma takip eder ve ribozomlar ile ilişkiye girer (129). Diğer bir çalışmada, FMRP'nin nükleositoplazmik olduğunu gösteren, immünogold çalışmada, bu proteinin nükleer porlar içinde ve nörönal nükleoplazmada lokalize olduğu belirlenmiştir (130). *FMR1* 'in ekspresyonunun hücre siklusunu düzenlemediği ancak FMRP'nin house-keeping fonksiyona sahip olabileceği öne sürülmektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmada FMRP'nin poliribozom translasyonunda mRNP'ler ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve FMRP'nin mRNA kompleksleri ile interaksiyona giren bir mRNA şaperonu olduğu öne sürülmüştür (131). Özet olarak FMRP, heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP) olarak bilinen RNA bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. FMRP nöronlarda mRNA taşınmasında ve translasyonunda yer alan "messenger ribonucleoprotein" (mRNP) kompleksini oluşturur. Ayrıca nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve nükleer eksport sinyali (NES) içerirler. Böylece FMRP, nükleus ve sitoplazma arasında taşınabilir.

FMRP'nin ekspresyonu insan, maymun ve farede farklı dokularda çalışılmış ve *FMR1* proteinlerinin moleküler ağırlığının lenfoblastoid hücre dizilerinde olduğu gibi 67-80 kDa oldukları belirlenmiştir. Bazı dokularda ise FMRP'nin izoformu oluğu düşünülen 31-41 kDa'luk düşük moleküler ağırlıkta *FMR1* proteinleri bulunmuştur. Farklı kütleye sahip olan bu proteinlerin N-terminal uçları aynı fakat karboksil terminal uçları farklıdır. Düşük moleküler ağırlıktaki *FMR1* proteinleri, büyük moleküler ağırlıktaki *FMR1* proteinleri gibi RNA'ya bağlanmamaktadır (132). FMRP'nin fetal insan beyin mRNA'sının %4'üne bağlandığı gösterilmiştir (54,133)

FMRP'nin eksikliği mental retardasyon ve makroorşitizm ile sonuçlanan frajil X hastalarında görülen majör patolojik semptomlara neden olur. FMRP, 60S ribozomal altünite ile birlikte çöken sitoplazmik bir RNA-bağlanma proteinidir (126, 134).

FMRP'nin amino asit dizisinde iki tip motifler olduğu belirlenmiştir ve daha önceden tanımlanmış olan hnRNP K proteinindeki KH domain ve hnRNP U proteinindeki RGG (arg-gly-gly) kutusu (box) ile benzerlik gösteren KH1 (222-251 amino asit arasında) ve KH2 (285-314 amino asit arasında)domainleri ve RGG kutusu (534-546 amino asit arasında) içerdiği ve bunların hnRNP'nin pre-mRNA'ya bağlanmada rol oynayan fonksiyonel motifler olduğu gösterildi (Şekil 2.11) (61, 135, 136).



Şekil 2.11. İnsan FMR1 geni ve FMR1 protein (FMRP) yapıları

a) *FMR1* geni: üstten aşağıya doğru normal aleli, premutasyonu ve full mutasyonlar şematize edilerek ve genişleme ile ilişkili değişiklikleri göstermektedir. Koyu gri çizgiler transkripsiyonu dizisi, kara kutuları ekzonları ve açık gri kutu CpG adasını gösterir. ATG başlatma kodonu ile 17 ekzon ve alternatif yapışma bağlantıları gösterilmiştir. Okların büyüklüğü üretilen RNA miktarı ile ilişkilidir. Me terimi full mutasyonlardaki metilasyonu gösterir. Restriksiyon bölgeler ve StB12.3 prob için gösterilmiştir. **b)** FMRP cDNA dizilimi: Nükleer lokalizasyon dizisi (NLS), hnRNP K-protein homoloji domainleri (KH1 ve 2), nükleer export sinyali (NES), Arg-Gly-Gly domain (RGG) gösterilmektedir. FMRP etkileşen proteinler: Nuclear Fragile X Mental Retardation Protein İnteracting Protein 1 (*NUFIP1*) Bu gen, C2H2 çinko parmak motifi ve bir nükleer lokalizasyon sinyali içeren bir nükleer RNA bağlayıcı proteinini kodlar, Tudor Domain Containing 3 (*TDRD3*) bir protein-kodlayıcı gendir, Microspherule Protein 1(*MCRS1*) bir protein-kodlayıcı gendir. G0 evresinde histon asetiltransferaz aktivitesi (H4-K16 spesifik) ve histon asetiltransferaz aktivitesi (H4-K5 spesifik) içerir.

KH domainleri hnRNP K proteini içinde orijinal olarak bulunmakta olup mRNA'nın biogenezine karışmaktadır (61). KH domainlerinin önemini ortaya koymak amacıyla, klinik görünümleri ciddi olan FXS hastalarda yapılan bir çalışmada, klinik görünüme FMRP yokluğu ve CGG tekrarı ekspansiyonunun neden olmadığı görülmüştür. Sadece ikinci KH domainindeki bir nokta mutasyonu (Ile304Asn) buna neden olmuştur. Bu mutasyon, FMRP'nin RNA bağlanma kapasitesinde azalma meydana getirmiştir (9).

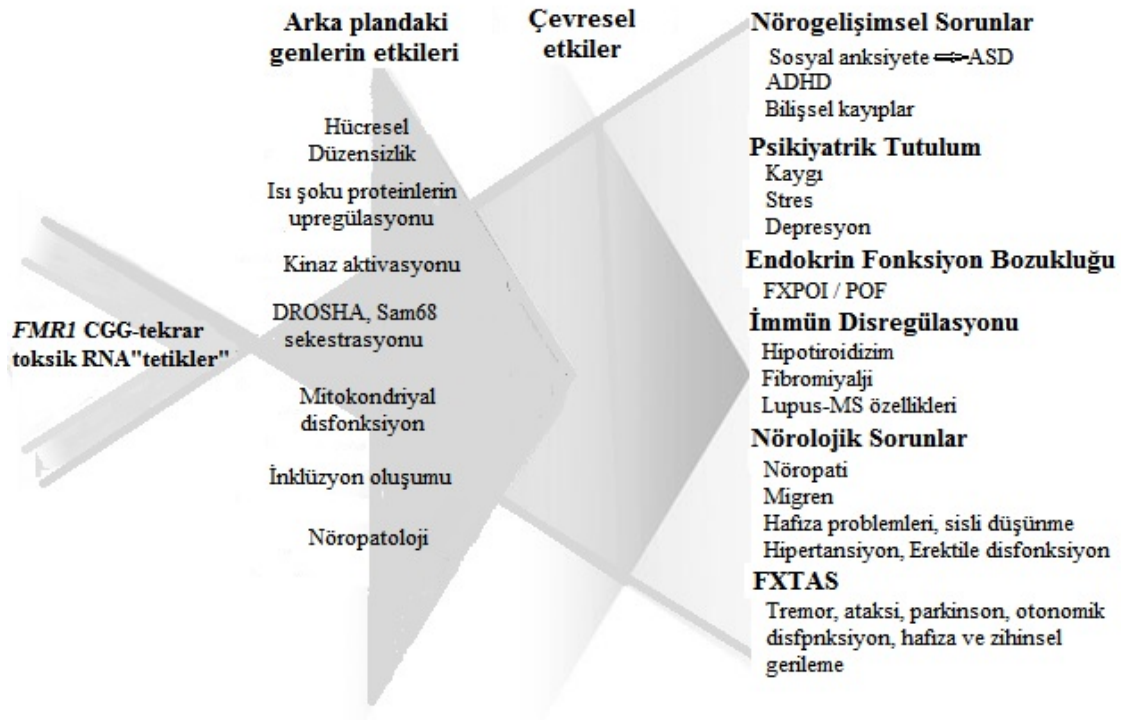
Benzer bir çalışmada FMRl ve hnRNP K'daki KH domainlerinin mutajenezisi ile KH domainlerinin RNA'ya bağlanmadaki rolleri değerlendirilmiş ve KH domainlerinin RNA'ya bağlanmada esas rolü oynadığı belirlenmiştir. Bundan başka, KH domainleri ile FXS ve *FMR1* 'in RNA bağlanma aktivitesinin kaybı arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğu ortaya konmuştur (101). FMRP' de bulunan iki KH domaini insan, fare ve tavukta homolog olup %100 aynıdır (91).

FMRP'deki ikinci motif olan RGG kutusu, RNA bağlama aktivitesine sahip oldukları ve bir çok nükleer RNA bağlama proteinlerinin yapısında bulundukları gösterilmiştir. FMRP'nin RNA bağlanma yeteneği ile RGG kutusunun ilişkisinin olmadığı belirlenmiştir (101, 135). Bu çalışmalalar ile FMRP'nin hücre içinde bir RNA-bağlama fonksiyonu olduğu ve hücre içinde seçilmiş, bir çok RNA ile interaksiyona girmekte olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla FMRP'nin, FXS'nun pleitropik fenotipinde bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Evrimsel süreçte korunmuştur. FMRP bir çok dokuda gösterilmiştir daha çok sitoplazmada lokalize olmaktadır. Fetüs olgunlaştıkça, beyin ve testisler hariç diğer dokularda azalmaktadır. Merkezi sinir sistemi ve testisler fetal yaşamda oldukça yüksek ekspresyonun görüldüğü ve erişkin yaşamda da sürdüğü dokulardır (101).

2.4. PREMUTASYONLARIN FENOTİPLERİ/KLİNİK YANSIMALARI

FMR1 genin premutasyon alel (55-200 CGG tekrarlı) taşıyıcıları genellikle klinik belirtilerin olmadığı kabul edilir. Ancak, böyle bireylerin üç farklı (veya daha fazla) klinik yansıması olduğu belirgin bir şekilde ortaya konulabilir (Şekil 2.12)(137); FXS spekturumun üzerinde hafif bilişsel ve/veya davranış problemleri, Prematür Over Yetmezliği 1 / Frajil X'e bağlı Primer Over Yetmezliği (POF1/FXPOI) ve yeni tanımlanan, büyük yetişkin taşıyıcıların nörodejeneratif bozukluğu olan Frajil X'e bağlı tremor/ataxia sendromu (FXTAS) (137,138).

FXS çocukların taşıyıcı annelerin tipikal normal zekalarından bu yana premutasyon taşıyıcılarında klinik tutulum olasılığı başlangıçta önemsenmedi. Ancak son on yılda kadın taşıyıcılarda bir dizi çalışma yapılarak FXS'da görülen belirgin kulaklar ve esnek parmak eklemleri gibi fiziksel özelliklere sahip olduğu belgelendi.



Şekil 2.12. Premutasyon taşıyıcıların molekül değişiklikleri ve klinik tutulum spektrumu (137).

Johnston ve arkadaşları (2001) 100'den küçük tekrara sahip olanlardan daha çok 100'den büyük tekrarlara sahip olan taşıyıcı kadınlarda depresyon ve kişilerarası duyarlılık gibi duygusal problemlerin görülme sıklığı daha fazla olduğunu gözlemişlerdir. Bu duygusal özellikler FXS ile premutasyon üst yarısı aralığında olması ile FMRP'nin hafif eksikliği nedeniyle ortaya anksiyetenin ve perseveratif düşüncenin hafif bir formu olarak görülür. Ayrıca Loesch ve arkadaşları (2003) kadın ve erkeklerde fiziksel ve bilişsel fenotiplerin varlığı ve derecesi FMRP'nin düzeyleri arasında bir ilişki olduğunu hatta premutasyon aralığında başlayıp ve full mutasyon aralığının içine kadar yayıldığını bildirmişlerdir. İki ek çalışmalar sonucunda premutasyon alelleri ile çocuklar arasında mental retardasyon ve otizm spektrum bozuklukları da dahil olmak üzere ciddi klinik tutulumları belgelendi. Tassone ve arkadaşları (2000) mental retardasyon ve/veya otistik bazı premutasyonlu çocukların FMRP seviyelerinin düşük olduğunu ilk defa rapor etmişlerdir. FXS spekturum formları Klinik tutulumu protein düzeyleri ile ilişkili olduğunu önerdiler. Bu tutulum formları erkek taşıyıcılarda daha sık olabilir; Aziz ve

arkadaşları (2003) premutasyonlu 15 erkek çocukta öğrenme güçlüğü yada otizm spekturum bozukluğunun sık görüldüğünü rapor ederek dikkat çekti (138).

2.4.1. Frajil X'e Bağlı Tremor/Ataxia Sendromu (FXTAS)

2001 yılında gelişimsel pediatrist olan Dr. Randi Hagerman tarafından premutasyon alellerin yaşlı erkek taşıyıcıları arasında yürüyüş/demarş ataksi, parkinson ve otonom disfonksiyon ile ilerleyici tremorun oluşumu ile belirlenen yeni bir nörodejeneratif durum olan frajil X'e bağlı tremor/ataksi sendromu (FXTAS) (OMIM 300623) olarak rapor edilmiştir (138, 139).

FMR1 genine bağlı bozukluklarda tekrar açılımlar dahil olmasına rağmen, klinik sunum ve her hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaları tamamen farklıdır (141).

FXTAS klasik fenotipinde 50 yaşın üzerindeki erkek bireylerin *FMR1* premutasyon taşıyıcılarında ilerleyici tremor ve serebellar ataksi yürüyüş ile karakterizedir. İlerleyici tremor FXTAS olan kişilerde sık görülen bir bulgudur ama değişken bir öneme sahiptir. Erkek taşıyıcıların %50'si hafif tremor ve %17' si orta tremor (titreme) vardır ki benzer biçimde esansiyel tremor görülebilir (138,139).

Nörolojik bozukluk olarak, intansiyonel tremor, serebellar ataksi, periferik nöropati, atipik parkinsonizm ve demans ile ilişkilidir. Bilişsel özellikler, zeka geriliği, kısa-süreli hafıza ve yönetici işlevleri bulunmaktadır. Psikiyatrik semptomlar; kişilik veya ruh hali değişiklikleri, artan sinirlilik ve dürtüsel davranış gibi bulgular mevcut olabilir. FXTAS tanısı premutasyon aralığında *FMR1* alellerinin teyit edildiği yaşlı erişkinlerde klinik bulgulara dayanmaktadır. Genellikle FXTAS hastalarda orta serebellar pedinküllerin hiperintensiteler beyin MRI'da görülür ve yararlı bir tanı belirtisi olabilir. Premutasyon aleli taşıyan yaklaşık erkeklerin %46'sında ve kadınların %17'sinde 50 yaşından sonra FXTAS nörodejeneratif belirtiler ortaya çıkabilir. Bazı kişilerin FXTAS tanısı için tam klinik tanı kriterlere (Tablo 2.8)(142) uymayan nörolojik belirtilerle karşılaşabilirsiniz (140). Son çalışmalar sonucunda Tablo 2.9 da tarif edildiği gibi, FXTAS ile ilgili yeni semptomlar ortaya çıkmıştır. Koku fonksiyon bozukluğu, daha önce bildirilmemiştir fakat belirgin FXTAS hastaların %80'ninde bulundu. Bireylerin FXTAS aşama aşama ilerledikçe, tablo 2.9'da görülen semptomlar daha yaygın hale gelir. FXTAS, örneğin,

yutma, idrar ve idrar kaçırma, günde sedasyon ve kas güçsüzlüğü ile sorunları daha sık görülür (142).

Son olarak; FXTAS sadece premutasyon ile ilişkili bozukluk olarak nörodejeneratif özellik yapısı olmasına rağmen, az sayıda metillenmemiş full mutasyon alelli olan bireylerde de gözlenmiştir, muhtemel *FMR1* mRNA seviyesi yüksek düzeyde üretimi sonucu olmuştur ve bazı ara alel /grey zone (45-55 CGG tekrarları içeren) içeren bireylerde de gözlenmiştir. Buna ek olarak, FXTAS ile ilgili küçük intranükleer inklüzyonlar full mutasyon alelleri içeren üç erkek bireyde bildirilmiştir. Loesch ve arkadaşları 65 yaşında erkek bir bireyde tamamen metillenmemiş ve full mutasyon (247-480 tekrarlar içeren) *FMR1* mRNA normal den 3.5 kat daha fazla olan olguyu sunmuşlardır. Bu birey 54 yaşında IQ'su sınırda olup alkol bağımlı, tip II diyabetli, cerrahi mide kanseri, kötüleşmiş tremor ve ataksisi, hafıza noksanlığı ile sonunda demans olan kamyon şoförüdür ve MRI klasik FXTAS belirtileri olan; MCP işaretli ve pons da beyaz cevher tutulumlu, CC ve periventriküler alanlarda inklüzyonlar içermektedir (142).

Açıkçası, FXTAS için mevcut tanı kriterleri, premutasyon aralığı dışında sahte CGG-tekrar açılımları ile de bireylerin bu bozukluğun gelişebilir olmasından dolayı güncelleştirilmesi gerekiyor. FXTAS tanı kriterlerinde klinik özellikleri tanımlamak için bazı klinik tanımları çıkarıp/eklemek ve bunun için geniş bir şekilde klinik belirteçleri tekrar ele alınması gerekiyor. 2013 yılında tablo 2.10'da ki gibi revize edilmesi için küresel bir konsensüs toplanıp uluslararası uzmanlardan oluşan bir grup tarafından gözden geçirilecektir (142).

FXTAS'nun penetransı 70 yaşın üzerindeki erkekler için %50'yi aşıyor. Genel popülasyonda premutasyon (PM) alellerin sıklığı yaklaşık olarak erkeklerde 800'de 1, kadınlarda ise 250'de 1 görülmektedir. Genel nüfusun 50 yaş üzerindeki erkek bireylerin 1/3000'ninde FXTAS belirtileri ortaya çıkacağı tahmin edilmiştir (141).

FXTAS için *FMR1* genindeki CGG tekrar dizisine bağlı premutasyon taşıyıcılarının beyin bölgesi ve perifer kan lökositlerinde mRNA miktarlarının yüksek düzeyde tespit edidiği, FMRP düzeylerinin biraz azalmış ya da FMRP için hiç bir değişiklik tespit edilmediği gözlemine dayanan fonksiyonal bir RNA kazanç/toksik mekanizma önerilmiştir.

Tablo 2.8. **FXTAS için mevcut tanı kriterleri (142).**

Muayene ve Derece		**Gözlem**
Moleküler		
	Majör	55-200 CGG tekrarı (*FMR1*premutasyon)
Radyoloji		
	Majör	MRI'da MCPs içinde beyaz madde lezyonları
	Minör	MRI 'de serebral beyaz cevherde beyaz madde lezyonları
	Minör	Orta-şiddetli jeneralize atrofi
Klinik		
	Majör	İntention tremor
	Majör	yürüyüş/demarş/gait ataksisi
	Minör	Parkinson
	Minör	Orta-şiddetli kısa süreli hafıza eksikliği
	Minör	Yürütme fonksiyonu eksikliği
Nöropatolojik		
	Majör	FXTAS inklüzyonları
FXTAS Tanı Kategoriler		
Kategori		**Tanımlama**
Genişletilmiş CGG tekrarın (moleküler) kesin olması ve		
Kesin		Bir tane majör radyoloji bulgu + Bir majör klinik veya FXTAS inklüzyon varlığı
Olası (muhtemelen)		Bir tane majör radyoloji bulgu ve bir tane minör klinik bulgu ve ya İki majör klinik bulgu
Olabilir (ihtimal)		Bir tane minör radyoloji bulgu ve bir tane majör klinik bulgu

FMR1 mRNA seviyelerinin yüksek olmasında altta yatan mekanizma tam bilinmemektedir (141).

Tablo 2 9. FXTAS var olan/resmileşmiş ve genişletilmiş/yeni çıkan klinik bulgular (142).

Otonom Sorunlar	
Kabızlık/ irritabl bağırsak sendromu	Hagerman ve arkadaşları (2008) [PubMed: 18686748]; Hunsaker ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21572337]
Erektil fonksiyon bozukluğu	Greco ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 17382748]
Yutma sorunları	Leehey ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 14994285]
Gastrointestinal reflü	Leehey ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 14994285]
Ortostatik hipotansiyon	Leehey ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 14994285]
Hipertansiyon*	Coffey ve arkadaşları. (2008) [PubMed: 18348275]; Hamlin ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 22528549]
İdrar sıkışması & inkontinans	Leehey ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 14994285]; Leehey ve arkadaşları. (2011)
Kardiyak ritim bozukluğu	Leehey ve arkadaşları . (2011)
Ani baş dönmesi veya baş dönmesi	Leehey ve arkadaşları . (2011)
Duyusal sorunlar	
Koku alma bozukluğu*	Juncos ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 23079771]
İşitme kaybı*	Juncos ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21279400]
Nöropati*	Berry-Kravis ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 17152065]; Jacquemont ve arkadaşları. (2003) [PubMed: 12638084]; Hagerman ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 17726686] ; Soontarapornchai ve arkadaşları. (2008) [PubMed: 18413472]; Juncos ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21279400]
Uyku sorunları	
Uykusuzluk*	Chonchaiya ve arkadaşları. (2010) [PubMed: 20809278]
Uyku apnesi*	Hamlin ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21932336]
Gündüz uykusu	Hamlin ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21932336]
Motor semptomları	
Tremor+,*; ataksi+,*	Hagerman ve arkadaşları. (2001) [PubMed: 11445641]; Jacquemont ve arkadaşları. (2003) [PubMed: 12638084]; Juncos ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 21279400]; Apartis ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 23077007]
Kas zayıflığı	Leehey ve arkadaşları. (2007) [PubMed: 17133502]
Parkinson+,*	Jacquemont ve arkadaşları. (2003) [PubMed: 12638084]; Healey ve arkadaşları. (2009) [PubMed: 19260103]; Hall ve arkadaşları. (2010) [PubMed: 18565783]; Madeo ve arkadaşları. (2012)
Psikiyatrik	
Depresyon; anksiyete+,*	Bourgeois ve arkadaşları. (2011) [PubMed: 20816038]; Seritan ve arkadaşları. (2013)
Sinirlilik	Bacalman ve arkadaşları. (2006) [PubMed: 16426093]
Kronik ağrı	
Fibromiyalji*	Winarni ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 22903889]; Rodriguez-Revenga ve arkadaşları. (2009) [PubMed: 19367323]; Coffey ve arkadaşları. (2008) [PubMed: 18348275]; Leehey ve arkadaşları. (2011); Apartis ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 23077007]
Nöropatik ağrı*	
İmmün aracılığı ile oluşan bozukluk	
Hipotiroidzm*	Winarni ve arkadaşları. (2012) [PubMed: 22903889]; Rodriguez-Revenga ve arkadaşları. (2009) [PubMed: 19367323]; Coffey ve arkadaşları. (2008) [PubMed: 18348275]; Leehey et al. (2011); Behm ve arkadaşları.(2012) [PubMed: 23245186].
Fibromiyalji*	

* :Yaş uyumlu kontrol grubuna göre FXTAS olanların daha fazla sayıda ortaya çıkan özellikler.
+ : Resmileşmiş/var olan özellikler

Tablo 2.10. Tablo 2.8 de sunulmuş olan FXTAS tanı kriterlerine önerilen modifikasyonlar (142).

Muayene ve Derece		Gözlem
Moleküler		
	Majör	Premutasyon aralığını içerecek şekilde genişletmek • 45-54 CGG tekrarları (grey zone) • Full mutasyon ile *FMR1* mRNA üretimi devam eden
Radyoloji		
	Majör	MRI'da korpus kallosum da, ınsula da ve/veya pons içerisindeki beyaz cevherdeki lezyonlarıda içerecek şekilde genişletmek
Klinik		
	Minör	Çevresel nöropatiyi içerecek şekilde genişletmek
Nöropatolojik		
	Majör	FXTAS inklüzyonları

2.4.2. Prematür Over Yetmezliği 1 / Frajil X'e Bağlı Primer Over Yetmezliği (POF1/FXPOI)

Premutasyonlu kadınların FXTAS yakalanma riski düşük olsa da, erken yumurtalık yetmezliği görülme olasılığı nispeten daha sıktır (143).

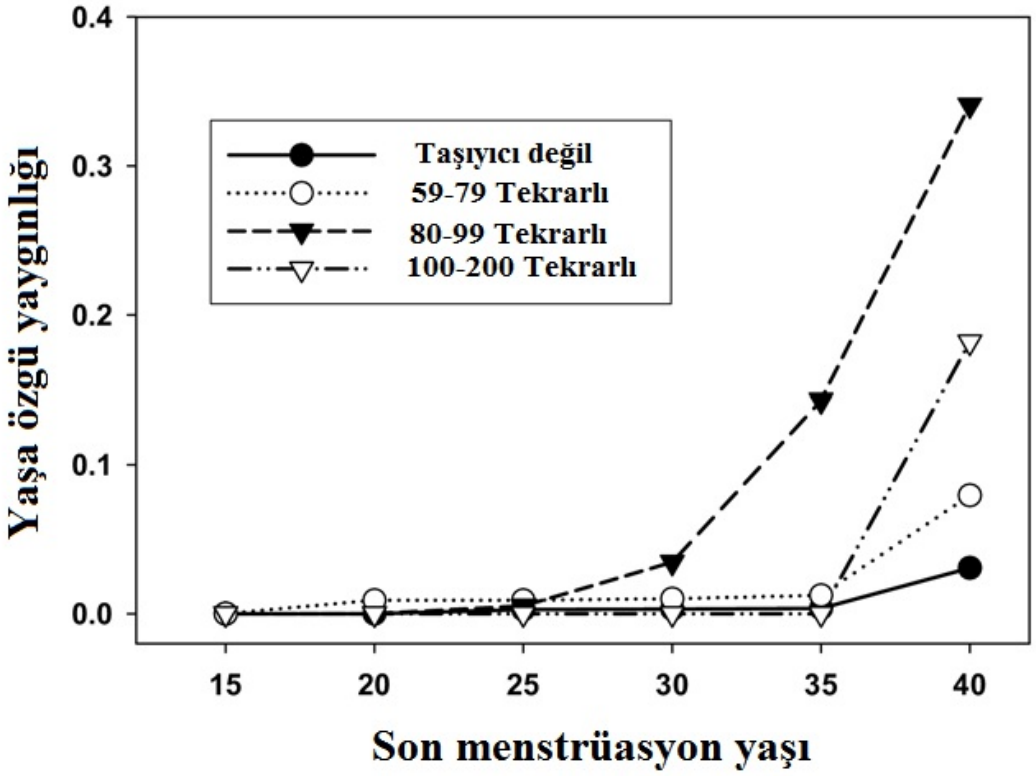
Prematüre over yetmezliği (POF) 40 yaşından önce kadınların % 1'ini etkileyen primer veya sekonder amenore ile bir hipergonadotropik yumurtalık eksikliğidir. POF hastaların %4 ile %31 arasında bir dominant genetik etiyolojisini destekleyen POF sendromu ailesel birikim vardır. Dolayısıyla, otoimmün hastalıklar veya enfeksiyonları yanı sıra, genetik faktörler POF geliştirilmesi için esas olarak sorumlu olduğu düşünülmektedir. Albright ve arkadaşları 1942 yılında gözlem ve tanımlarına göre POF şimdi primer over yetmezliği (POI) olarak adlandırılarak olguların % 50'si yumurtalık rezervinin bir değişken ve öngörülemeyen işlevini göstermektedir. Ayrıca POF olan kadınların %5-10'u tanı aldıktan sonra gebe kalarak çocuk sahibi olmuştur. Bu nedenle, POF / POI durum sadece farklı toplumlarda kadınların yaklaşık % 10'nunda bulunmuştur daha yaygın bir prematür over senescence/yaşlılığı (POS) sendromu en ağır formu olabileceği ileri sürülmektedir. POF insan aday genler tüm kromozomlar

üzerinde lokalize olmasına rağmen, bunlar X kromozomu üzerinde yoğunlaşmış görünmektedir. POF aday genlerin kümeleri ile üç bölge ayırt edilebilir; bu duruma göre POF1 (Xq26-q28), POF2 (Xq13-q22), POF3 (Xp11.2-p22.1) bölgeler belirlenmiştir (144).

Cronister ve arkadaşları 1991 yılında ilk defa erken yumurtalık yetmezliğinde (POF) *FMR1* premutasyonlu kadınlarda bir artış olduğunu bildirmişlerdir (140). Zamanında FXPOI'nin tam manası bilinmemekteydi. FXPOI özellikleri; düzensiz giden menstrülasyon sonucu over rezervin azalması, artmış FSH düzeyleri, indirgenmiş doğurganlık ve POF (40 yaşından önce menstrülasyonlarının kesilmesi). Genel olarak, FXPOI *FMR1* premutasyon taşıyan kadınların erken yumurtalık yetmezliği sıklığı %15 ile %20 - %13 ile %26 'sı arasında olduğu tahmin edilmektedir ve CGG tekrar sayısı ile doğrusal olmayan bir ilişki vardır (Şekil 2.13) (140,143). Premutasyon taşıyıcıların prevelansı sporadik erken yumurtalık yetmezliği olan kadınların % 0.8-% 7.5 ve ailesel erken yumurtalık yetmezliği olan kadınların %10-%15 dir. (140,143).

Ön kanıtlar da grey zone /ara aleller taşıyan kadınlar, yaklaşık 41 ve 58 tekrarları arasında olanlarda erken yumurtalık yetmezliği riski olabileceğini düşündürmektedir. Ancak doğrulamak için daha çok veriye ihtiyaç vardır (143).

Premutasyon taşıyan bayanlarda folikül stimilasyon hormonu (FSH) daha yüksektir. Son zamanlarda Anti-Müller'ien Hormon (AMH) yumurtalık azalmasını gösteren daha iyi bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür. AMH, büyüyen folikül granüloza hücrelerde eksprese edilir. Bu şekilde, kadınlarda folikül primordial havuzun boyutu için bir belirteç olarak hizmet vermektedir. Nitekim, 70 CGG tekrarından fazla tekrara sahip olan premutasyon taşıyan kadınlarda 70 CGG tekrarından az tekrara sahip olan premutasyon taşıyan kadınlardan daha düşük AMH'ları vardır. Bu nedenle daha düşük AMH düzeylerine sahip ve CGG>70 büyük olan kadınlarda erken yumurta düşüklüğünün olmasını düşündürebilir. Penetransı FXPOI başlama yaşı, FSH seviyelerinin artışı ve CGG tekrar uzunluklarıyla ilişkilidir (141).



Şekil 2.13. CGG tekrar uzunluğuna göre erken yumurtalık yetmezliğinin yaşa özgü yaygınlığı (143).

429 FMR1 premutasyon taşıyıcısı ve 517 taşıyıcı olmayan bir veri setine dayanarak hazırlanmıştır.

Değişmiş yumurtalık fonksiyonu ve doğurganlık kaybı *FMR1* premutasyonla ilgili olduğu netlik kazanmış ve bu değişmiş yumurtalık fonksiyonun altında yatan temel mekanizma bir *FMR1* mRNA kazanç-fonksiyon toksisitesi olarak görünüyor (143).

2.4.3. Premutasyon İle İlişkili Diğer Sorunlar

Araştırmalar *FMR1* premutasyonlu erkek ve kadınların büyük çoğunluğu normal intelektüel (zihinsel) fonksiyonlu olduğunu gösterilmiş. Tekrar aralıkları arasında klinik özelliklerle örtüşme gösteren FMRP azalmaları belgelenmiş ve bazı durumlarda öğrenme ve /veya davranışsal engelli premutasyonlu çocukların olduğu az miktarda olsa da raporlanmıştır. Premutasyon alelli yetişkin kadınlar arasında hipertansiyon, tiroid hastalıkları, fibromiyalji, tremor, ve nöropati görülme sıklığının artmış olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca FXS çocuk sahibi olan kadınların ruh sağlığı sorunları beklenenden daha çok ve yaygındır. Hunter ve arkadaşları (2010) FXPOI'lu kadınların

yumurtalık fonksiyon bozukluğu için olası bir bağlantı olduğunu düşündüren tiroid problemleri, depresyon, ve anksiyete gibi sorunların yüksek oranda rapor olduğu tespit etmişlerdir. FXTAS veya FXPOI klinik belirtileri mRNA toksisitesi ile ilgili olduğu gibi anksiyetininde arasında olduğuna dair kanıtlar da vardır. Hessl ve arkadaşları (2005) premutasyonlu bireylerde psikiyatrik semptomların yüksek mRNA seviyesiyle ilgisi olmadığı ve MRI değişiklikleri bulunan hatta FXTAS klinik tanısı olmayan *FMR1* premutasyonlu kadınlarda anksiyete ile ilişkilendirilmiştir (140).

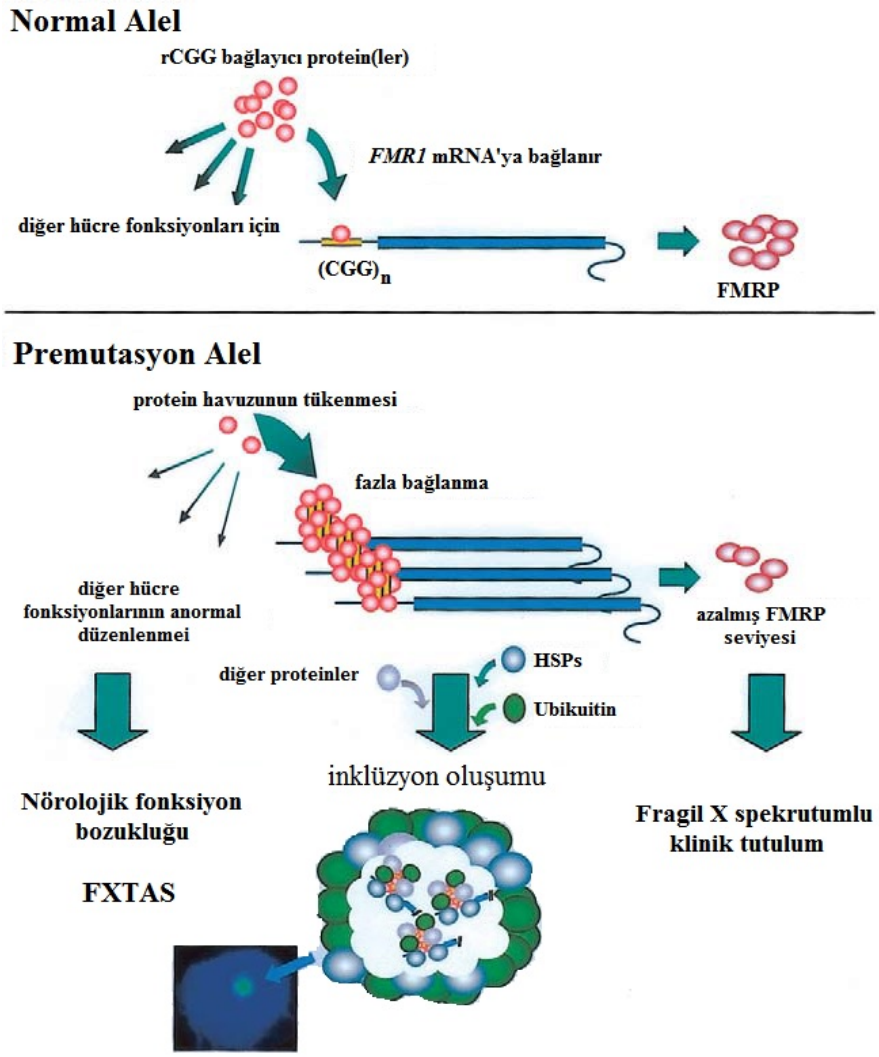
2.4.4. Premutasyon Hastalıklar için Temel olan RNA Toksik Kazanç/Yüksek Fonksiyon Modeli

FXTAS için benzersiz nöropatolojik bulgular özellikle hipokampüs ve limbik sistemde, beyin boyunca nöron ve astrositler de intranükleer inklüzyonlar varlığı (137) ve erkek vakalarda az veya hiç FMRP üreten full mutasyon alellerinin olmaması FXTAS rahatsızlığını protein eksikliği modeline karşı savunur; tremor / ataksi sendromu olması nedensel değildir, premutasyon alellerini barındıran FXTAS'lu bazı hastalarda FMRP de hafif azalma olduğunu gözlenmiştir (138).

Full mutasyon aralığında FXTAS durumunun yokluğu ve anormal (genişletilmiş CGG tekrar) *FMR1* mRNA varlığı yüksek seviyede olması ile birleştiğinde FXTAS için *FMR1* mRNA'nın nörolojik bozukluğa etken olduğu bir RNA "toksik kazanç/yüksek-fonksiyon" modeli ortaya çıkmıştır (Şekil 2.14) (138). Bu hipotez myotonik distrofi için önerilen iyi karakterize RNA kazanç/yüksek-fonksiyon modeline dayanıyor; burada *DMPK* genin 3' UTR deki CUG (CTG) tekrarın genişlemesiyle *DMPK* mRNA (DM1) veya *ZNF9* genin (DM2) birinci introndaki CCUG (CCTG) tekrarın genişlemesi bir yada daha fazla C(C)UG-bağlayıcı proteinleri arasında sekestrasyonuna neden olur (138).

FXTAS ve miyotonik distrofi arasındaki başka paralellik ise; FXTAS içinde internükleer inklüzyonların varlığı ile DM1 ve DM2'de nükleer odakların bulunmasıdır (138).

Toksik kazanç/yüksek-fonksiyon mekanizmaları spinoserebellar ataksi (SCAs)-8,10 ve 12 tipleri ve Huntington hastalık benzeri tip-2 (HDL2) içinde önerilmiştir (138).



Şekil 2.14. FXTAS için RNA toksik kazanç/yüksek fonksiyon modeli şematize edilmiştir (138).

Bu modelde (hipotez) 5'UTR *FMR1* mRNA'nın özel protein etkileşimleri CGG tekrarlarının genişlemesinin bir sonucu olarak değişmiş; Bu modeli miyotonik distrofi için önerilen RNA kazanç/yüksek fonksiyon modeline benzer. Premutasyon aralığında, genişletilmiş CGG tekrar bir veya daha fazla proteinin (pembe küreler) aşırı bağlanmasına yol açar; (i) Artan mRNA kopya sayısı nedeniyle, (ii) CGG tekrarların sayısının artması (artmış CGG molarite), ve/veya ikincil / üçüncül RNA yapısını değişmesine neden olur. Bu fazla bağlanma nedeniyle, hücresel havuzunda proteinleri tüketir ve diğer düzenleyici işlemlerde normal fonksiyonlarının kaybı ile sonuçlanır. Sekestrasyon süreci de proteinlerin birikimi veya anormal işleme tetikleyerek proteozomal indirgenme yolu ile ubikitin proteinlerin, proteozomal alt birimleri ve stres-yanıt (HSP) proteinlerin eşlik etmesi ile inklüzyon oluşumuna yol açar. Full mutasyon aralığında, *FMR1* mRNA yokluğunda değişmiş bir protein-RNA etkileşimleri meydana gelmez, ancak transkripsiyonel olarak aktif kalır full mutasyonlu alel durumunda meydana gelebilir. Küçük resim görüntüsü FXTAS bir hastadan izole edilen bir sinir hücresi (frontal korteks) çekirdeğinin içindeki inklüzyon; floresan antiubiquitin antikoru ile boyanmış ve çekirdeği boyayan DAPI ile zıt boyama yapılmıştır.

Premutasyonlu *FMR1* alellerini taşıyan kadınlar da görülen POF1/FXPOI için de RNA bazlı patogenezin olasılığı kabul edilmiştir (138).

Miyotonik distrofi, DM1 ve DM2, SCAs-8, 10, 12 ve HDL2 ile birlikte ele alındığında, FXTAS için bir RNA kazanç/yüksek-fonksiyon mekanizması için yeterli örnek sağlar. Ayrıca, full mutasyonlu büyük /yaşlı yetişkin erkeklerde FXTAS vakalarının yokluğu büyük ölçüde FXTAS için temel olarak FMRP eksikliğinden kaynaklanmadığını göstermiştir (138).

Premutasyon toksititesi genişlemiş CGG tekrar mRNA tarafından önemli proteinlerin sekestrasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu proteinler Drosha'yı ilaveten diğer RNA birleştirici proteinleri kapsar ve miRNA'ları düzenler (137).

Son olarak, Ross-Inta ve arkadaşları (2010) FXTAS olmayan premutasyon taşıyıcılarının fibroblast ve beyin örneklerinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olduğu kanıtlanmış ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu FXTAS olanlarda daha ağır olduğu belirlenmiştir (137).

Premutasyon RNA toksititesi sonucunda miRNA bozularak erken hücre ölümüne ve mitokondriyal anormalliklere, bazı durumlarda FMRP seviyesinin düşmesi ile beyin bağlantısını etkiler ve RNA toksititesi sürecinde de otizm yada otizm spektrum hastalıklarına (ASD) yol açabilir (137).

2.5. FRAJİL X SENDROMUNUN TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.5.1. Sitogenetik Yöntemler

2.5.1.1. Frajil Alanlar

Kromozomal frajil alanlar, mitozda paketlenme sırasında meydana gelen bozukluk sonucu paketlenmesi yetersiz kalmış kromatin bölgeleridir. DNA sentezinin kısmen baskılanmasını takiben metafaz kromozomlarında gap veya kırık olarak ifade bulan spesifik lokuslar olarak da tanımlanabilir. Kromozom paketlenmesinde ortaya çıkan sorun, kromozomun bu noktada güçsüzleşmesine ve frajil (kırılgan) hale gelmesine neden olur (145, 146, 147). Frajil alanlar tüm kromozomlarda gözlenebilir ve gözlendikleri kromozom bölgesine göre isimlendirilir (145). Frajil alanlar

tanımlanırken, frajil alanın bulunduğu kromozom ve frajil alanın yerleşim bölgesi gösterilir. Örneğin; FRAXA; frajilite, X kromozomu, A bölgesi olarak anlaşılır. FRAXA, fra(X)(q27.3) olarak da bilinir. Bu gösterimde ise frajilitenin yerleştiği kromozomal band belirtilmiştir. Günümüzde 100'ün üzerinde frajil alan tanımlanmıştır (145). Genel popülasyondaki sıklıklarına göre iki ana sınıfa ayrılırlar; yaygın ve nadir frajil alanlar. Frajil alanlar, kültüre hücrelerde normalde stabil iken, bazı kimyasallara maruz bırakıldıklarında veya belirli kültür şartları altında gap veya kırk oluşturan alanlardır. Yaygın frajil alanların genel popülasyonda sıklığı çok yüksekken, nadir frajil alanların sıklığı çok düşük olarak bulunmuştur. Günümüze kadar geçen süre içinde 30 nadir, 89 yaygın frajil alana rastlanmıştır (146). Yaygın frajil alanların tüm bireylerde gözlendiği düşünülmektedir ancak bunların sitogenetik olarak ifade olması kişiden kişiye farklılık göstermektedir, bazı bireylerde bu oran %30'lara kadar çıkmaktadır. Nadir frajil alanlar bireylerin %5'inden daha azında gözlenen ve Mendeliyen kalıtım karakteri gösteren değişikliklerdir (ör, *FMR1* genindeki FRAXA gibi) (147). Yaygın ve nadir frajil alanlar kendi içlerinde doku kültürlerinde kullanılan kimyasallara bağlı uyarılara göre ayrılırlar. Nadir frajil alanlarda 24 lokus folat duyarlıdır, 4 lokus distamin-a duyarlıdır, 2 lokus BrdU'a duyarlıdır. Yaygın frajil alanlarda 76 lokus afidikoline duyarlıdır, 8 lokus BrdU'a duyarlıdır, 5 lokus 5-azasitidine duyarlıdır (145).

Nadir frajil alanlar ebeveynlerden aktarılır veya de novo olarak gözlenebilir. Bunların büyük çoğunluğu folat duyarlı, CGG tekrar dizisi artışı ile birliktedir. Bu grupta Frajil X sendromuna sebep olan *FMR1* genindeki FRAXA bölgesi bulunmaktadır. Tekrar dizisi artışı, CGG tekrarlarının ve etrafındaki CpG adacıklarının hipermetilasyonuna, bunu takiben genin transkripsiyonel olarak susturulmasına yol açar. Diğer folat duyarlı olmayan nadir frajil alanlar, artmış AT dizileri ile birliktedir (146).

Yaygın frajil alanlar, nadir frajil alanlardan farklı olarak nükleotid tekrar dizisi artışı sonucu oluşmamaktadır. Yaygın frajil alanlar tüm kromozomlarda bulunur. Tekrarlar polimorfiktir ve popülasyonun büyük bir kısımında stabil olarak aktarılır. Bireylerin çok az bir kısmında tekrarlar eşik değerin üzerine çıkarak belirgin bir instabiliteye neden olurlar (145,146).

Frajil alanlarda replikasyonda gecikme vardır. CGG tekrarları *hairpin*ler, tripleks, tetrapleks gibi non-B DNA yapıları oluşumuna neden olur (117, 148). Sekonder

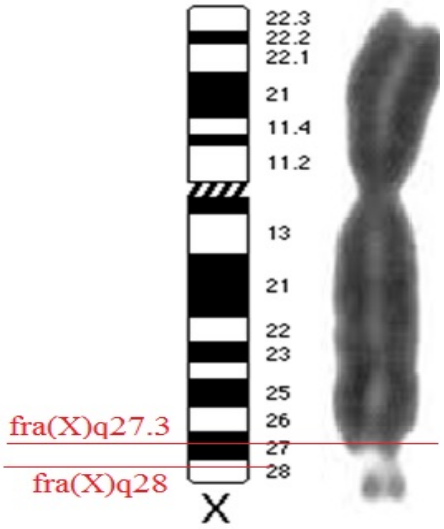
yapıların oluşumu tekrar dizisinin uzunluğuna ve saflığına göre değişiklik göstermektedir. Bu sekonder yapılar, replikasyon çatalının ilerlemesini durdurarak replikasyon sürecini bozar. CGG tekrar dizilerini taşıyan DNA fragmanlarının daha esnek olduğu ve bunların replikasyon çatalının önünde birikerek replikasyon sürecini bozdukları öne sürülmüştür (146). FRAXA ekspresse eden alellerde yapılan replikasyon analizlerinde frajil alanları eksprese eden alellerin bulunduğu genomik bölgelerde G2'de gecikme gözlenir (149). Replikasyon gecikmesi, FRAXA'da yaklaşık 1Mb ve FRAXE'de yaklaşık 300 kb gibi geniş bir alanda gözlenir (149). Tekrar dizilerinin instabil olmasında sadece replikasyon süreci değil, aynı zamanda DNA tamir ve rekombinasyon olayları da önemli rol oynar. CGG tekrar dizilerinin, nükleozomların birleşmesini etkilediği *in vivo ve in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (146). *İn vitro* çalışmalarda artmış CGG tekrarlarının paketlenmeyi önlediği (DNA'nın nükleozom dışında kalması) gösterilmiştir. CGG tekrar sayısı arttıkça DNA'nın da nükleozom dışında kalma olasılığı artmaktadır. Folat duyarlı frajil alanlarda yapılan çalışmalarda, CGG tekrar dizilerinin non-CGG dizilere oranla nükleozom oluşumunu daha fazla baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca araya giren AGG üçlü dizilerinin kaybının da nükleozomların birleşmesini engellediği gösterilmiştir. Frajil alanın ifade bulmasında tekrar dizilerinin boyutu, tekrar dizilerinin ve komşu CpG adacıklarının metilasyonu önemlidir. CGG tekrarlarındaki metilasyon derecesi arttıkça, nükleozom birleşmesinde bozukluk artar. Frajil olmayan kontrol DNA'larında metilasyonun nükleozom yapısındaki değişiklikle ilişkili olmadığı, ancak folat duyarlı frajil alanların ifade bulmasında CGG tekrar sayısı ve metilasyon derecesinin önemli olduğu gözlenmiştir. Anormal kromatin yapısı frajil DNA ile ilişkilidir. Frajil alanlardaki kromatin yapısı replikasyon çatalının ilerlemesini yavaşlatan veya durduran bir engel gibi davranır, frajil DNA'da sekonder yapıların oluşumuna ve kromatin kondensasyonunda bozukluğa yol açar (150). Bu oluşan değişikliklerin hepsi hücre döngüsü kontrol noktalarını uyarır. Ancak frajil DNA dizilerinde oluşan sekonder yapılar bu kontrol noktalarından kaçabilir ve artmış zincir kırıkları, kromozom yapısında değişikliklere sebep olabilir. Frajil alanlar kromatinin *higherorder* organizasyonuna uymadığı alanlardır. FRAXA ile yapılan elektron mikroskobi çalışmalarında, kontrol X kromozomlarına göre frajil X kromozomunun distal kısmının daha düşük yoğunluklu alanlar oluşturduğu gösterilmiştir (151).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda sadece CGG tekrar artışı ve AT zengin minisatellit artışının frajil alanların sitogenetik olarak ifade bulmasına sebep olduğu gözlenmiştir. CGG tekrar dizileri ve AT zengin tekrar dizilerindeki artışın nükleozom oluşumunu baskıladığı, halbuki CTG ve CAA gibi tekrar dizilerindeki artışın nükleozom birleşmesini uyararak daha yoğun kromatin oluşumuna yol açtığı öne sürülmektedir (152). Frajil bölgeler buralardaki dekondensasyon sonucu sitogenetik olarak gap veya kırık şeklinde gözlenirler (147.)

X kromozomu üzerinde 3 adet nadir frajil alan bulunmaktadır (Tablo 2.11)(Şekil 2.15). Bunlar sitogenetik olarak birbirinden ayrılmazken moleküler genetik tanı yöntemleri ile ayırt edilebilirler. FRAXA ve FRAXE mental retardasyonun bilinen nedenleri arasında yer alırken, üçüncü nadir frajil alan FRAXF herhangi bir klinik bulgu ile ilişkilendirilememiştir (153). Tüm nadir frajil alanlar içinde sadece iki frajil alanın klinik anlamlılığı ispatlanmıştır, bunlar X kromozomu üzerinde yer alan FRAXA ve FRAXE'dir (147). X kromozomu üzerinde yer alan yaygın frajil alanlar diğer kromozomlardaki yaygın frajil alanlar gibi herhangi bir patolojik anlam taşımazlar (153). Bunlar arasında yer alan FRAXD'nin, kromozomal yerleşimi (Xq27.2) nedeniyle nadir frajil alanlarla karıştırılabilmesi söz konusudur.

Tablo 2.11. X kromozomu üzerindeki nadir ve yaygın frajil alanlar.

	Kromozomal Yerleşim	**İlişkili Gen**	**Alt Grup**
Nadir Frajil Alanlar			
FRAXA	Xq27.3	*FMR1*	Folat duyarlı
FRAXE	Xq28	*FMR2*	Folat duyarlı
FRAXF	Xq28	*FAM11A*	Folat duyarlı
Yaygın Frajil Alanlar			
FRAXB	Xp22.31		Afidikolin duyarlı
FRAXC	Xp22.1		Afidikolin duyarlı
FRAXD	Xq27.1		Afidikolin duyarlı



Şekil 2.15. X kromozomu üzerindeki nadir frajil bölgeler

2.5.1.1.1. FRAXA-Xq27.3

Frajil X sendromunun karekteristik sitogenetik bulgusu olan X kromozomunun uzun kolunun terminalinde q27.3 bant bölgesinde yer alan, kınlmaya eğilimli noktaya kromozomdan ayn ya da bir uçundan kromozoma bağlı küçük bir parça veya iki kromatit üzerinde bir boğum, boya almayan bir aralık biçiminde görülür. Çok daha ender olarak bu nokta triradial figür, delesyon ya da asentrik bir parça biçiminde de ortaya çıkabilir (13,15, 154).

Özel olarak folat veya timidin'den eksik olan besiyerlerinde (TC199, modifiye RPMI 1640) ya da alternatif yöntemlerle (MTX, FUdR) yapılan sitogenetik çalışmalarda, incelenen metafazların 4'ünde veya üzerinde Frajil X bölgesinin gösterilmesi sitogenetik tanı kriteri olmasına rağmen, yanlış pozitiflik ve negatiflik olasılığı söz konusudur. Etkilenmiş erkeklerde sitogenetik olarak frajil noktanın genelde gösterilebilmesine karşın, taşıyıcıların ancak %50'sinde bu bölgenin gösterilebildiği bildirilmektedir.

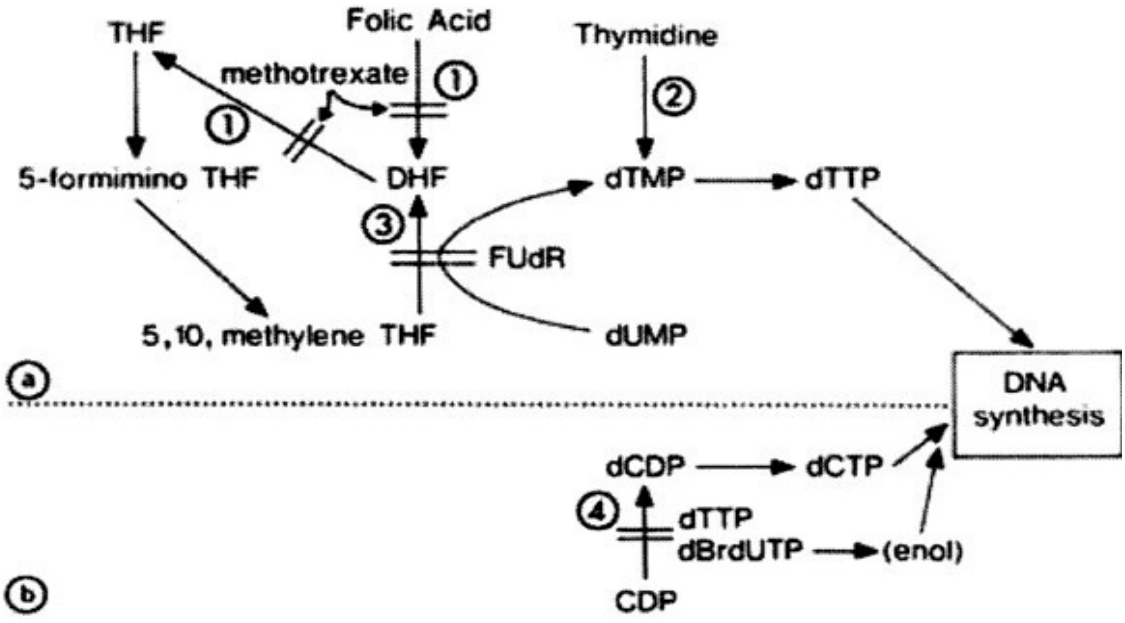
(155).Dördüncü Enternasyonal Frajil X Workshop'unda Frajil X kromozom eldesi ve analizlerinde alınan ortak kararlar belirlenmiştir.

Buna göre;

- En az iki-üç Frajil X indükleyen yöntem paralel olarak kullanılmalıdır.
- Erkekte en az 100 hücre, kadınlarda ise en az 150 hücre analiz edilmelidir.
- Xq27.3'deki frajil nokta band analizleriyle de doğrulanmalıdır.
- Eğer %4' den daha az bir oran saptanacak olursa, kültür tekrarlanmalıdır. Tekrar düşük bir oran bulunması durumunda, kliniği ile tekrar değerlendirilmelidir.
- ISCN nomanklatüre göre;
    - ✓ hasta erkek 46,Y,fra(X)(q27.3)
    - ✓ taşıyıcı/hasta kadın 46,X,fra(X)(q27.3) olarak ifade edilmelidir.
- Frajil X çalışmaları sırasında yapısal kromozom analizleri de yürütülmelidir.

Bu noktanın ekspresyonu, folat bileşikleri ve timidinden fakir besi yerlerinin ya da besi yerlerine folat inhibitörü (methotraxat (MTX) ve fluorodeoxiuridine (FudR) ilave edilmesi ile sağlanır (156). DNA replikasyonunda (pürin ve primidin biosentezinde) folat metabolizması son derece önemli ara kademedir. Ortamda folik asitin bulunmaması veya düşük oranda bulunması frajil noktayı uyarır (13). Aynı etki normal düzeyde folik asit içeren medyumlarda folat metabolizmasını inhibe eden antagonistlerlede sağlanır.

Folata duyarlı frajil bölgeler FUdR ile de kuvvetle indüklenmektedirler. FUdR'nin metaboliti olan 5-florodeoksiuridin monofosfat, timidilat sentetazın kuvvetli bir inhibitörüdür. Ekspresyonu görmek için indüksiyon şartları, mitozdan önceki geç S fazı sırasında hazır olmalıdır. Frajil X ekspresyonunu tam olarak baskılayan timidin veya folik asittir. Folik asit eksikliği veya methotreksat indüksiyonu ile frajil X eksprese olur. Timidinin yüksek konsantrasyonlannın da (1-2 mM) frajil X ekspresyonunu (FRAXA) etkili bir şekilde uyardığı gözlenmiştir.



Şekil 2.16. Nükleotid metabolizmasına katılan folat duyarlı fragil bölgelerin ifadelenmesi

a) Folik asit ve timidin sınırlayıcı veya folat metabolizmasının inhibitörleri ile indüksiyon veya timidilat sentaz inhibitörleri etkileyen yolaklar**. b)** Yüksek konsantrasyonda timidin ve BrdU etkilenmiş yolak. Bu yolaklar için önemli olan enzimler; **(1)** dihidrofolat redüktaz, **(2)** timidin kinaz, **(3)** timidilat sentaz, **(4)** ribonükleotid redüktaz. **Kısaltmalar: BrdU** (bromodeoksiüridin), **CDP** (sitidin difosfat), **dCDP** (deoksisitidin difosfat), **DHF** (dihidrofolat), **FUdR** (florodeoksiuridin), **dTMP**(dioksitimidin monofosfat-timidilat), **dTTP** (deoksitimidin trifosfat), **THF** (tetrahidrofolat), **UMP** (uridin monofosfat). (Sutherland, 1988)

Timidinin bu etkisinin dTTP'nin yüksek düzeyde olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Pürin ve primidin biosentezinde folat metabolizması ve folat antagonistlerinin bu metabolizmayı nasıl etkilediği şekil 2.16'da gösterilmiştir.

2.5.1.1.2. FRAXE-Xq28

Mental retardasyonlu hastaların küçük bir kısmında, FRAXA ekspansiyonunun olmadığı bir frajil X kromozomu belirlenmiştir. Bu hastalar incelendiğinde FRAXA'nın distalinden yaklaşık 600 kb uzaklıkta ikinci bir frajil bölge olan FRAXE'de bir ekspansiyona sahip oldukları gözlenmiştir (107, 157, 158, 159, 160). FRAXE, Xq28'de *FMR2* olarak adlandırılan genin 5' ucunda CCG tekrarının ekspansiyonu ile meydana gelmektedir. Tekrar sayısı normal popülasyonda polimorfik olup 6 ile 25 arasında değişmektedir. FRAXE kromozomlarında ekspansiyon 200'den büyüktür. Tekrar

ekspansiyonu, genin transkripsiyonal eksikliğine ve ılımlı mental yetersizliğe yol açar. FRAXE hastaları, genellikle FRAXA hastalarından daha ılımlı, benzer bir fenotipe sahip olup sıklığı düşüktür (7, 157, 159, 161, 162, 163, 164, 165).

FRAXE mutasyon sıklığının erkeklerde yaklaşık 1/50000 olduğu belirlenmiştir (166, 167). insanda, *FMR2* fıbroblastlar, koryonik villüsler ve saç köklerinde yüksek düzeyde eksprese olurken, tüm kan ve amniyositlerde düşük düzeyde ve lenfoblastlarda ise hiç eksprese olmamaktadır (168).

Frajil X sendromunun aksine CGG tekrarı genişleyebilir veya daralabilir. Ayrıca kadın veya erkekten geçtiği zaman da eşit kararsızlığa sahiptir. Etkilenmiş erkekler FRAXA'dakinin aksine etkilenmiş kızlara sahip olabilmektedir (169, 170).

Ayrıca yapılan aile çalışmalarında normal alelin olmadığı tüm erkeklerin etkilenmiş olduğu belirlendiğinden dolayı FRAXE CCG tekrarında premutasyon olmadığı kabul edilmektedir (169).

2.5.1.1.3. FRAXF-Xq28

FRAXA ve FRAXE gen bölgelerinden sonra üçüncü frajil bölge FRAXF klonlanmıştır. Frajil bölgenin en geç karakterize edilenidir ve Xq'nun distal ucundaki, FRAXE'nin 600 kb uzağında ve FRAXA'nın 1-2 Mb'lık distalinde lokalize olmuştur (107, 171). FRAXF'de (GCCGTC)n (GCC)n dizisinin genişlediği belirlenmiştir. PCR analiziyle normal bireylerde 12-26 üçlü tekrarı olduğu gösterilmiş ve en yaygın alelin 14 üçlü tekrarlı olduğu belirlenmiştir. DNA dizi analiziyle, normal bireylerde GCC GTC motifinin üç kopyası olduğu gösterilmiş ve bu bireylerde GCC diziliminin kopya sayısı değişik olduğundan dolayı PCR analizinde boy varyasyonu olduğu gözlenmiştir. Gelişme geriliği olan, sitogenetik olarak pozitif bir erkekte dizilim 900 üçlü tekrardan daha fazla genişlemiş ve komşu CpG'ce zengin bölge metillenmiştir (172). FRAXA ve FRAXE'nin aksine FRAXF muhtemelen bir hastalık fenotipi ile ilişkili değildir. Frajil bölgelerin hastalık ile ilişkili olması gerekmez; yaklaşık 100 kromozomal frajil bölge belirlenmiştir. Ancak bunlardan sadece ikisi (FRAXA ve FRAXE) klinik bir hastalıkla ile ilişkilidir (107).

2.5.2. Moleküler Yöntemler

FXS'na neden olan genin klonlanmasından sonra bunun kararsız trinükleotid tekrar ekspansiyonundan kaynaklandığı gösterilmiş ve bunu takiben sitogenetik testin yerini moleküler test almıştır (173). Son yıllarda, FXS sıklığını göstermek için esas alınan sitogenetik testin, birçok yanlış pozitif sonuçlara neden olduğu rapor edilmiştir (6, 7, 30, 174). DNA analizi duyarlı, güvenilir ve düşük maliyetli alternatif bir tanı yöntemidir. Frajil X için sitogenetik test laboratuvar teşhisi için temeldir ancak sitogenetik test çok fazla emek istemektedir ve bu yöntemle frajil X taşıyıcısı kadınların sadece % 50'si belirlenebilmektedir (173). DNA testi, daha basit, hatasız ve duyarlı oluşu nedeniyle sitogenetik testin yerini almıştır (176). Çünkü taşıyıcı kadınların tümü ve normal taşıyıcı erkekler sadece DNA testi ile belirlenebilmektedir. Ancak karyotip tayini, mental handikap için önerilen rutin diagnostik bir çalışma olarak göz ardı edilmemelidir (173).

Frajil X mutasyonunun moleküler tanı testi, iki metod kullanılarak yapılmaktadır.

I. metod doğrudan genomik Southern blot analizidir.

Bu yöntemde CGG tekrar bölgesine yakın olan bir prob kullanılır.

II. metod, polimeraz zincir reaksiyonudur.

Her iki metod ile de *FMR1* 'in triplet tekrar bölgesinin uzunluğu belirlenebilir (55,177, 178).

Etkilenen bireylerde, nadir olarak gen içinde ya bir nokta mutasyonu veya gen bölgesinin bir kısmı veya tümünün delesyona uğradığı belirlenmiştir (102). Eğer hastada bu nadir görülen delesyon tipi şüphe ediliyorsa tanı için daha detaylı moleküler incelemelere ihtiyaç vardır. Böyle vakalarda sendromun temelini oluşturan *FMR1* gen ekspresyonu yoktur. Tekrar amplifikasyonu mutasyonu, sendromun en yaygın moleküler temelini oluşturmaktadır (55).

2.5.2.1. Altın Standart-Southern Blot

Southern blot, spesifik restriksiyon enzimlerle genomik DNA'yı parçalayarak ve gene spesifik problarla hibridizasyon temelli bir tekniktir, tek deneyde *FMR1* mutasyonların

size/boyutlarını ve metilasyon durumlarını belirleme avantajını sağlar. Ancak yoğun emek isteyen ve sonuç verilmesi bir kaç gün süren bir yöntemdir. Açıkcası küçük premutasyon (55-65 tekrarlı) ile büyük intermedit/ara alelleri (45-54 tekrarlı) ayırt etmek her zaman mümkün değildir. Bu gibi durumlarda PCR bazlı metodlar kullanılarak küçük mutasyonları amplifiye ederek yüksek çözünürlük jel elektroforezi platformunda (kapiller yada geleneksel) yüklenebilir (136).

İyi bir 20 cm'lik *Eco*RI-*Eag*I Southern blot, genellikle 2.8 kb bant aralığı içinde 45 bp (15 üçlü tekrara) bir çözünürlüğe/resolution sahip olur ve bir normal kontrol (30 üçlü tekrar) varlığında bitişik konumdadır, 55 üçlü tekrarlı küçük premutasyon için mükemmel hassasiyet sağlar. Southern blot tam olarak mutasyon boyutunu belirlememesine rağmen, çoğaltılmamış genomik DNA kullanılarak örnekteki *FMR1* alel boyutu dağılımını güvenilir bir biçimde tahmin-temin etme avantajına sahiptir (136). Southern blot tekniğinin rutinde kullanımı itiraz edilmiştir (179) çünkü bu analiz tipi, normal alel boyutlarını ve full mutasyon içeren mozaizimlerde veya heterojen smear gibi mutasyonların düzensiz türlerini tespit etmek için laboratuarda önemli deneyimi olan kişilerin çok yüksek bir kompleks düşünülmelidir. Önemli bir not; ayrıca düzensiz genotipler PCR temelli metotlar içinde sıkıntı vericidir. Bununla birlikte, Southern blot hala *FMR1* moleküler tanı yöntemlerinin altın standart olarak yönlendirilen laboratuarlarının büyük çoğunluğu tarafından kabul edilir ve bu düzensiz, karmaşık ve seyrek desen gösteren mutasyonları tespit etmek için de kullanılır (136).

Analitik ve hassasiyet bakımından; yüksek kaliteli bir Southern blot analizi (önemli background/arka alan olmadan ve güçlü bir sinyal ve uygun, kaliteli kontrolü ile) FXMR lokusunun büyüklüğünü ve metilasyon durumunu ve bu hastalığa neden olan *FMR1* dinamik mutasyon için %98 duyarlılığa ve %100'e yakın spesifitiye sahip olduğuna inanılmaktadır (136, 180).

2.5.2.2. PCR-Bazlı *FMR1* Genotipleme Metotları

PCR tekniği basitlik ve seri şekilde hızlı olması nedeniyle genel olarak moleküler tanı için tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte *FMR1* mutasyonları GC açısından çok zengin (çoğu zaman hemen hemen saf >200 CGG tekrarları çok uzun uzandığı gösterir) oldukları için PCR ile amplifiye edilmesi çok zordur. Bundan başka, yüksek ölçüde heterojen bir büyüklükte mutasyonların varlığında PCR kısa alellerin

amplifikasyonunun lehine olacaktır ve bu mutasyonların boyut dağılımının değerlendirilmesinde güvenilir olmayan bir ön yargı üretir. Southern blot'ın duyarlılık ve özgüllüğü ile rekabet edebilmek ve hatta *FMR1* mutasyonların metilasyon durumunu belirlemek için kayda değer çaba ile PCR yöntemlerinin geliştirilmesinde yatırım yapılmıştır. Bu deneyler PCR yöntemlerinde önemli gelişmelere neden olmuş ve tanı kitleri oluşturulmuş (örneğin Quest Diagnostics, Celera Genomics, Abbott ve Assuragen) ve pazarlama ile bir dizi ticarileşme yolunu açmıştır, ancak şu an için oluşmuş tanı kitleri yaygın olarak kabul edilmiş görünmüyor (136). Bir çok laboratuarda birinci baypas gibi PCR-bazlı analiz kullanılır ve gözlemlenen bir yada fazla şüpheli >50 tekrar uzunluktaki aleller için Southern blot analizi yapılır (136, 181). *FMR1* anormal bir genotiplendirme tespit edilmemesi sebebiyle, duyarlılık ve güvenirlik oranları henüz yayınlanmamıştır. PCR-temelli kitler veya testler, tam mutasyon (özellikle mozaik) olan olguların tespitinda kaçırma riskimiz olabilir ve şimdilik güvenirlik oranları net değildir (136).

2.5.2.2.1. *FMR1* Genotipleme Karmaşıklığı

FMR1 genin 5'UTR içinde üçlü tekrar genişlemesi FXS'nun çoğu durumda beklenen FMR1 gen mutasyonun ana tipi olmasına rağmen, açılımlar herhangi bir bireyde çeşitli biçimler alabilir ve laboratuarda kullanılan testin yanlış negatif oranını en aza indirmek için mutasyon desenlerinin belirli türlerini aramak ve akılda tutmak gerekir. Yönergelerde klinik laboratuarlar çok iyi *FMR1* genotiplendirilmesi gerçekleştirse de nadir gözlenen ve görülebilir tüm çeşitli mutasyon desenleri ile tanışmış olması tavsiye edilir (136).

FMR1 genotipleme karmaşıklığı aşağıdaki olayları içerir (136);
CGG zengin üçlü genişleme boyutunda somatik heterojenitesi (mozaiklik),
FMR1 genin anormal metilasyon varlığı,
Metilasyon paternlerin somatik heterojenitesi (mozaikliği),
Prenetal örneklerinde eksik metilasyon paternlerin olması,
Kadınlarda normal bir X kromozomunun etkileşimi,
PCR deneylerinde ki zorluklar,
Özellikle kadın örneklerinde, Southern blot ve PCR teknikleri ile yapılan duyarlılık analizlerinde.

2.5.2.2.1.1. Size/Boyut Mozaisizm

FMR1 full mutasyonlar bilinen heterojeniyle 1991 yılında tanımlanmasından bu yana kadar aynı tanım kullanılmıştır (57,180). Öyle görünüyor ki, full mutasyonlu kişilerin önemli bir bölümü mozaisizmin bazı derecesini göstermektedir (182, 183). Full mutasyonlar her zaman anneden (premutasyon veya full mutasyon ikisinden biri) kalıtabildiği göz önüne alındığında zigottaki genişlemiş *FMR1* alellin miras/kalıtımla kazanılmış olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, full mutasyonu olan bireylerin dokularda görülen mutasyon heterojenitesi somatik dengesizlik nedeniyle olduğu düşünülmektedir (184). Southern Blot jellerde kullanılan etidyum bromürün, DNA'nın yönünü değiştirmesine/sapmasına neden olması ile, yapay bir *FMR1* mutasyonların belirgin heterojen artışına neden olduğu bildirilmiştir (185). Bununla birlikte, yine de heterojenite etidyum bromür dışında boyama teknikleri (yayınlanmamış veriler) kullanıldığında bile görülmektedir ve bu nedenle bu olasılık doğrulanmamıştır (136).

Hatta full mutasyon genotipli bir erkek, normal alel ile 20-30 tekrar arasında değişen ve >700 üçlü tekrarlı çok büyük genişlemelere kadar farklı hücrelerde farklı mutasyon boyutları barındırabilir (57, 183, 186). Bu, tabii ki, çok büyük olanlardan daha küçük boyutlu alellerin daha çok amplikonların oluşma olasılığı nedeniyle, özelliklede genişlemiş dizilerde PCR'a güvenme açısından genotiplendirme yöntemleri için bir meydan okuma teşkil eder. Southern blot, mozaisizminin tespiti için daha güçlü olmasına rağmen maliyeti, rutin tanı için PCR tabanlı testlere göre daha yüksektir. Örneğin, Quebec kamu sağlık ortamında, bir Southern blot tabanlı test maliyeti ABD'de 450-750 US$ yerine 75 US$ gibi düşük olabilir (The National Fragile X Foundation). Böyle bir bağlamda, klinik laboratuvarlar *FMR1* üçlü tekrar genişlemesini tespiti için kendi standart test olarak Southern blot kullanmayı seçebilir (136).

Full mutasyonlar nadiren homojen bir somatik modeli gösterir ve çoğu kez bir Southern blot üzerinde simir olarak tespit edilir (180). Premutasyon daha istikrarlı ve bir Southern blot üzerinde tek bant olarak görünür. Ancak, tersi doğru değildir; diğer bir deyişle, full mutasyonu olan bireylerin önemli bir bölümü aynı zamanda, bazı hücrelerde premutasyon gösterecektir. Premutasyon gösteren hücrelerin oranı, full mutasyonunun geri kalanından %50'si kadar yüksek olabilir. Bir çok full mutasyonlu heterojen hücre kümeleri varken özellikle erkeklerde normal boyutlu alel barındırdığında Southern blot

analizi için en zor durumlardan bir tanesini oluşturur. Bir premutasyon taşıyan kadın inaktif X kromozomu üzerinde bir premutant alel taşıdığında sadece iki bantlı bir görünümde normal bir bant deseni görülür, yine Southern blot için diğer zor bir durumdur (Aktif X kromozomu üzerinde normal alelin ve inaktif X kromozomu üzerinde premutant alelin olması durumu). Premutasyon küçük ise bu gibi durumlarda, bu *Eco*RI/*Eag*l veya *Hind*III/*Eag*l restriksiyon enzimleri kullanılarak Southern blot üzerinde normal bir aleli ayırt etmek zor olabilir (136).

2.5.2.2.1.2. Metilasyon Mozaisizm

Size/Boyut farklılığına ek olarak full mutasyonlar bazen genomik fragmanların analiz freksiyonu büyük metillenmemiş genişlemeler ile metillenmiş patern heterojenitesi gösterir (136, 182, 186). Bu "metilasyon mozaik" olarak adlandırılan (boyut mozaik aksine) ve Southern blot ile tespit olarak popülasyonda bir full mutasyonlu örneklerin yaklaşık %10'nu temsil eder. Lökosit içinde alellerin önemli bir bölümü metillenmemiş olduğu zaman, hatta büyük aleller için fenotipi çok daha az şiddetli olduğu rapor edilmiştir (17, 136, 186, 187, 188).

2.5.2.3. Laboratuvar Testlerinde Yeni Gelişmeler

FXS için geçerli moleküler tanı yöntemlerin yarattığı kısıtlamalar ve zorluklar basitleştirilmesi veya FXS durumlarda (inaktive edilmiş *FMR1* geni eksikliği FMRP) veya etkilenmemiş taşıyıcı (premutasyon) ya tanımlanmasını otomatikleştirme amacıyla, birçok alternatif yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır. Yeni testlerin çoğu güncel altın standart yöntemi ile karşılaştırılıp iyice değerlendirilmemiştir ve henüz bir çok klinik laboratuar tarafından kabul edilmemiştir. Bu zorlu mutasyon profillerini gösteren örneklerin bağlamında özellikle böyledir (normal bir alelin ve full mutasyon mozaikleri ya da premutasyon ve full mutasyon mozaikleri gibi) ve bu gibi durumlarda tanısal performans belirsizliğini korumaktadır (136).

2.5.2.3.1. İmmünohistokimya

İyi karakterize, anti-FMRP antikorların mevcudiyeti, kan yayması (veya saç köklerinin) immünohistokimyası deneyleri kullanma olasılığını yükseltmiştir ve böylece FMRP-pozitif hücrelerin oranına göre FXS tanısı konulabilmektedir (189, 190, 191, 192). Daha

yakın zamanlarda, FMRP için bir nicel analiz yöntemi olarak öne sürülmüştür (193), ancak tam kanda FMRP seviyeleri tahlil hassasiyetinin altında olması yüzünden daha büyük miktarda FMRP karşılaşılabilir olması yüzünden moleküler biyoloji deneyleri için araştırma aracı olarak kalmıştır (136).

2.5.2.3.2. Optimal PCR Tahlilleri ve MS/PCR

Kayda değer çabalar ile daha büyük sayıda üçlü tekrarlı *FMR1* alellerinde daha iyi bir verim elde etmek için PCR tahlilleri geliştirip optimize edilmelidir (136, 194, 195). PCR deneyleri, aynı zamanda, kütle spektrometrisi gibi yeni yöntemlerle saptama ile kombine edilmiştir (136, 196).

2.5.2.3.3. Southern Blot Kapilleri ile PCR Kombinasyonu

Yeni metodolojik algoritmalar PCR sonrası kapiller Southern blot ile takip edilmesini önerilmiştir (197) .

2.5.2.3.4. TRP-PCR/Üç Tekrarlı Primer-PCR

Üç tekrarlı primer PCR (TRP PCR) bir üçlü-tekrar bölgesi içinde bağlayıcı kimerik bir primer ile oluşturulan PCR ürünleri hızlı algılamasını sağlar (77).

Büyük genişlemelerin hassasiyeti nedeniyle yüksek vaat gösteren yöntemler TRP-PCR içerir. Bu yaklaşımın farklı varyasyonlar önerilmiştir (198, 199, 200). Ancak, bu yöntemler *FMR1* metilasyonunun belirlenmesine izin vermez (136).

2.5.2.3.5. Metilasyon Spesifik PCR/ MS-PCR

Southern blot analizi yanı sıra birçok yöntem metilasyon belirlemek için tarif edilmiştir. Metilasyon spesifik PCR farklı muamele gerektirir (77). Alel-spesifik PCR ve ardından metilasyon spesifik restriksiyon enzimlerle muamele ederek oluşan PCR ürünlerini yüksek çözünürlükteki kapiller elektroforeze (CE) yüklenir (207, 208). Bu yöntem, metilasyon durumunu değil, aynı zamanda da 250 tekrarlı *FMR1* alel boyutuna kadar tespit edebilir. Ancak >250 tekrarlı aleller için Southern blot ile doğrulamak gerekir (77).

Metilasyon-spesifik PCR bir tür bisülfit bazlı PCR gibi metile *FMR1* alel için önerilmiştir (4, 201, 202, 203, 204, 205). Bu tür bir yöntemle, kurutulmuş kan lekelerinden izole edilmiş >36000 de tanımlanan yeni doğmuş örneklerde kullanılmıştır. Bu yöntem, anormal metile olan full *FMR1* mutasyonlu erkeklerde yüksek duyarlılık ve özgüllük içeriyormuş gibi görünmektedir (136).

2.5.2.3.6. MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi

Son zamanlarda, klasik teşhis deneyleri ile ölçüldüğü haliyle *FMR1* CpG adasının metilasyon durumu ile yüksek derecede korelasyon gösteren "frajil X ile ilişkili epigenetik elemanları" matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon zamanlı flight/menzil/uçuş kütle spektrometre (MALDI-TOF MS) tespit deneyidir. Yazarlar, yüksek verimlilik ve düşük maliyet ile metillenmiş *FMR1* allelleri için bu MS testin özgünlüğü, FXS tanı ve nüfus taraması için ilginç bir araç olacağını öneriyorlar/söylüyorlar (136).

2.5.2.3.7. Diğer Metodlar

Metillenmiş frajil X alelli erkekleri tanımlamak için multipleks ligasyon prob amplikasyon metodu tanımlanmıştır (203). Bu yöntemde, sekans spesifik problar, metillenmiş ve metillenmemiş alellere hibridize edilir. Aynı zamanda problar bağlanırlar ve bir metilasyon duyarlı restriksiyon endonükleazı ile parçalanır. Evrensel bir PCR primer seti sadece probların bağlandığı yeri amplifiye ederek bağlanmış ve parçalanmamış metillenmiş alelleri gösterir (77).

Metilasyon spesifik PCR kullanılarak Real-time PCR'da Taqman kimyası ve erime eğrisi/melt-curve analiz yöntemi ile analizin yapılmasıdır. TaqMan kimyası ayrı ayrı metillenmiş ve metillenmemiş spesifik aleller amplifiye edilerek ve amplifikasyon döngü eşiklerine dayalı bir oransal bilgi sağlar (4). Erime analizi kullanılarak, metillenmiş ve metillenmemiş alelleri eş zamanlı olarak amplifiye edilir ama GC içeriği farklılığı nedeniyle metillenmiş ve metillenmemiş alel arasında erime sıcaklığındaki farklılıklar çözümlenir (206). Bu yöntem metillenmiş alellerin saptanmasında erkeklerde yüksek analitik duyarlılık ve spesifiktir fakat kadınlarda daha az spesifik ve duyarlıdır (77).

2.6. GENETİK DANIŞMANLIK

2.6.1. Frajil X Sendromun ve *FMR1* Gen Mutasyonların İnsidansı

FXS mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır. Toplumda ki sıklığı erkeklerde yaklaşık 4000'de 1 ve kadınlarda yaklaşık 8000'de 1 olduğu bilinmektedir (3, 4, 5, 6, 7).

Sitogenetik testlere dayanarak yapılan FXS'lu bireylerin ilk tahmini sıklığı, erkeklerde 1000'de 1 - 2600'de 1 ve kadınlarda 2000'de 1 - 4000'de 1 idi (209, 210).

FXS erkeklerin tahmini yaygınlığı 1991 yılından yani *FMR1* geninin izolasyonundan bu yana kadar aşağıya yönlü revize edilmiştir. Mental retardasyonlu erkeklerde FXS tanısı teyidi için FRAXA sitogenetik tespitine dayanarak yapılan ve sendromdan etkilenen erkeklerin özgün/orjinal tahmin sayısı 100,000'de 80 olarak (Frajil X literatürlerinde hala sık sık kullanılmaktadır) bildirilmiştir. Büyük olasılıkla mental retardasyonlu bireylerde tesadüfü bir şekilde FRAXA yakınlarındaki diğer kromozomal frajil bölgelere (FRAXD, FRAXE, FRAXF gibi) sahip olan bireylerinde ilk tahminlere dahil edilmiştir (Xq27-q28 bölgesinde yakın bulunması nedeniyle bu frajil bölgelerin sitogenetik ayırımı zordur). Daha yakın dönemdeki *FMR1* moleküler genetik test çalışmaları ile FXS'dan etkilenen erkek bireyler için tahmini sıklığı 100,000'de 16-25 olarak bildirilmiştir (Klinik bulguda mental retardasyon özelliği olan bireylerde) (211).

2.6.1.1. Full Mutasyonların İnsidansı

Full mutasyona sahip erkeklerin genel popülasyonda görülme sıklığı ~ 4000'de 1 olarak tahmin edilmektedir. Kadınlarda görülme sıklığı ise erkek bireylerde görülme sıklığının yarısı yada ~ 8000-5000'de 1 olarak tahmin edilmektedir (77, 212).

Kuzey amerika'da yenidoğan bireyler üzerinde yapılan iki büyük çalışmada ABD'li erkeklerde 5161'de 1 (4) ve kanada'lı erkeklerde 6209'da 1 olarak (213) prevalansı belirlenmiştir (77).

Bütün büyük etnik grupların ve ırkların *FMR1* CGG bölgenin genişlemesine duyarlı olduğu anlaşılmaktadır (77, 212, 214). Kapsamlı bir literatür incelenmesinde genel

ABD nüfuslu Kafkas erkeklerinde 3717'de 1 ile 8198'de 1 arasında değişen FXS'lu bireyler gözlenmiştir (3,77). Metropolitan Atlanta da 4 yıl boyunca yürütülen bir başka çalışmada, FXS prevalansı Kafkas ırkı erkekler arasında 3717'de 1 ve Afrika kökenli Amerikalı erkekler arasında 2545'de 1 olarak tahmin edilmiştir (215). Fransız Batı Hint Adaları'nda bir Afro-Karayip nüfusun FXS prevalansı (2539'da 1) Atlanta Afrikan kökenli Amerikalı prevalansına yakındır (77, 216). İspanyada 5267 yenidoğan erkek bireylerde yapılan çalışmada full mutasyon sıklığı 2633'de 1 olarak bildirilmiştir (217).

2003 yılında bir çok ülkelerin katılımıyla derlenen ve Sağlık Teknolojisi Değerlendirme (Health Technology Assessment-NHS R&D HTA Programme) Programında yürütülen FXS tarama çalışmasında full mutasyon sıklığı aşağıdaki tablo 2.12'de gösterilmiştir (217).

Tablo 2.12. Öğrenme güçlüğü olan kişilerde FXS yaygınlığı (217)

Cinsiyet	Öğrenme Durumu	Taranan Sayı	Full Mutasyon
Karışık	Öğrenme güçlüğü var	14479	285
Karışık	Nedeni bilinmeyen öğrenme güçlüğü var	2198	7
Toplam		**16677**	**292**
Kadınlarda	Öğrenme güçlüğü var	7215	48
Kadınlarda	Nedeni bilinmeyen ile öğrenme güçlüğü var	1462	9
Toplam		**8677**	**57**
Erkeklerde	Öğrenme güçlüğü var	10899	187
Erkeklerde	Nedeni bilinmeyen ile öğrenme güçlüğü var	5107	180
Toplam		**16006**	**367**
Genel Toplam		**41360**	**716**

Bu programda yer alan ve Türkiye'deki full mutasyon sıklığı bilgileri 2000 yılında Core ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada öğrenme güçlüğü olan kadınlar da 25'de 1 erkeklerde ise 95'de 5 olarak (218), 1999 ve 2000 yılında Tunçbilek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise nedeni bilinmeyen öğrenme güçlüğü olan kadınlarda 13'de 0 erkeklerde ise 166'da 5 (219) ve 300'de 5 (220) olarak bulunmuştur (217).

2007 yılında Kaliforniya Nichols Enstitüsü, Genetik Bölümünde Charles M. Strom ve arkadaşları tarafından 1992-2006 tarihleri arasında 119,232 FXS şüphesiyle gelen

hastalardan moleküler test yöntemi ile *FMR1* genindeki CGG tekrar sayıları çalışılarak tablo 2.13'de ki mutasyon sıklığı elde edilmiştir (221).

Tablo 2.13. 1992 ve 2006 yılları arasında yapılan 119,232 FMR1 testlerin özeti (221)

	Kadın Hastalar (%) (Ortalama yaş 28.3)	Erkek Hastalar (%) (Ortalama yaş 8.1)
Full mutasyon, >200 tekrar	364 (% 0.61)	862 (%1.4)
Premutasyon, 55-200 tekrar	1,008 (% 1.7)	333 (% 0.56)
Gray Zone, 45-55 tekrar	1,283 (% 2.2)	518 (%0.87)
Normal, <45 tekrar	56,870	57,994
Toplam	**59,525**	**59,707**

2.6.1.2. Premutasyon İnsidansı

Etkilenmemiş *FMR1* mutasyon taşıyıcıları (premutasyon) olan kadınların sıklığı yüksektir.

Premutasyon alelleri genel popülasyona bakarak yaklaşık görülme sıklığı kadınlarda 250-130'da 1, erkeklerde ise 810-250'de 1 olarak bildirilmiştir (217).

Kanada da 2009 yılında ve büyük ölçekli çalışmada 21,411 (yenidoğan anne) kadın örneklerinde 549'da 1 premutasyon sıklığı görülmüştür (222). 2007 yılında bir İsrail çalışmasında 36,483 kadın örneklerinde premutasyon sıklığı 158'de 1 görülmüştür (223). Premutasyon frekansı diğer nüfus gruplarıyla farklılık gösterebilir bir Japon çalışmasında 370 kadın örneğinde premutasyon sıklığı 370'de 0 olarak (224) ve Tayvanlı kadınlar üzerinde çalışılan iki farklı çalışmada 1,002'de 0 (225) premutasyon sıklığı bulunurken diğer çalışmada 300'de 1 (226) olarak bulunmuştur. 2007 yılında sonuçlanan 119,232 kişi üzerindeki çalışmada (tablo 2.13) premutasyon sıkılığı kadınlarda %1.7 bulunurken erkeklerde %0.56 bulunmuştur (221).

Premutasyon aralığı 55-200 tekrar olarak kabul edilen çalışmalarda premutasyon sıklığı kadınlarda 151'de - 259'da 1 (Kuzey Amerika), 113'de 1 (Israil) (227, 228, 229) erkeklerde ise 468'de 1-813'de 1 (229, 230) olarak bulunmuştur (140). Tablo 2.14'de premutasyon aralığı 55-200 tekrarı baz alan bazı yayınlar ve premutasyon sıklığı yer almaktadır.

Tablo 2.14. Premutasyon sıklığı ile ilgili yapılan/yayınlanan çalışmalar (229)

Referans	Preveansı (İnsidansı)	Tespit edilen Premutasyon Sayısı	Örnek Sayısı	Bölge	Örnek tipleri
Erkeklerde					
Fernandez-Carvajal ve arkadaşları [2009]	251'de 1	21	5,267	İspanya	Yenidoğan taraması
Dombrowski ve arkadaşları [2002]	813'de 1	13	10,572	Fransız asıllı Kanadalılar	Kan Numunesi
Rife ve arkadaşları [2003]	1233'de 1	4	5,000	ispanya	Yenidoğan taraması
Tzeng ve arkadaşları [2005]	1674'de1	6	10,046	Tayvan	Yenidoğan taraması
Otsuka ve arkadaşları [2010]	_	0	513	Japonya	Sağlıklılı gönüllüler
Song ve arkadaşları [2003]	643'de 1	31	19,929	_	Literatür taraması
Kadınlarda					
Toledano-Alhadef ve arkadaşları [2001]	113'de1	113	14,334	İsrail	MR aile öyküsü olmayan gebelerde
Berkenstadt ve arkadaşları [2007]	157'de 1	255	40,079	İsrail	MR aile öyküsü olmayan gebelerde
Rousseau ve arkadaşları [1995]	259'da 1	41	10,624	Fransız asıllı Kanadalılar	Kan numunesi
Otsuka ve arkadaşları [2010]	_	0	324	Japonya	Sağlıklı gönülüler
Song ve arkadaşları [2003]	149'da1	321	47,712	_	Literatür taraması

Literatür incelemesinde tüm kombine ataksi durumlarda FXTAS'ın *FMR1* premutasyonlu olma ihtimali erkeklerde % 1.3 kadınlarda ise % 0.24 olarak bildirilmiştir (231).

POF olan kadınlarda *FMR1* premutasyon sıklığı son zamanlarda 1/7 olarak ve genel populasyonda 1/15 olduğu gösterilmiştir (232).

FXPOI kadın ile serebellar ataksi olan erişkin erkek olan FXTAS vakaların *FMR1* premutasyonlu olma insidansı sırasıyla % 4-6 ve % 2' dir (77, 233, 234).

2.6.1.3. Ara Alellerin (intermediate- sınır-grey zone) İnsidansı

Ara aleller genellikle tesadüfen gelişimsel gecikme ya da otistik bir çocuğun tanı konulma sırasında aile taramalarında, genel nüfus prenatal tarama testlerinde veya kısırlık değerlendirilmesin karşımıza çıkar. Ara alellerin (intermediate- sınır-grey zone) genellikle kadınlarda görülme sıklığı daha yüksektir, kadınlarda görülme olasılığı yaklaşık 35'de 1 - 57'de 1 olarak bilinmektedir (140, 229, 235).

Tablo 2.15. Ara (intermediate- sınır-grey zone) sıklığı ile ilgili yapılan/yayınlanan çalışmalar (229)

Referans	Preveansı (İnsidansı)	Tespit edilen Ara Alel Sayısı	Örnek Sayısı	Bölge	Örnek tipleri	Ara Alel Aralığı
Erkeklerde						
Fernandez-Carvajal ve arkadaşları [2009]	26'da 1	199	5,267	İspanya	Yenidoğan taraması	45-54 tekrar
Dombrowski ve arkadaşları [2002]	294'de 1	36	10,572	Fransız asıllı Kanadalılar	Kan Numunesi	34-53 tekrar
Tzeng ve arkadaşları [2005]	1,674'de 1	6	10,046	Tayvan	Yenidoğan taraması	45-54 tekrar
Otsuka ve arkadaşları [2010]	103'de 1	5	513	Japonya	Sağlıklılı gönüllüler	40-50 tekrar
Peñagarikano ve arkadaşları. [2004]	32'de 1	5	158	Bask Kabilesi	İlgisi olmayan sağlıklı bireyler	40-54 tekrar
Kadınlarda						
Rousseau ve arkadaşları [1995]	128'da 1	83	10,624	Fransız asıllı Kanadalılar	Kan numunesi	34-53 tekrar
Otsuka ve arkadaşları [2010]	324'de 1	1	324	Japonya	Sağlıklı gönülüler	40-50 tekrar

2007 yılında sonuçlanan 119,232 kişi üzerindeki çalışmada (tablo 2.13) ara alel (intermediate- sınır-grey zone) sıkılığı kadınlarda % 2.2 bulunurken erkeklerde % 0.87 bulunmuştur (221).

2012 yılında Amerika'da Seltzer ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, ara alel aralığını 45-54 tekrar olarak baz alınan insidans çalışmasında kadınlarda görülme sıklığı 35'de 1 (% 95 CI: 1/29-1/44) erkeklerde ise 42'de 1 (% 95 CI: 34/1-54/1) olarak bildirmiştir. Görülme sıklığını oranlarsak kadınlarda görülme sıklığı erkek bireylerde görülme sıklığının 1.2 katı kadar olduğunu görürüz. Yine aynı çalışmada ara alel aralığını 41-54 tekrar aralığını baz alıdığında kadınlarda görülme sıklığı 13'de 1 (% 95 CI: 1/11-1/15) erkeklerde ise 21'de 1 (% 95 CI: 1/18-1/25) olarak bildirilmiştir. Yine görülme sıklığını oranlarsak kadınlarda görülme sıklığı erkek bireylerde görülme sıklığının 1.6 katı kadar olduğunu görürüz (229). Tablo 2.15'de çalışmalarda farklı ara alel aralığı baz alınmış bazı yayınlar ve ara alel (intermediate- sınır-grey zone) sıklığı yer almaktadır (229).

2.6.2. Frajil X Sendromunda Nomenklatür

Dördüncü Uluslararası Frajil X çalıştayında Frajil X kromozom eldesi ve analizlerinde alınan ortak kararlar ile Xq27.3'deki frajil nokta band analizleriyle doğrulanarak,

ISCN nomenklatüre göre;

- ✓ hasta erkek 46,Y,fra(X)(q27.3)
- ✓ taşıyıcı/hasta kadın 46,X,fra(X)(q27.3) olarak ifade edilerek ve yüzdelik oranıda belirtilerek raporlandırılır.

Standart isimlendirme kullanımı sağlık hizmeti sağlayıcıları için sonuçlarının doğru iletişimi açısından önemlidir ve ACMG (265) ve CAP(266) tarafından tavsiye edilmektedir (77).

Kısa tekrar dizileri için isimlendirme konusunda İnsan Genomu Varyasyon Derneği (Human Genome Variation Society) önerilerine göre;

- ✓ FMR1 üçlü tekrar (kodlayan DNA sekans referansı NM_002024.5'na göre) için c.-129CGG[X] olarak ifade edilmeli.

- -129 ile belirtilen ifade değişken tekrarın başlangıç noktasını gösterir
- CGG ise tekrar biriminin dizisini gösterir.
- X ifadesi mevcut olan üçlü tekrar sayısını belirtir.

Örneğin; 100 tekrarlı bir premutasyonlu hastada sonuç yazılırken c.-129CGG[100] diye belirtilmelidir.

- Tekrarın tam boyutu tespit edilemiyorsa, belirsizliği belirtmek için köşeli parantez yerine normal parantez olarak yazılır , c.-129CGG(X) şeklinde.

Örneğin; 100 yakın bir tekrarı var ama net bir tekrar değil bu hastada sonuç yazılırken c.-129CGG(100) diye belirtilmelidir (267).

İnsan Genomu Varyasyon Derneği (Human Genome Variation Society) tarafından şuan için size (boyut) mozaisizm ve tek nükleotid tekrar mutasyonlar için standart isimlendirme önerileri yoktur. Bunun için laborant/biyologların ve klinisyenlerin ortak oluşturdukları isimlendirmeyi kullanmaya devam edilebilir (77).

Bu yüzden, karışıklığı önlemek için, standart isimlendirmeyi kullanırken parentez içinde veya raporda bu standart isimlendirmeyi açıklayan bir metin yada önceden ortak kullanılan isimlendirme de /açıklama da yazılmalıdır (77).

2.6.3. FXS'da Prenatal ve Pre-implantasyon Genetik Tanı

FMR1 mutasyonların amniyosentez ve koryon villus örnekleri (CVS) ile prenatal tespiti güvenilir ve doğru sonuçlar elde edilir (268). *FMR1* metilasyon, gebeliğin 10-12 haftasında plasenta dokusunda eksik olmasına rağmen metilasyon modelleri genellikle yorumlanması ve pre ve full mutasyonları ayırt etmek için kullanılabilir. Nadir durumlarda, takip edilen hastalarda amniyosentez ile metillenmemiş full mutasyonun varlığını ya da yokluğunu doğrulamak için gerekli olabilir (140).

Pre-implantasyon genetik tanı (PGD), evlat edinme ve gamet bağışında bulunurken bile diğer önce ve sonra gebe kalma opsiyonu içinde, çeşitli *FMR1* gen mutasyonları ile çocuk sahibi olmak isteyen riskli çiftler için kullanılabilir. FXS için PGD, PCR ve bağlantılı polimorfik işaretlemeler kullanılması oositin CGG tekrarının

amplifikasyonuna ve *FMR1* alellerini ayırt edilememesi gibi zorluklar yönteme engel olabilir (269).

2.6.4. Kalıtım Şekli ve Kalıtılabilirlik Oranı/Tekrarlama Riski

FXS'dan sorumlu olan gen, X kromozomu üzerinde yer aldığı halde bu sendromun kalıtımı klasik X' e bağlı kalıtım modeline uymamakta ve çok özgün karakterler göstermektedir (236).

Sherman ve arkadaşları tarafından (1985) frajil X ailelerinde yapılan pedigri incelemelerinde, hastalığın görülme olasılıkları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Klinik olarak etkilenmiş ve sitogenetik olarak gösterilmiş erkek olguların annelerinin babaları fenotipi ve sitogenetik olarak normaldi. Normal taşıyıcı erkek (NTM) olarak isimlendirilen bu erkeklerin erkek çocukları normal iken, kızların erkek çocuklarının %79'unda, erkek kardeşlerinde ise %18 oranında hastalık riski olduğu bildirildi ve bu durum Opitz (l986) tarafından "Sherman paradoksu" olarak tanımlandı.

Sherman ve arkadaşlarının (1988) yaptıkları diğer bir inceleme sonuçlanna göre, frajil X taşıyıcısı annelerin fenotipine bağlı olarak da mental retardasyon risklerinin değiştiği, mental retardasyonlu bir taşıyıcının oğlunun mental retardasyonlu olma olasılığının %50 buna karşın kız çocuklarının hastalık riskinin %28 olduğu, normal taşıyıcı kadınların erkek çocuklarının hasta olma olasılığının %38 olduğu, kız çocukları için riskin %16 olduğu bildirildi. Frajil X geninin moleküler yapısının belirlenmesi ile "Sherman Paradoksu" aydınlanmış oldu.

Frajil X mutant genini taşıyan kızlar ve anneleri, sağlam bir X kromozomları olduğundan sendromdan erkekler kadar etkilenmezler. Ancak, sağlam X kromozomunun non random inaktivasyonuna bağlı olarak, yaklaşık üçte birinde öğrenme güçlükleri, mental retardasyon, davranış bozuklukları ve otistik benzeri semptomlar görülmektedir (12).

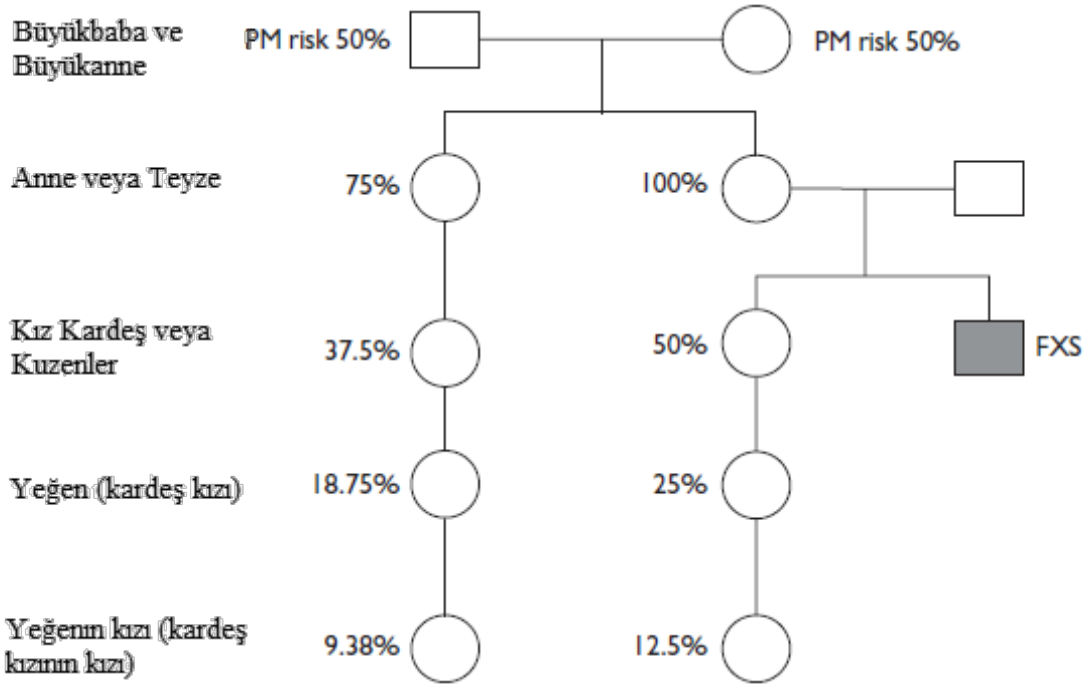
Bu sendromun etkileri her jenerasyonda artarak (antisipasyon) devam etmektedir (237).

FXS'lu ailelerde genetik danışmanlık verebilmek için, frajil X mutasyonu taşıyıcılarında diagnostik etkisi olan CGG tekrar uzunluğunun bilinmesi önemlidir.

X kromozomunun biri üzerinde *FMR1* premutasyonuna sahip bir kadının gelecek nesillere mutasyonu geçirme riski % 50 dir. Premutasyon stabil değildir ve anneden çocuğa geçerken, premutasyon olarak kalır veya full mutasyona genişleyebilir. Premutasyon taşıyan çocuklar zihinsel olarak etkilenmezler. Buna karşın full mutasyonlu çocukların mental yetersizlik göstermeleri riski vardır.

FXS aile üyelerinin içinde premutasyon (PM) riski PM mekanizması ve nesilden nesile full mutasyon (FM) geçişlerine göre tahmin edilebilir. Pembry ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Şekil 2.17 de FXS hastaların kadın yakınları arasında taşıyıcı olma tahminleri verilmiştir (217).

Teorik olarak full mutasyona sahip kadının her gebelikte mutasyonu geçirme riski % 50 dir. Full mutasyon taşıyan erkeklerin mental retarde olduğu belirlenmiştir. Full mutasyon taşıyan kızlar X inaktivasyonundan dolayı yaklaşık olarak % 50 etkilenmeyebilir. Ancak öğrenme güçlüğü ve heyecan problemi vardır. % 50'si sınırda IQ veya mental retardasyona sahiptir (238). Ve yine teorik olarak premutasyon olan kadınların FXS mutasyonu geçirme olasılığı % 50'dir. Fakat bu olasılık premutasyon olan annenin CGG tekrarının büyüklüğüne ve bu tekrarın stabilitesine bağlı olarak değişir. Premutasyon bir annenin CGG tekrar büyüklüğü 90 ve üzeri ise çocuğun full mutasyon olma riski yaklaşık %100'dur fakat 55-59 CGG tekrarına sahip bir premutasyon annenin full mutasyon çocuğunun olma riski yaklaşık %3'tür (239). Bir de bu CGG tekrarları arasındaki AGG dizisine bağlıdır, AGG dizisi ne kadar çok ise CGG dizisi o kadar stabildir. Full mutasyona genişleme riski olan ve bilinen en küçük tekrar sayılı alel 56 CGG tekrarından oluşmaktadır (77, 80). 2003 yılında Nolin ve arkadaşları tarafından iki farklı çalışmada premutasyon alelli annelerin gebelikleri sonucunda oluşan çocuklarında full mutasyona genişleme risk analizleri yapmışlardır (Tablo 2.16, Tablo 2.17) (84). Bu çalışma ile başka raporlarla (1,239, 240, 241, 242, 243) bildirilen tekrar boyutları ve full mutasyon genişleme riski arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (84). Ancak tablo 2.16'daki full mutasyon genişleme yüzdesi tablo 2.17'deki ve daha önceki çalışmalara (tablo 2.18) göre yüzde oranı daha düşük çıkmıştır. Büyük azalma 60-89 arasındaki tekrar boyutları arasındaki kategorilerde meydana gelmiştir. Bu tekrar boyutları için risk ve durum tespiti düzeltmeleri yapıldıktan sonra tablo 2.17'deki gösterilenlerden daha küçük olmuştur. >100 tekrarlı annelerin yavruları için bulunan full mutasyon riskleri diğer yayınlardaki sonuçlara benzer bulunmuştur (84).



Şekil 2.17. FXS hastaların kadın yakınları arasında premutasyon (PM) risk modeli (217)

Tablo 2.16. 664 premutasyon anneden 678 transmisyon olan çocuklarda full mutasyon genişleme yüzdeleri (84).

Maternal Alellerde Tekrar Boyutları	Anne Sayısı	Çocuk Sayısı		Full Mutasyona genişleme %'si
		Premutasyon	Full Mutasyon	
55-59	21	26	1	3.7
60-69	80	107	6	5.3
70-79	76	62	28	31.1
80-89	133	59	81	57.8
90-99	118	22	89	80.1
100-109	84	0	70	100
110-119	72	1	53	98.1
120-129	33	1	35	97.2
130-139	23	1	17	94.4
140-149	5	0	1	100
150-159	6	0	2	100
160-169	9	0	10	100
170-179	4	0	16	100
TOTAL	**664**	**279**	**399**	**58.8**

Tablo 2.17. 936 premutasyon anneden 1,338 transmisyon olan çocuklarda full mutasyon genişleme yüzdeleri (84).

Maternal Alellerde Tekrar Boyutları	Anne Sayısı	Çocuk Sayısı		Full Mutasyona genişleme %'si
		Premutasyon	Full Mutasyon	
55-59	27	35	2	5.4
60-69	108	124	29	19.0
70-79	90	65	64	49.6
80-89	192	76	206	73.0
90-99	187	34	224	86.8
100-109	116	4	151	97.4
110-119	98	4	128	97.0
120-129	36	3	61	95.3
130-139	38	0	55	100
140-149	17	0	31	100
150-159	10	0	12	100
160-169	10	0	12	100
170-179	7	0	11	100
TOTAL	**936**	**352**	**986**	**73.7**

Her ne kadar çoğu durumda riskler %100'e yaklaşırken, genişleyerek büyük premutasyon aleline veya daralarak/kısalarak daha küçük alellere sahip olma vakaları vardır. Buna ek olarak şimdiye kadar 5 vakada premutasyon alellerin normal veya ara (intermediate- sınır-grey zone) alellere kısalmıştır/daralmıştır (84). Anneden üç çocuğa reversiyon (büyük tekrardan küçük tekrara düşme) (82'den 33'e, 95'den 35'e, 145'den 43'e) rapor edilmiştir (245). Dördüncü reversiyon daralması 130 tekrardan 10 tekrara (Holinski-Feder) ve beşincisi ise 70 tekrardan 54 tekrara (Nolin ve Brown) daralmıştır. Reversiyon tüm kızlara aktarılmıştır. Beş kızın dördü normal fenotipe sahip beşinci kızın fenotipi bilinmemektedir, çünkü çalışmalar prenatal tanı için yapılmıştır (84).

Nolin ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında (Şekil 2.18 ve Tablo 2.19) 49-65 tekrarlı ara (intermediate- sınır-grey zone) aleline ve FXS öyküsü olmayan 92 anne ile bu 92 anneden olan 136 çocuğun *FMR1* genindeki CGG tekrarlarına bakılmıştır. Ara alellerin daha büyük boyutlarla sınırlı kaldığı ve daha az tekrarlı aleller için full mutasyona genişleme riski hemen hemen olmadığı bulunmuştur.

Tablo 2.18. Maternal premutasyon alellerin full mutasyon genişleme çalışmaların karşılaştırılması (84).

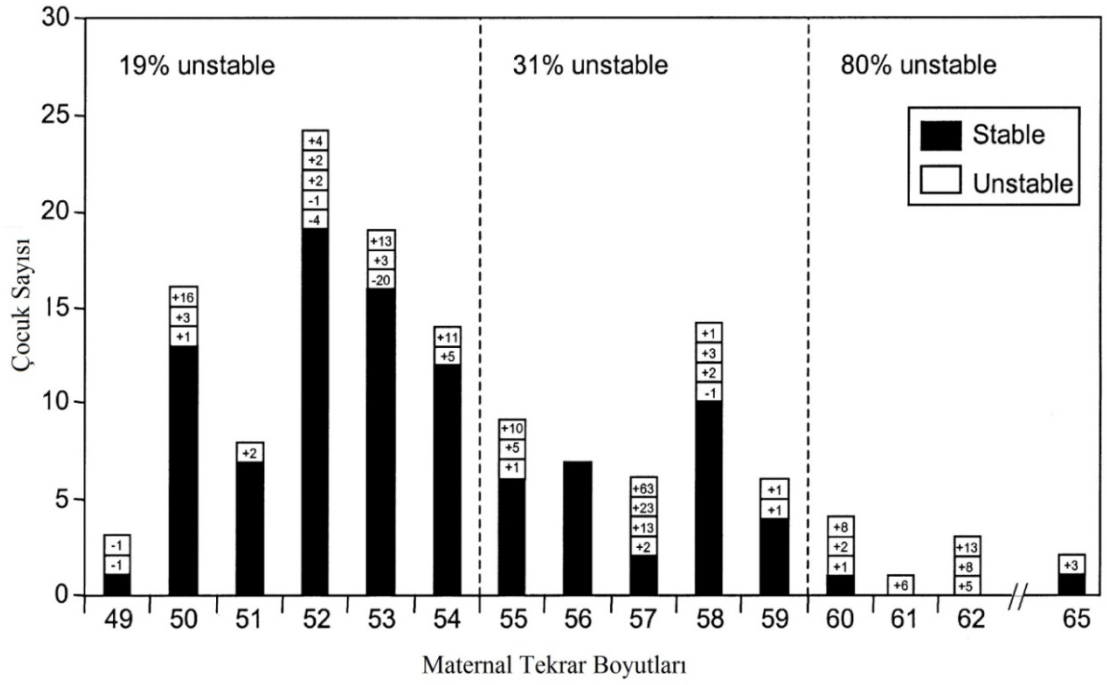
Maternal Alellerde Tekrar Boyutları	Full Mutasyon Genişleme %'si (Full Mutasyon Genişlemeli Çocuk Sayısı/ Gebe Sayısı)			
	Pesso ve arkadaşları 2000	Toledano-Alhadef ve arkadaşları 2001	Nolin ve arkadaşları 1996	Nolin ve arkadaşları 2003 (tablo2.16 ve 2.17'deki çalışma)
55-59	0 (0/11)	0 (0/22)	13 (3/22)	4 (1/27)
60-69	12 (1/8)	10 (2/20)	21 (7/34)	5 (6/113)
70-79	50 (1/2)	17 (1/6)	58 (59/102)	31 (28/90)
80-89	50 (1/2)	...	73 (78/107)	58 (81/140)
90-99	100 (1/1)	...	94 (83/88)	80 (89/111)
100-200	75 (3/4)	...	99 (177/179)	98 (194/197)

Ve aktarımlar arasında çeşitli eğilimler gözlenmiştir. Bunların birincisi; ara alellerin %72.8 'i stabil kalıtılmıştır. %27.2'si ise (37/136) 31 genişleme ve 6 kısalma/daralma şeklinde aktarıldığı gözlenmiştir. Buna karşılık farjil X ailelerdeki premutasyon alel taşıyan kadınların aktarımları her zaman unstabil/karasızlık ile ilişkilidir. İkincisi; Büyük tekrar boyutlar küçük tekrar boyutlarından daha kararsız/unstabil olması daha fazladır. Özellikle, 49-54 tekrarlı annelerin aktarımında %19'luk (16/84) unstabil, 55-59 tekrarlı annelerin aktarımında %30.9 (13/42) unstabil ve 60-65 tekrarlı annelerin aktarımında %80 (8/10) unstabil oranı bulunmuştur. Üçüncüsü; Anneden çocuğa kısalma/daralma olarak geçiş gösteren tekrar boyutları ara alel boyutlarında gözlenmiştir (84).

Tablo 2.19. Unstabil olan Ara (intermediate- sınır-grey zone) aleller (84).

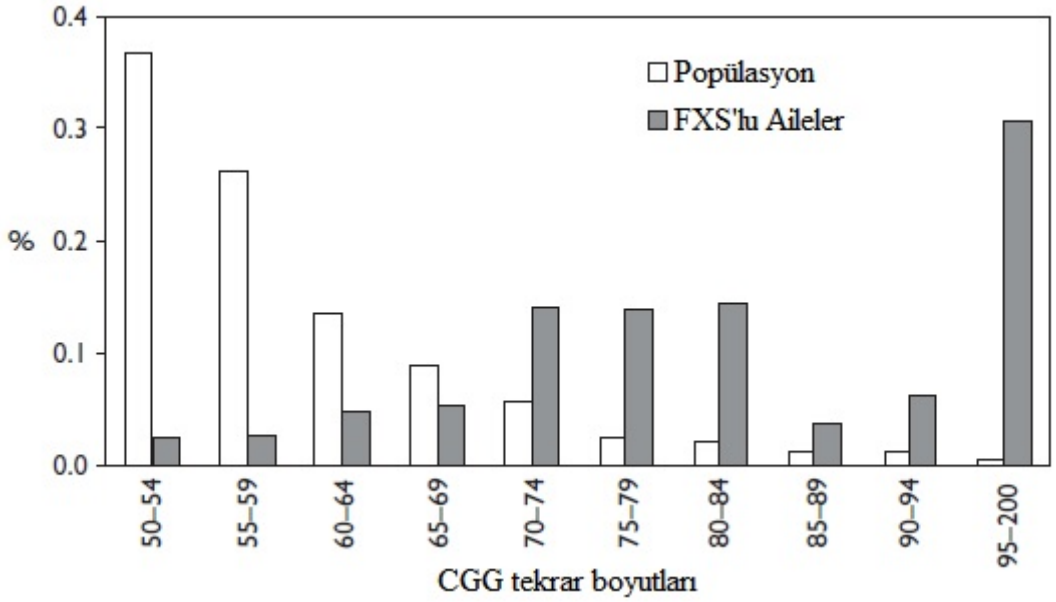
Maternal Alellerde Tekrar Boyutları	Çocukların Alelleri			
	Unstabil Sayısı/Toplam Sayı (%)	Daralma/Kısalma Sayısı	Genişleme Sayısı	Tekrar-Boyut Değişiklikleri
49-54	16/84 (19.0)	5	11	-20 ile +16
55-59	13/42 (30.9)	1	12	-1 ile +63
60-65	8/10 (80.0)	0	8	+1 ile +13
Total	**37/136 (27.2)**	**6**	**31**	

Ara (intermediate- sınır-grey zone) ve premutasyonlu *FMR1* alelli ailelerin retrospektif bir inceleme ile full mutasyonların genişleme hızı elbette tekrar boyutları hakkında bilgi sağlar ve bu bilgi genetik danışmanlık için değerli bir bilgidir. Buna ek olarak bu tür çalışmalar mustasyon sürecine ilişkin bilgi sağlar. Bu çalışmada, bir kuşak full mutasyona genişlemesi için en küçük alellin 59 CGG tekrarından oluştuğunu ve AGG tekrar dizisi ile kesintili olmadığı anlaşılmıştır. Bu bulgular, bir nesilden diğerine tekrar stabiletisine sağlanmasındaki AGG kesintilerinin olası rolü vurgulanmıştır (84).



Şekil 2.18. Ara (intermediate- sınır-grey zone) alellerin anne iletimi (84). Siyah kutular stabil geçişleri, Beyaz kutular ise alellerin (+/-) yöndeki geçişleri göstermektedir.

Başka bir çaşılmada genel populasyondaki premutasyon alel boyutları ile FXS ailelerdeki premutasyon alel boyutlarının dağılımı karşılaştırılmıştır (Şekil 2.19). Premutasyon tekrar boyutları FXS'lu ailelerdeki boyutlarına göre genel populasyondaki tekrar boyutları daha küçüktür. Bu da kısmen de olsa premutasyon'dan full mutasyona olan genişleme riskin genel populasyonda daha az olduğunun nedenini açıklayabilmiştir (217).



Şekil 2.19. Genel populasyonda ve FXS'lu ailelerdeki premutasyon alellerin tekrar sayılarının dağılımı (217).

Genel populasyon dağılımı için toplanan veriler (246, 247, 248, 249, 250). FXS ailelerin dağılımı için toplanan veriler (1, 239, 244, 251, 252, 253).

İletilen premutasyonun instabilitiy/kararsızlık ile ilişkili bazı faktörler vardır (217);

- Premutasyon taşıyıcılarının cinsiyetleri en önemli faktördür;
  - Babaların kızlarına iletilen premutasyon asla full mutasyona genişlemez.
- Annelerden gelen premutasyon full mutasyona genişleme riski CGG tekrar uzunluğuna bağlıdır.
  - CGG tekrar boyutu ne kadar büyük olursa full mutasyona genişleme olasılığı o kadar büyüktür.
- CGG üçlü tekrar ve sınırdaş haplotipin diziside risk faktörü olabilir.
  - AGG kaybı CGG tekrar boyutlarındaki kararsızlıkla ilişkilidir.

Anneden iletilen, premutasyondan full mutasyona olan genişleme riski FXS'lu aileler ile genel nüfus arasında farklı olabilir. bu farklılıklar premutasyon tekrar boyutları FXS'lu ailelerde genl nüfusa göre daha fazla olması (Şekil 2.19) ve premutasyon iletimleri FXS'lu ailelerde daha kararsız olmasıdır (217).

Murray ve çalışma ekibi 1997 Sağlık Teknolojisi Değerlendirme (Health Technology Assessment-NHS R&D HTA Programme) raporundaki etkilenen (447 premutasyonlu anne iletiminde 269 full mutasyona genişlemiş çocuk) ailelerden gelen verileri kullanarak premutasyon tekrar boyutu ile genişleme riski hakkında lojistik regresyon analizi gerçekleştirmiştir. Genişleme riski ve CGG tekrar boyutu büyüklüğü arasında net bir ilişki gözlenmiştir. Murray ve arkadaşları tarafından HTA raporundaki verileri kullanarak, regresyon analizi sonucu bir model oluşturulmuştur (217).

$$Risk = \frac{1}{1 + e^{8.238 - 0.1075 * \text{PM boyutu}}}$$

Bu model sonrasında etkilenen ailelerde, risk analizi regresyon modeli oluşturmak için Kuzey Amerika, Finlandiya, Hollanda, Fransa ve İngiltere de yapılan çalışmada 1111 premutasyon taşıyan anne iletiminde 704 full mutasyon genişlemesi olduğu tespit edilen verileri kullanarak regresyon analizi sonuçu yeniden bir model oluşturulmuştur (217).

$$FXS'lu\ ailelerde\ risk = \frac{1}{1 + e^{8.6434 - 0.1114 * \text{PM boyutu}}}$$

Oluşturulan bu model ile FXS'lu ailelerde genişleme riskleri tahmin edilebilir (217). Bir de genel popülasonyondaki genişleme riski için bir model oluşturulmuştur (217).

$$Genel\ popülasyonadaki\ risk = \frac{1}{1 + e^{11.4129 - 0.1272 * \text{PM boyutu}}}$$

Bir premutasyonlu kadın ve erkek bireyler FXTAS için yüksek risk altındadır. FXTAS prevalansı 50 yaş ve üzeri premutasyonlu erkelerde genel olarak %40 olduğu tahmin edilmektedir. Premutasyonlu erkeklerde FXTAS'a yakalanma riski yaşa göre değerlendirilir (Tablo 2.20) (254).

Tablo 2.20. FMR1 premutasyonlu erkeklerde yaşa bağlı FXTAS riski (254).

Yaş	Risk Yüzdesi
50-59	% 17
60-69	% 38
70-79	% 47
≥ 80	% 75

40 yaşından önce menapoza giren premutasyonlu kadınlarda FXPOI görülme olasılığı %21 olduğu tahmin edilir. Fakat premutasyon taşıyıcı kadınlarda FXPOI görülme olasılıkları premutasyon tekrar boyutlarıyla ilişkilidir (Tablo 2.21) (255).

Tablo 2.21. FMR1 premutasyonlu kadınlarda tekrara bağlı FXPOI riski (255).

Premutasyon CGG Tekrar Boyutları	FXPOI Risk Yüzdesi
59-79	% 6.9
80-99	% 25.1
>100	% 16.4

Premutasyon ve full mutasyonlu erkekler ile kontrol erkeklerde AGG'lerin gerçek sayılarının belirlenmesi sonucunda yaklaşık 40 CGG tekrar olanlarda kararsızlığın başladığını göstermişlerdir. Kadınlarda araya giren AGG'lerin analizi için geliştirilen metodlar, kadınlar için daha güvenilir bir genetik danışma verilmesini sağlayacaktır. Özellikle gri zondaki (45-54 CGG tekrarı) *FMRl* alelleri değişmektedir.

Trinükleotid tekrar artışının mekanizmasının tanımlanması, bizim gelecekte tekrarlama riskini daha kesin ifade edebilmemizi sağlayacaktır. Ashley ve Sherman mayotik ve mitotik mutasyon modellerinde, kadınların premutasyon orijini parentaldir ve kadının etkilenmiş bir çocuğa sahip olma riski vardır. Babasından premutasyon alan kadın, full mutasyonlu bir çocuğa sahip olmak bakımından yüksek riske sahiptir. Bu risk annelerinden premutasyonu alan kadınlardakinden daha yüksektir (256).

Loesh ve arkadaşlarınn ve Rousseau ve arkadaşlarının çalışmaları sonucunda, CGG tekrar ekspansiyonunun, doğacak yavruların cinsiyetine bağlı olduğunu öne

sürmüşlerdir. Her iki çalışmada da, annelerindeki premutasyonun, full mutasyona dönüşme riski erkek çocuklarda kızlara göre daha yüksektir (182, 257).

2.6.4.1. Erkek Vakalarda

FMR1 mutasyonlu bir erkek (premutasyon veya full mutasyonlu), kızlarının tümüne mutant X kromozomunu geçirecektir (% 100 risk). Fakat oğulların hiç biri için bu risk yoktur (% 0). Premutasyon erkekten geçtiği zaman boyda sadece birkaç CGG tekrar artar veya azalır ve göreceli olarak premutasyonun stabil kaldığı görülür (243, 258). Şimdiye kadar erkekte, premutasyondan full mutasyona ekspansiyon gözlenmemiştir.

Full mutasyonlu etkilenmiş erkekler infertildir. Bu erkeklerin muhtemelen %1'nin baba olacağı öne sürülmüştür (259, 260). Fertilite daha çok yüksek fonksiyonlu (*FMRl* full mutasyonlu ancak metilasyon olmadığından gen eksprese olmaktadır) bireylerde görülmüştür. FXS'li baba olan erkeklerin zekaca normal kızlara sahip oldukları belirlenmiştir (261).

Full mutasyonlu erkeklerin kandan izole edilen DNA'larında full mutasyon varken sadece sperm hücrelerinde premutasyon vardır (262, 263, 264).

Premutasyonlar erkeklerden geçerken genellikle aynı boyda kalır. Fakat full mutasyonlar daima premutasyona dönüşerek geçmektedir (90). Premutasyonlu erkeklerin oğulları FXS ve FXTAS yakalanma riski yoktur (77).

Bir çalışmada, full mutasyonlu, zekaca normal bir erkekte, Southern blot ile inkomplet metilasyon belirlenmiştir. Bu erkekler zekaca normal premutasyon taşıyan kızlara sahiptir (182).

2.6.5. Genetik Danışmanlar için Öneriler

Genetik danışmanlar *FMR1* gen mutasyonları için önemli ölçüde riskli olan bireyler için test öncesi bilgi sağlamada önemli bir rol oynamaktadır; olası sonuçlar için hazırlamak; sonuçların raporlanması ve *FMR1* ilişkili bozukluklar hakkında bilgi sağlayarak

eğitmek; ve aile üyeleri arasında iletişimi kolaylaştırmak gibi. *FMR1* mutasyonlu ailelere X'e bağlı kalıtım, trinükleotid tekrar instabilitesi ve değişen klinik manzaralar hakkında danışmanlık gerektirir. Genetik durumunun bilgilendirmesindeki zorluklar ve psikososyal yönlerine ek olarak *FMR1* mutasyonları için danışmanlık alanlarında daha spesifik konulara değinmek gerekir (140).

2.6.5.1. Danışmanlık Hususları

- Nüfus taraması sunan merkezler, hasta ve ailenin psikososyal ve klinik ihtiyaçlarını destekleyen test öncesi ve sonrası genetik danışmanlık sağlamak için mevcut kaynaklara sahip olduğundan emin olmalıdır. Bilinen risk faktörleri olmayan kadınlarda *FMR1* testlerin geniş ışığında genetik danışmanlar herhangi bir test öncesi bilgi almadan görerek tahmin etmelidir. *FMR1* mutasyonları ve *FMR1* ile ilişkili bozukluklarla ilgili bilgiye sahip olmamalıdırlar (140).

- Bir çok genetik danışmanlar FXS aşına olmasına rağmen, FXTAS ve FXPOI ile ilgili deneyimleri pek yoktur. Bu sebeple FMR1 mutasyonlu ailelerde risk değerlendirmesi için gerekli klinik araştırma kapsamı hafife alınıyor. Bu gibi ailelerde bir pedigri alarak birçok jenerasyon boyunca gelişimsel, nörodejeneratif ve üreme ile ilgili semptomların başlangıç yaşına ve şiddetine göre çeşitli konstelasyonlara dikkat etmesi gerekir. Full spektrumlu *FMR1* gen mutasyonlu bireyleri tanımlamak için özel tasarlanmış aile hikayesi soruları tablo 2.22'de listelenmiştir. Davranışsal ve bilişsel semptomların subjektif niteliği göz önüne alındığında, doğrulamak için psikiyatrik ve eğitim kayıtları mümkünse gelişimsel sorunların bildirildiği tarihler alınmalıdır (140).

- *FMR1* ile ilişkili bozukluklarda geniş kapsamlı aile üyelerin de geniş ölçüde genetik ve emosyonel etkileri olabilir. Bir ailede *FMR1* mutasyon tespit edildiğinde, genetik danışmanlar hasta yakınlarına haber vermede strateji geliştirerek hastalara yardımcı olmalıdır (140).

- *FMR1* ile ilişkili bozukluklar ve genetik risk hakkında ebeveynler ve çocukları ile açık ve anlamlı tartışma için teşvik edilmelidir. Genetik danışmanlar *FMR1* bağlı riskli çocukların uzun dönemli adaptasyona ihtiyaçları olabileceği hakkında ebeveynlere olumlu yönde yardımcı olması gerekir (140).

Tablo 2.22. FMR1 ilişkili bozukluklar için önerilen ve hedeflenen aile öyküsü soruları (140)

Not: Akrabalardaki uygun belirtileri ve başlangıç yaşlarını veya tarihlerini not alınız.
Bilişsel etkiler: zihinsel engellilik, özellikle gelişimsel gecikme, dil gecikmesi, öğrenme güçlüğü, matematik ile ilgili sorunlar
Konuşma gecikmesi veya olağandışı konuşma deseni
Otizm spektrum bozuklukları veya otistik benzeri davranışlar (bakışları kaçınma, tekrarlayıcı davranışlar, el çırpmalar, el ısırmalar, dokunuşlardan kaçınma vb...)
Dikkat eksikliği bozukluğu (ADD) yada dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB)
Dismorfik özellikler: makrosefali, büyük kulaklar, uzun yüz, geniş alın, belirgin çene, şaşılık
Bağ dokusu özellikleri: aşırı ekstansiyona uğrayabilen eklem (özellikle parmaklarda) düz ayak, hipotoni, mitral kapak prolapsusu, büyük testisler, fıtıklar, tekrarlayan kulak enfeksiyonları
Nörolojik belirtiler: nöbetler, erişkin başlangıçlı ilerleyici titremeler, ataksi, yürümede zorluk, denge sorunları, kısa süreli hafıza kaybı, bacaklarda duyu kaybı
Akıl hastalığı/kişilik bozuklukları: depresyon, şizofreni, bipolar bozukluk, obsesif-kompulsif bozukluk, şizoafektif bozukluk, şizoid kişilik vb...
Davranış problemleri: dürtüsellik, öfke patlamaları, şiddet içeren davranışlar, soliter davranış, davranışsal sorunlar için danışmanlık yada ilaç alanlar.
Utangaçlık, sosyal anksiyete, aşırı endişe, emosyonel sorunlar için danışmanlık veya ilaç alanlar
Primer over yetmezliği, erken menopoz gibi üreme ve fertilite problemleri

- FXTAS hastalarda psikiyatrik sorunları yanı sıra bilişsel gerileme sıktır (140).

- *FMR1* testi sonucunda normal çıkan hastalara *FMR1* ile ilgili sorunlarını ekarde edilerek diğer genetik sorunların olabileceğini veya teşhis edilmemiş gelişimsel gecikmeye neden olan hastalıkların, infertiliteye yada aile üyelerinde nörodejeneratif hastalıkların belirlenmesinde yardımcı olacağı şeklinde danışmanlık verilmelidir (140).

Ara (intermediate-sınır-grey zone) Alellerde

- Ara alellerin fenotipik ve üreme etkileri üzerinde araştırmalar çelişkili olduğundan bu hastalar için kesin rehberlik sağlanması genetik danışmanlar için zor bir

durumdur. Bu durumda danışmanlık verilirken ara alellerin bilinen güncel klinik ve üreme üzerindeki etkileri söylenmelidir (140).

Üreme Konusunda

- Prenetal tanı premutasyon yada full mutasyonlu kadınlar için önerilmelidir. Premutasyon alelli erkekler kızlarına premutasyon mirası verecekleri için potansiyel fenotipik riskleri ile ilgili genetik danışmanlık verilmelidir (140).

- Genetik danışmanlar fertilite tedavisi alan *FMR1* premutasyonlu kadın bireyler için FXS çocuklara sahip olma riskinin olup olmayacağına çok dikkatli olmalı ve takip etmeleri gerekir (140).

- Başarılı bir PGD'nin ana belirleticisi yumurtalık fonksiyonu olduğundan, *FMR1* premutasyonlu kadınlar PGD önce subfertil için değerlendirilmelidir (140).

- Şu ana kadar tek bir nesil içinde ara (intermedit) alellere sahip bireyden full mutasyona genişlemiş bir rapor ve invaziv prenetal tanı tıbbi endikasyonu yoktur. Buna rağmen intermedit alelli hastalarda başka endikasyon için prenetal tanı yapıldığında fetusun full mutasyona sahip olmadığını teyit etmek için fragil x prenetal testler istenebilir. Hiç değilse de intermedit alel az olsa da kararsız bir premutasyona genişleme riski olabilir ve fenotipik özellik hakkında endişeleri giderebilmek için ve yetişkinlikte de istenme olasılığı yüksek olacağından doğum öncesi *FMR1* testi istenmelidir. Bu şartlar altında erişkin başlangıçlı bozukluklar ve premutasyon fenotipi tahmin etmek olanaksızdır bu yüzden prenetal testleri çevreleyen bu konular çok önemlidir (140).

2.6.6. Tedavi ve Yardımcı Kaynaklar

FXS'lu erkeklerin, yaklaşık olarak % 80'ninde ve full mutasyonlu kadınların % 35'inde hiperaktivite veya ciddi dikkat azlığı gözlenmiştir. Bu durum genellikle okul yaşındaki çocuklarda belirgindir. FXS'lu çocukların yaklaşık % 60'ı stimülant tedaviye cevap verirler. Hiperaktivitenin tedavisinde "clonidine" nin, ankisiyete için "seratonin re-uptake inhibitörleri", agresif veya obsesiv/zorlayıcı davranış için "tantrums" un

semptomatik olarak yardımcı oldukları belirlenmiştir. Folik asit, FXS'nun semptomlarının giderilmesi için klinik denemelerde kullanılmıştır. Bu terapinin etkisinin değişken olduğu belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda davranışlarda düzelme olduğu, bazılarında ise semptomların arttığı gözlenmiştir (25). FXS'nun son zamanlarda hayvan modelleri üzerinde fizyolojik mekanizmalar çok iyi aydınlatıldığı için hastalığın biyokimyasal temeline hitap etmeyi amaçlayan hedef ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bu hedefli tedavi yaklaşımlar FMRP etkisini taklit eden ve mGluR yolunu düzenleyen ilaçlardır (270). FXS knockout farelerde mGluR antagonistleri ile yapılan çalışmada nöbetler, davranış ve biliş üzerinde olumlu bir etki göstermiştir (271). Bu ilaçların bazıları şuan da insan klinik çalışmalarında yürütülmektedir ve önüğmüzdeki bir kaç yıl içinde ilaç pazarına girmek için bekliyor. mGluR antagonistik ilaçlar FXS etkilenen aileler umut vermektedir. Ebeveyn kaygılarını içeren ve özel bir eğitim programı dahilinde, mesleki, fiziksel ve konuşma terpileri olan entegre bir ekip yaklaşımları ile semptomatik olarak yardımcı olan ilaçlar ile tedavi edilmesi tavsiye edilir (270). Konuşma tedavisi, özel eğitim, uğraşı tedavisi ve spor çalışmaları gibi uygulamalar da sendromun hafifletilmesine yardımcı olmaktadır. Gen terapisi uygulaması henüz yoktur. Bu uygulama ise FXS'lu fetüs için geçerli olabilir (25)

FXS için ilaç geliştirilme ışıgı altında genetik danışmalar hedeflenen ilaç ile ilgili güncel araştırmalar hakkında bilgilendirilmesi gerekiyor. Hedeflenen ilaçlar araştırma aşamasında olsa da, genetik danışmanlar bilgilendirme sürecini kolaylaştırmak ve ailelerin bir klinik araştırma çalışmalarına katılmaları yönünde yardımcı olmalıdırlar (140).

Genetik danışmanlar ve FXS'lu aileler için FXS hakkında güncel bilgi ve yardım sağlayan uluslararası vakıf ve özel araştırma merkezleri vardır (140). Bunlar;

- Ulusal Fragile X Vakfı (http://www.fragilex.org/) aileler ve profesyoneller için kapsamlı eğitim kaynakları için destek sağlar. Vakıf *FMR1* ile ilişkili bozukluklardan etkilenen aileler için Facebook sosyal ağ sitesi ve yanı sıra FXTAS olan bireyler için ayrı bir bilgilendirme sitesi mevcuttur.

- FRAXA Araştırma Vakfı (http://www.fraxa.org/) doğru araştırmayı hızlandırmak, etkili tedaviler için fon ve aynı zamanda ailelere destek sağlar ve FXS konusunda farkındalık yaratmada yardımcı olur.

- Frajil X Klinik ve Araştırma Konsorsiyumu (http://www.fxcrc.org/) frajil x özel kliniklerin uluslararası gelişimini teşvik ve ilaç deneyleri gibi işbirlikçi araştırma çabaları için bir yapı sağlar. FXS aileler ve diğer *FMR1* ilişkili hastalıkların klinik yönetimi konusunda FXCRC merkezini bulmak için en yakın konsorsiyum ile irtibata teşvik edilmelidir.

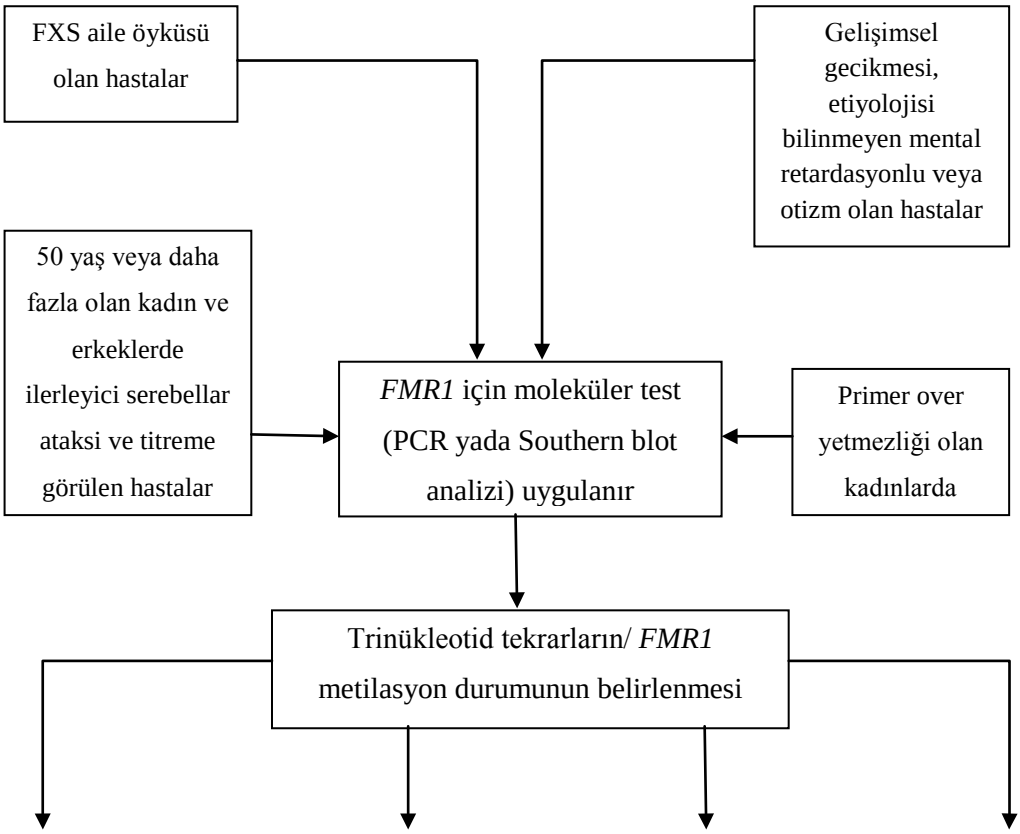
2.6.7. Yaşam Süresi

FXS'lu , 433 kadın ve 348 erkek de mortalite çalışılmış ve kadın ve erkek için ortalama ölüm yaşının genel populasyondakinden 12 yıl daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Frajil X sendromlu grubta ölüm nedeni olarak en sık rastlanan kardiyovasküler, serebrovasküler ve malign hastalıkların görülme sıklığı genel populasyondakine benzerdir. Yapılan bu ilk çalışmada spesifik bir hastalığa yatkınlık bulunamamıştır (272).

2.6.8. *FMR1* Test Algoritması ve Kılavuzu

Tablo 2.23. FMR1 test kılavuzu (140, 255)

FMR1 mutasyon testi için önerilir;
Gelişimsel gecikme yada otizm olan zihinsel engelli kadın veya erkeklerde,
Doğru genetik risk değerlendirilmesini sağlamak amacıyla, sitogenetik test yada akrabalık aracılığıyla tanısı konan FXS olan bireylerde,
Bir ailede FXS öyküsü veya tanı konmamış zihinsel engelli olan üreme danışmalığı için gelen kişilerde. Amerikan Koleji Kadın Hastalıkları ve Doğum (ACOG) komitesine göre FXPOI dahil *FMR1* ilişkili bozukluk öyküsü olan kadınlar için de test önerilmesi ve aile öyküsünün alınması gerekir,
Folikül uyarıcı hormon (FSH) düzeylerinin yüksek olan fertilite yada üreme ile ilişkili problemleri olan kadınlarda,
Geç başlangıçlı titreme veya bilinmeyen serebellar ataksi olan bireylerde,



Full mutasyon alel büyüklüğü >200 tekrar	**Premutasyonlu alel büyüklüğü** yaklaşık 55-200 tekrar arası	**İntermedit alel büyüklüğü** yaklaşık 45-54 tekrar arası	**Normal alel büyüklüğü** yaklaşık 5-44 tekrar arası
Tipik, tekrar ekspansiyon ve metilason sonucu kısmi veya tam olarak susuturulmuş FMR1 geni. FXS hasta olarak öngörülür.	*FMR1* genin durumunda genellikle değişiklik olmaz, ancak daha büyük premutasyonlar genin ifadesinin azalmasına neden olabilir. Hastalar hemen hemen her zaman normal zekaya sahiptir.Bazı hastalar FXS ile ilgili davranış sergileyebilir. Premutasyon taşıyıcılarıda FXTAS veya FXPOI için yüksek risk altındadır.	FXS hastalığı göstermez. Alel stabilitesinin kontrolü için ebeveynlerin takip edilmesi gerekir. Ara bölgede küçük instabiliteli alel nadir bildirilmiştir.	Başka bir mutasyon (sekans mutasyonları) tespit edilmediği sürece FXS hastalığı göstermez.

Şekil 2.20. FMR1 Test Algoritması

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X Sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası çocuklardan 2 cc EDTA'lı periferik kan alınıp DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir ve aşağıdaki gereçler kullanılmıştır.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

- Mikropipetler 10'luk, 100'lük, 1000'lik (DragonLab)
- Vorteks (IKA Vortex Genıus 3)
- Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)
- -20 Buzdolabı (Beko)
- +4 Buzdolabı (Ariston)
- Termal Cycler Cihazı (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems)
- Distile Su Cihazı (Diret-Q.UV Millipore)
- Isıtıcı Blok (Cleaver-Elite)
- Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer Cihazı
- NanoDrop 2000- Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (Thermo Scientific)
- OWL Easycast^{TM} B2 Elektroforez Cihazı (Thermo Scientific)
- Mikro Dalga Fırın (Arçelik 581)
- Plate Perfect Spin (Peqlab)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- **Kandan Genomik DNA İzolasyon Kit (RTA)**
    - Proteinase K
    - Solution B
    - Solution W1
    - Solution W2
    - Solution E
    - Spin Columns
    - Collection tubes (2 ml)
    - Collection tubes (1,5 ml)
    - %96-100 Etanol

- **EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN)**
    - Kimyasal Modül
        - Bisulfite Mix
        - DNA Protect Buffer
        - RNase-Free Water
    - Purifikasyon Modül
        - EpiTect Spin Columns
        - Collection Tubes
        - Buffer BL
        - Buffer BW
        - Buffer BD
        - Buffer EB
        - Carrier RNA

- **FMR1 Sizing PCR Kit (ABBOTT)**

    - ASR Primers for Gender (X ve Y kromozomlarına özgü amplifiye eden oligonükleotidleri içerir)
    - ASR Primers for FMR1 (FMR1 genindeki CGG_n motifini amplifiye eden oligonükleotidleri içerir)
    - TR PCR Enzyme Mix (Trinükleotid tekrar motifi ve DNA pol. içeren amplifikasyonu destekleyen tampon çözelti)
    - High GC PCR Buffer (GC'ce zengin bölgeler için PCR Enhancer tampon çözeltisi)
    - Cleanup Enzyme Mix (GC açısından zengin bölgelerin amplifikasyonu ile gözlenen sturlu sinyalleri azaltmak için tasarlanmış tampon solüsyon)
    - ROX^{TM} 1000 Size Standard (ROX etiketli 20 farklı büyüklükte (50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ve 1000 baz uzunlukta) oligonükleotid içeren tampon çözelti)

- **SNP Detective Fragile X Kit (GML)**

    - GML 10X PCR Buffer (Tris-CI, KCI, $(NH_4)_2SO_4$ ve $MgCI_2$ (pH=8.7))
    - GML FRAX Taq Pol. (Taq Polimeraz Enzim (5U/µl)
    - GML G/C Solution (5X konsantrasyonlu GC'ce zengin bölgeler için PCR Enhancer)
    - GML dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
    - MetPCR Primer Mix (TE de çözünmüş 20 pmol/µl primer)
    - NonMetPCR Primer Mix (TE de çözünmüş 20 pmol/µl primer)
    - Primer MTPF+TAil (TE de çözünmüş 50 pmol/µl primer)
    - Primer MTPR (TE de çözünmüş 2.5 pmol/µl primer)
    - Distilled Water (DNase-RNase free water)

- **Hİ-Dİ™ Formamide (Applied Biosystems)**
- **GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems)**
- **Buffer (10X) with EDTA (Applied Biosystems)**
- **POP-7 (Applied Biosystems)**
- **SeaKem®LE Agarose (Lonza)**
- **10X TBE (Tris Buse+Borik Asit+ EDTA)**
- **EtBr (Etidyum bromür)**
- **Loading Dye (Gliserol+ Trıs HCI+EDTA+ Brom Fenol Mavisi)**
- **MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)**
- **Plate Septa 96-Well (Applied Biosystems)**
- **100 bp DNA Ladder (100-3000 bp arasında 12 fragment) (Axygen)**

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Örneklerin Alınması

Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X Sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası çocuklardan 2 cc EDTA'lı periferik kan alınmıştır.

3.2.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

2 cc EDTA'lı periferik kandan RTA markalı kandan genomik DNA izolasyon kiti kullanarak yapılmıştır. Kit protokolu aşağıda verilmiştir.

3.2.2.1. Protokol

1) 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpünün dibine 20 µl Proteinaz K eklenir, 200 µl örnek eklenir ve 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
2) 250 µl solüsyon B eklenir.
3) 20 saniya vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
4) Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65^{o}C'de 15 dakika inkübe edilir.

5) 200 µl etanol (%96-100) eklenip, 20 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırılır.
6) Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarılır.
7) 6000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Sıvı içeren alttaki tüp atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
8) 700 µl Solüsyon W1 eklenir. 6000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
9) 700 µl Solüsyon W2 eklenir. 10000 x g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Toplama tüpündeki sıvı atılır ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirilir.
10) 14000 x rpm'de 30 saniye santrifüj yapılır.
11) Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilir.
12) 100 µl 70^{o}C'ye ısıtılmış Solüsyon E eklenir ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir. 14000 x rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır.
13) Spin kolon atılır, mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA bulunur.

3.2.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

PCR reaksiyonunun hazırlanması aşamasında bilmemiz gereken diğer bir temel konu da DNA'yı çözdüğümüz sıvı ortam içerisindeki DNA konsantrasyonu ve saflık derecesidir. Bunun belirlenmesi, UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle, 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir.

UV absorbansı, DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı A260nm/ A280nm=1.8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla, bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. Bu orandan düşük değerler, örnekte fenol ya da protein

kontaminasyonunu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonunun varlığını gösterir. RNA için absorbans oranı ise A260nm/A280nm=1.8-2.0'dir.

3.2.4. FMR1 Sizing PCR Uygulaması

Genomik DNA izolasyon yapıldıktan sonra NanoDrop 2000-Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazında (Thermo Scientific) konsantrasyon ve saflık derecesi ölçümü yapıldı. Uygun olan genomik DNA'larla PCR aşamasına geçildi. Uygun olmayanlardan yeniden izolasyon yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA üzerinde istenilen bölgenin, o bölgeye özgül primerler kullanılarak termal cycle cihazında çoğaltılması işlemidir. Isı ile denatüre edilerek tek zincir haline getirilen DNA molekülüne, primerlerin bağlanması ve bu primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur.

PCR reaksiyonu için Abbott FMR1 Sizing PCR kiti kullanılarak PCR protokolü uygulandı.

3.2.4.1. Protokol

3.2.4.1.1. PCR Aşaması

1) Tablo 3.1 deki reaktifleri kullanılarak bir reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 3.1. PCR reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 PCR reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
High GC PCR Buffer	13.0
ASR Primers for Gender	0.6
ASR Primers for FMR1	0.8
TR PCR Enzyme Mix	1.2
DNase/RNase free water	1.4
Total	**17.0**

2) Reaksiyon miksini hazırladıktan sonra 0.2'lik PCR tüplerine 17 µl miksler dağıtılır.

3) Miks dağıtılan PCR tüplerinin üzerine 3 µl genomik DNA (10-25 ng/µl) eklenir. Toplam 20 µl olan karışım kısa bir vorteks ve santrifüj yapılır.
4) Tablo 3.2 deki termal cycler profili uygulanır.

Tablo 3.2. FX PCR termal cycler profili

Sıcaklık (^{o}C)	Zaman (dk:sn)	Cycles/Döngü	Hacim (µl)
98.5	0:10	15	20
58.0	1:0		
75.0	6:0		
98.5 (+0.1^{o}C/cycle)	0:10	15	
56.0	1:0		
75.0	6:0		
4.0	∞	-	

3.2.4.1.2. Agaroz Jel Elektroforez Aşaması

1) Stok solusyonu olarak 500 ml'lik 0.5 M EDTA hazırlanır;
   a. 93,05 gr EDTA tartılır
   b. 200 ml distile su içerisinde eritilir (magnetik karıştırıcı ile)
   c. Çözelti netleşene kadar NaOH eklenir
   d. Son volüm 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

2) Stok solusyonu olarak 10X TBE (Tris-Borate elektroforezis buffer) hazırlanır;
   a. 108 gr Tris baz + 55 gr Borik Asit 800 ml distile su içerisinde çözünür (magnetik karıştırıcı ile karıştırılır)
   b. 40 ml 0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0) (alternatif olarak 9.3 gr Na_2EDTA) eklenir.
   c. Son volüm 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır.
   d. Oda sıcaklığında saklanır.

3) 6X DNA Loading Dye Hazırlanır;

a. 60 ml %100 gliserol
b. 6 ml 1M Tris HCI pH:8.0
c. 1.2 ml 0.5 M EDTA pH: 8.0
d. 60 mg brom fenol mavisi eklenip son volüm 100 ml olacak şekilde tamamlanır.

4) Etidyum bromür (EtBr) stok solusyonu olarak 10 mg/ml distile su ile çözünür.
5) Stok çözeltiler hazırlandıktan sonra %2'lik agaroz jel hazırlanır;
   a. 2 gr agaroz tartılır ve son volüm 100 ml olacak şekilde 1X TBE buffer ile tamamlanır.
   b. Agaroz çözeltisi mikrodalga fırında eriyene kadar kaynatılır.
   c. Elle dokunulabilir sıcaklığa gelinceye kadar soğutulur ve içerisine son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr eklenir.
   d. Kabarcıkların oluşmamasına dikkat ederek karıştırılır.
   e. Jel dökme standı hazırlanır sonra jel standın içine dökülür.
   f. Sonra taraklar yerleştirilir.
   g. Jel tamamen donduktan sonra taraklar yavaşça çıkarılır.
   h. Jel 1X TBE bulunan jel elektroforez tankına yerleştirilir.

6) Hazırlanan agaroz jelin ilk kuyucuğuna 100 bp'lik DNA ladder (2 µl) yüklenir ve oluşan PCR ürünlerimizin 5 µl'sini alarak 1 µl loading dye ile karıştırılıp son volüm 6 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklenir.
7) Yükleme işlemi bittikten sonra tankın kapağı kapatılıp 110 volt akım ile 20 dakika yürütülür.
8) Yürütme bittikten sonra jel görüntüleme cihazın UV ışığında yürütülen PCR ürünleri görüntülenerek kaydedilir.

3.2.4.1.3. PCR Ürünlerini Saflaştırma/Temizlenme Aşaması

1) 0.2'lik PCR tüpün içerisine 3 µl Cleanup Enzyme Mix'ten konur.
2) Üzerine 2 µl PCR ürünü eklenir, kısa bir vorteks ve satrifüjden sonra tablo 3.3'deki thermal cycler profili uygulanır.

Tablo 3.3. FX PCR ürünü Saflaştırma/Temizleme thermal cycler profili

Sıcaklık	Zaman	Hacim
75°C	10 dk.	5 µl
4°C	∞	

3.2.4.1.4. Örnekleri ABI 3130 Serisi Genetik Analizör İçin Hazırlama Aşaması

3.2.4.1.4.1. Örneklerin Denatürasyon Basamağı

1) Tablo 3.4'deki reaktifleri kullanılarak reaksiyon miksi hazırlandı.

Tablo 3.4. PCR ürünlerin denatürasyon reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
Hi-Di™ Formamide	7.0
ROX™ 1000 Size Standard	3.0
Total	**10.0**

2) Reaksiyon miksi hazırlandıktan sonra kısa bir vorteks ve satrifüjün ardından MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate kuyucuklarına her bir örnek için 10 µl dağıtılır.
3) Dağıtılan miksler üzerine saflaştırmış/temizlemiş olduğumuz 5 µl ürünlerimizi ekleyip pipet ile pipetaj yapılır.
4) Sonra plate üzerine Plate Septa 96-Well septayı kapatıp plate santrifüjü ile kısa süreli spin yapılır.
5) Satrifüj yapılan plate tablo 3.5'deki termal cycler profili uygulanır.

Tablo 3.5. FX Denatürasyon termal cycler profili

Sıcaklık	Zaman	Hacim
93°C	30 sn.	15 µl
25°C	∞	

3.2.4.1.4.2. Örneklerin ABI 3130 Serisi Genetik Analizör Cihazına Yükleme Basamağı

6) ABI 3130 cihazın Data Collection açılır.
7) Plate Manager den yeni bir plate oluşturuyoruz.
8) Plate oluşturduktan sonra örneklermizin ismini ve çalışmanın nereye kaydedileceği yeri ve uygun ınstrument protokolunu seçeriz.
9) Seçtikten sonra cihazın tray düğmesine basarız tray geldikten sonra cihazın kapağını açıp örneklerin olduğu plate tray'e yerleştirip kapağı kapatırız.
10) Plate view'de oluşturduğumuz plate seçerek çalışmayı başlatırız.
11) 36 cm'lik 4 kapiller, F matrix'te POP-7 polimerinde tablo 3.6'daki şartlarda ürünümüz yürütülür.

Tablo 3.6. ABI 3130/3130xl'de FMR1 Sizing PCR (Abbott) yürütme modülü ve şartları

Parametreler	POP-7 Polimer
	Data Collection 3.0
Oven_Temperature	60°C
Poly_Fill_Vol	6500 Steps
Current_Stability	5.0 µA
Pre_Run_Voltage	15.0 kV
Pre_Run_Time	180 sec
İnjection_Voltage	15.0 kV
İnjevtion_Time	22 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	30 nK
Voltage_Step_Interval	15 sec.
Data_Delay_Time	120 sec.
Run_Voltage	15.0 kV
Run_Time	5600 sec.

3.2.4.1.5. GeneMapper™ Programında Örneklerin Analizi

GeneMapper programı analiz edilirken fragment analiz yöntemi kullanarak analiz eder. FMR1 sizing PCR kitinde CGG tekrarlarına , X ve Y kromozomlarına özgü üç farklı primer kullanılmıştır. Bu primerler sayesinde çoğalan bölgeler genetik analizör cihazında pik olarak yansır ve bu pikler GeneMapper programında bize kaç bp boyutunda olduğunu gösterir. Analiz şu şekildedir;

1) GeneMapper programı açılır
2) Açılan programda Fragil X analizi için bir proje oluşturulur;
    a. GeneMapper Manager açılır
    b. Açılan pencerede Analysis Methods seçilir ve Fragil X için küçük ve büyük tekrar analiz metodları olan .xml dosyaları import edilir.
    c. Açılan pencerede Size Standards seçilir ve Fragil X için küçük ve büyük fragmeny size standatları olan .xml dosyaları import edilir.
    d. GeneMapper Manager kapatılır.
3) File'dan Add Samples to Project seçilerek analiz edeceğimiz örnekleri ekleriz.
4) Sonra örneklerin analizini yapmak için analiz metodunu ve size standardını seçerek analiz butonuna basarız.
5) Karşımıza küçük bir pencere çıkar ve bu pencereye projemizin ismini yazıp ok. tıklarız.
6) Her örnek için Size Match Editor den Size Standardımız doğru adlandırılmış mı diye kontrol ederiz. Doğru değilse manuel olarak adlandırma yaparız.
7) Kontrol ettikten sonra Display Plots dan örneklerimizin analiz ederiz
    a. Sample Plots penceresi açılır.
    b. Açılan pencerde X eksenindeki scale bize piklerin kaç bp olduklarını gösterir.
    c. Y kromozomuna ait olan pik 170 bp (+/- 3bp)

d. X kromozomuna ait olan pik 203 bp (+/- 3bp)
e. $CGG_{(5)}$ - $CGG_{(252)}$ ait olan pikler 208-950 bp arasındadır.

8) Örneğimiz erkek birey ise 170 bp /203 bp da olan iki pik görürüz.
9) Örneğimiz bayan birey ise 203 bp de tek pik görürüz.
10) Örneğin CGG tekrarını hesaplamak için aşağıdaki formül uygulanır

CGG tekrarı= (tekrar bp-193)/3

11) Son analiz yapılırken örneğin jel elektroforez görüntüsüne, Raw Data sına ve Sample Plots analizlerine bakılır.

3.2.5. SNP Detective Fragile X Kiti Uygulaması

SNP Detective Fragile X (GML) kiti sodyum bisülfit modifikasyonu ile DNA'daki metilasyon ve non-metilasyon farklılığı algılayan FXS sınıflandırmasında kullanılmak üzere alternatif PCR-tabanlı bir yöntem geliştirmiştir. Floresan ms-PCR (metil spesifik PCR) ile kadın ve erkeklere özgü electropherogram deseni ile normal, premutasyon ve full mutasyon etkilerine göre FXS sınıflandırılır.

FXS kişilerde genellikle 200'den fazla CGG tekrar sayısı olduğunda full mutasyona sahip kişiler olarak tanımlanır. 200'den fazla CGG tekrar sayısı olduğunda tekrar bölgesinde genellikle metilasyon oluşur. Metilasyon oluştuğunda FMR1 genini susturarak protein oluşmasını engeller. Fragile X mutasyona sahip erkeklerde farklı hücrelerde farklı tekrarlara sahip olma durumları vardır böyle durumlarda mozaiklik kavramı ortaya çıkar. Diğer bir deyişle, mozaik erkeklerde bazı hücrelerinde premutasyon olup bazı hücrelerinde ise 200 tekrardan fazla tekrar taşır. Böyle kişilere Size Mozaisizim olarak adlandırılır ve mozaik erkeklerde sık görülen formu temsil eder.

Çoğu durumda full mutasyonlu hücrelerin metilasyon durumu test edilmiş ve tüm hücrelerde metile olmuştur. Ancak nadir durumlarda full mutasyonlu olsa bile hücreler metillenmemiş olabilir böylece metilasyon kısmı yada eksik kabul edilir. Bu durum metilasyon mozaisizim ortaya çıkarır. Metilasyon mozaisizmde metillenmemiş ve

metillenmiş durumda full mutasyon taşırlar. Metilasyon derecesi FXS şiddetini etkileyebilir.

3.2.5.1. Genomik DNA'ya Sodyum Bisülfit Uygulaması

Bisülfit Dönüşüm kiti 6 saat içinde saflaştırma yaparak, metillenmemiş sitozinlerin tamamını urasil'e dönüşümünü sağlar.

1) 800 µl RNase free water ile Bisülfit Mix 5 dk vortekslenerek çözülür.
2) Tablo 3.7 deki reaktifleri kullanarak reaksiyon miksi hazırlanır

Tablo 3.7. Bisülfit reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
Bisülfit Mix (çözünmüş)	85
DNA Protect Buffer	35
Total	**120**

3) 0.2'lik PCR tüplerine reaksiyon miksleri dağıtılır üzerine 20 µl DNA (1ng-2µg) eklenir.
4) PCR tüplerinin kapağını kapatıp kısa bir vorteks yapılır. Oda sıcaklığında (15-25^{o}C) saklanır.
5) Tablo 3.8'deki termal cycler profili uygulanır.

Tablo 3.8. Bisülfit dönüşüm termal cycler profili

Adım	Zaman	Sıcaklık (^{o}C)
Denatürasyon	5 dk.	95 ^{o}C
İnkübasyon	25 dk.	60 ^{o}C
Denatürasyon	5 dk.	95 ^{o}C
İnkübasyon	85 dk. (1 sa. 25 dk.)	60 ^{o}C
Denatürasyon	5 dk.	95 ^{o}C
İnkübasyon	175 dk. (2 sa. 55dk.)	60 ^{o}C
Hold	∞	20 ^{o}C

3.2.5.2. Bisülfitlenmiş DNA'nın Temizlenmesi

6) Bisülfitleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüpleri kısa bir santrifüj edilir ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alınır.
7) 10 µg/ml taşıyıcı RNA içeren 560 µl yeni hazırlanmış Buffer BL, örneğe eklenir ve vortekslenir. Maksimum hızda çok kısa santrifüj edilir. **Not:** >100 ng DNA kullanıldığında taşıyıcı RNA'ya gerek yoktur.
8) EpiTect kolonlara alınan örneklerde aynı işlemler 2.kez yapılır ve 1 dk daha maximum hızda santrifüj edilir.
9) 500 µl Buffer BW her kolona ilave edilir ve maximum hızda 1 dk santrifüj edilip toplama tüpü değiştirilir.
10) 500 µl Buffer BD eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır (15^{o}-25^{o} C).
11) 1 dk boyunca maximum hızda yeniden santrifüj edilen örneklere, 2 kez daha Buffer BW eklenir ve toplama tüpü değiştirilir.
12) Kolonlardan 2 ml'lik toplama tüpüne alınan örnekler 1 dk boyunca kalıntı sıvıdan arındırılmak için maximum hızda santrifüj edilir.
13) Kolonlar kapakları açık olacak şekilde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve ısıtıcı blokta 56^{o} C'de 5 dk inkübasyona bırakılır.
14) Kolonlar 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine alınır. 30 µl Buffer EB kolon membranının merkezine bırakılır. Kolonlar oda ısısında 1dk santrifüj edilir.
15) 15,000 x g'de (12,000 rpm) 1 dk santrifüj sonucu purifiye DNA elde edilir.
16) Clean up sonrası DNA'lar tekrar ölçülür. Piklerin temizliği ve DNA konsantrasyonu takip edilir.

3.2.5.3. SNP Detective Fragile X Kit Prosedürü

3.2.5.3.1. PCR Aşaması

1) Her numune için 3 farklı PCR tüpü hazırlanır.
2) Reaktifleri kısa bir vorteks ve ardından kısa santrifüj yapın.
3) Tablo 3.9, 3.10 ve 3.11'deki reaktifleri kullanarak reaksiyon miksi hazırlanır.

Tablo 3.9. Floresan Met-PCR reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 PCR reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
GML 10X PCR Buffer	2.5
GML G/C Solution	7.5
GML dNTPs Mix	2.0
MetPCR Primer Mix	0.4
GML FRAX Taq. Pol.	0.5
Distilled Water	5.1
Total	**18**

Tablo 3.10. Floresan NonMet-PCR reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 PCR reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
GML 10X PCR Buffer	2.5
GML G/C Solution	2.5
GML dNTPs Mix	2.0
NonMetPCR Primer Mix	0.4
GML FRAX Taq. Pol.	0.5
Distilled Water	10.1
Total	**18**

Tablo 3.11. Floresan mTP-PCR reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 PCR reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
GML 10X PCR Buffer	2.5
GML G/C Solution	7.5
GML dNTPs Mix	2.0
Primer MTPF + Tail	1.0
Primer MTPR	1.0
GML FRAX Taq. Pol.	0.5
Distilled Water	3.5
Total	**18**

4) Hazırlanan PCR tüplerin içerisine 18 µl reaksiyon miksleri dağıtılır ve üzerine 7 µl bisülfitlenmiş DNA eklenir ve son volüm 25 µl olur. Kısa vorteks ve santrifüj yapılır.
5) Tablo 3.12'deki termal cycler profili uygulanır.

Tablo 3.12. SNP Detective Fragile X PCR termal cycler profili

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık ^{o}C	Zaman
1	Aktivasyon	95 ^{o}C	15 dk.
2	Aplifikasyon 30 döngü	98 ^{o}C	1 dk.
		61 ^{o}C	1 dk.
		72 ^{o}C	2 dk.
3	Ekstansiyon	60 ^{o}C	10 dk.
4	Hold	15 ^{o}C	∞

3.2.5.3.2. Örnekleri ABI 3130 Serisi Genetik Analizör İçin Hazırlama Aşaması

3.2.5.3.2.1. Örneklerin ABI 3130 Serisi Genetik Analizör Cihazına Yükleme Basamağı

6) Tablo 3.13'deki reaktifleri kullanarak miks hazırlanır.

Tablo 3.13. PCR ürünlerini ABI 3130 Genetik Analizör Cihazına yüklemede kullanılan reaksiyon kompozisyonu

Reaktif İsimleri	1 reaksiyonu için kullanılan hacim (µl)
Hi-Di™ Formamide	20.0
ROX™ 1000 Size Standard	0.5
Total	**20.5**

7) Reaksiyon miksi hazırlandıktan sonra kısa bir vorteks ve satrifüjün ardından MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate kuyucuklarına her bir örnek için 20.5 µl dağıtılır.
8) Dağıtılan miksler üzerine her bir örnek için oluşmuş PCR ürünlerinden (Met-PCR, nonMet-PCR, and mTP-PCR) 1'er µl

olacak şekilde toplam 3µl PCR ürünü eklenip pipet ile pipetaj yapılır.

9) Sonra plate üzerine Plate Septa 96-Well septayı kapatıp plate santrifüjü ile kısa süreli spin yapılır.
10) ABI 3130 cihazın Data Collection açılır.
11) Plate Manager den yeni bir plate oluşturulur.
12) Plate oluşturduktan sonra örneklermizin ismini ve çalışmanın nereye kaydedileceği yeri ve uygun ınstrument protokolunu seçilir.
13) Seçtikten sonra cihazın tray düğmesine basarız tray geldikten sonra cihazın kapağını açıp örneklerin olduğu plate tray'e yerleştirip kapağı kapatılır.
14) Plate view'de oluşturduğumuz plate seçerek çalışmayı başlatılır.
15) 36 cm'lik 4 kapiller, G matrix'te POP-7 polimerinde tablo 3.14'daki şartlarda ürünümüz yürütülür.

Tablo 3.14. 3130/3130xl'de SNP Detective Fragile X Kiti (GML) PCR ürünlerin yürütme modülü ve şartları

Parametreler	**POP-7 Polimer** Data Collection 3.0
Oven_Temperature	60°C
Poly_Fill_Vol	4840 Steps
Current_Stability	5.0 µA
Pre_Run_Voltage	15.0 kV
Pre_Run_Time	180 sec
İnjection_Voltage	2.0 kV
İnjevtion_Time	20 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	20 nK
Voltage_Step_Interval	15 sec.
Data_Delay_Time	60 sec.
Run_Voltage	15.0 kV
Run_Time	2500 sec.

3.2.5.3.3. GeneMapper™ Programında Örneklerin Analizi

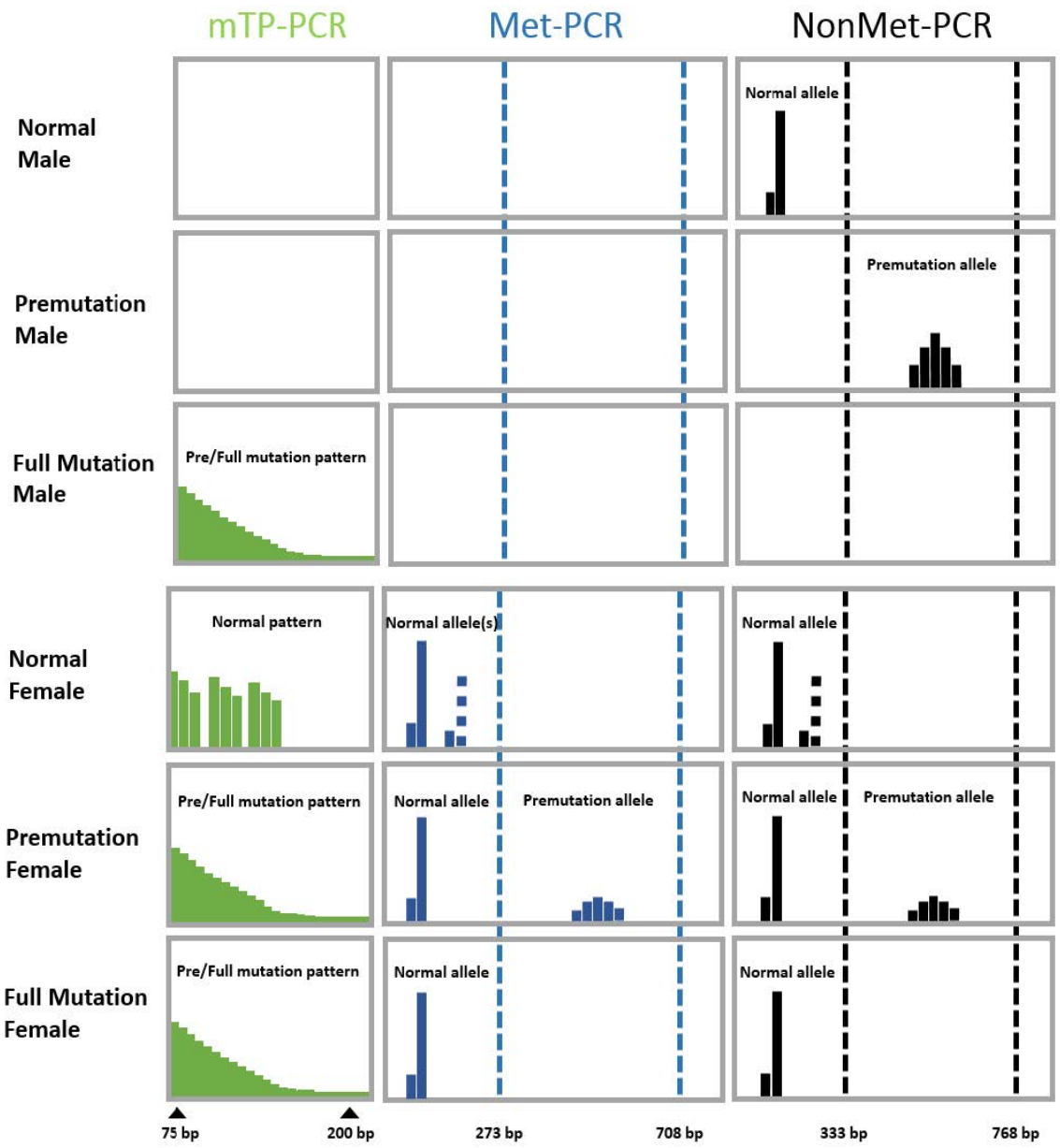
3.2.5.3.3.1. SNP Detective Fragile X Analiz Panelini Oluşturma

1) GeneMapper programı açılır.
2) Tools > Panel Manager seçilir
3) File > İmport Panels seçilir.
4) İmport olarak SNP Detective Fragile X kiti içerisindeki CD'de kayıtlı olan GML_FRAXA_Panels seçilir.
5) Binsetleri yüklemek için FRAXA seçilip.
6) İmport Binsets seçilir.
7) İmport olarak SNP Detective Fragile X kiti içerisindeki CD'de kayıtlı olan GML_FRAXA_bins seçilir.
8) Sonra Apply ve OK tıklanır.
9) Diğer parametreleri import için Tools > GeneMapper Manager seçilir.
10) Analysis Methods penceresi seçilir ve SNP Detective Fragile X kiti içerisindeki CD'de kayıtlı olan GML_FRAXA_anlys import edilir.
11) Aynı şekilde diğer parametreler yüklenir
    a. Table Settings tab: GML_FRAXA_tbl
    b. Plot Settings tab: GML_FRAXA_plt
    c. Report Settings tab: GML_FRAXA_rep
    d. Size Standard tab: GML_FRAXA_size
12) Parametreler yüklendikten sonra Done tıklanır.

3.2.5.3.3.2. SNP Detective Fragile X Analiz Projesi Oluşturma ve Analizi

1) File > New Project seçilir ve ekrana gelen pencereden Microstellite işaretlenip OK tıklanır.
2) File > Add Samples to Project'ten analiz edeceğimiz örnekleri ekleriz.

3) Sonra örneklerin analizini yapmak için table settingsten GML_FRAXA_tbl seçeriz.
4) GML_FRAXA'nın analiz metodunu, panelini ve size stansartını seçeriz.
5) Seçtikten sonra Analiz ikonuna tıklarız.
6) Oluşan projeye ismini yazarız.
7) Analizden önce Her örnek için Size Match Editor den Size Standardımız doğru adlandırılmış mı diye kontrol ederiz. Doğru değilse manuel olarak adlandırma yaparız.
8) Kontrol ettikten sonra Display Plots dan örneklerimizin analiz ederiz.
9) Analiz sonrasında Şekil 3.1'deki gibi desenler elde ederiz.
10) CCG tekrarını hesaplamak için aşağıdaki formüller uygulanır;
    a. Met-PCR sonucundaki CCG tekrarı
       = (Size-110)/3
    b. NonMet-PCR sonucundaki CGG tekrarı
       = (Size-166)/3



Şekil 3.1. Normal, Premutasyon ve Full mutasyonlu Erkek ve Kadınlarda beklenen desenler.

4. BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası 9 kız ve 41 erkek olmak üzere toplam 50 çocuk'tan 2 cc EDTA'lı kan alınıp genomik DNA izolasyonu yapılarak FMR1 Sizing PCR (ABBOTT) ve SNP DETECTIVE FRAGİLE X (GML) kitleri kullanılarak FXS'na neden olan FMR1 genindeki CGG trinükleotit sayısı ve metilasyon durumu incelendi.

Yaş ortalaması 7.33 olan kız çocukların 8'inde CGG tekrar sayılarının ortalaması 29.66 bulunurken 1'nde yaklaşık 300 tekrarlı aynı zamanda metillenmiş ve 30 tekrarlı CGG trinükleotitler bulunmuştur.

Yaş ortalaması 7.7 olan erkek çocukların 33'ünde CGG tekrar sayılarının ortalaması 28.81 bulunurken 6'sında CGG tekrar sayılarının ortalaması 292.16 olup aynı zamanda metillenmiş full mutasyonlar bulunmuştur. 1 erkek çocukta 90 CGG tekrarlı premutasyon bulunurken, diğer 1 çocukta ise size mozaisizim olarak bilenen 91 CGG tekrarlı premutasyon ve 297 CGG tekrarlı aynı zamanda metillenmiş full mutasyonlu mozaik CGG trinükleotitler bulunmuştur. Size Mozisizim mozaik erkeklerde sık görülen formu temsil eder.

Yapılan çalışmada toplam 40 erkek çocuğun %15'ında full mutasyon, %2.5'inde premutasyon, ve 1 erkek çocukta ise size mozaisizmi bulunmuştur. Toplam 9 kız çocuğunun %11.11'inde full mutasyon görülmüştür (Tablo 4.1).

Alel bazlı tekrar sayılarını incelediğimizde en küçük tekrar uzunluğuna sahip alel 18 CGG tekrarlı, en büyük tekrar uzunluğuna sahip alel yaklaşık 300 CGG tekrarlı ve normal aralıkta en sık görülen tekrar uzunluğu 28 (%20.4) - 29 (%40.8) - 30 (%10.2) - 31 (%10.2) CGG tekrarlı olarak bulunmuştur (Tablo 4.2, Grafik 4.1).

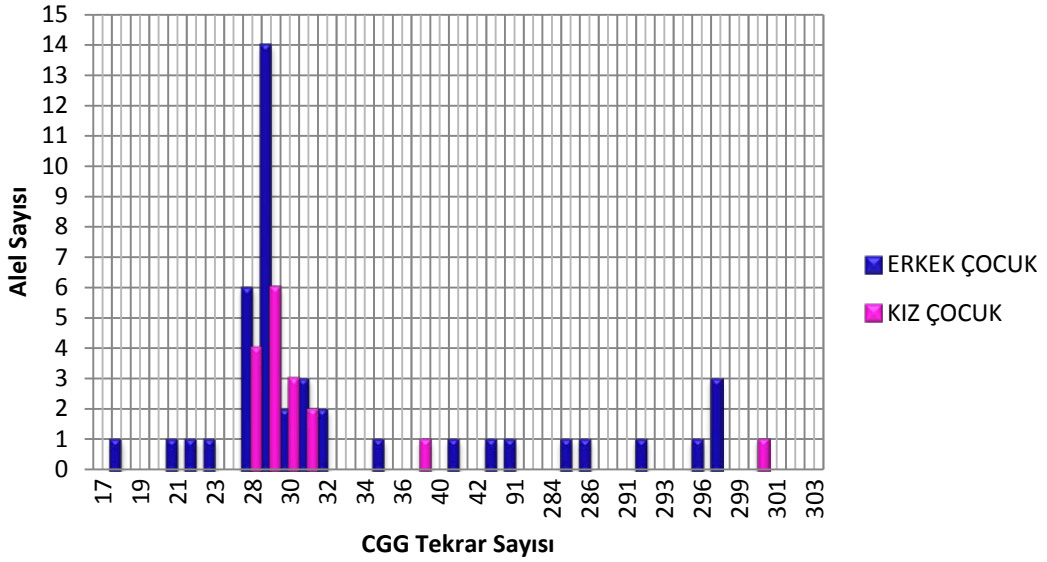
Tablo 4.1. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına FXS şüphesiyle başvuran 3-15 yaş arası 50 çocukta FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre yüzdeleri.

	Erkek Çocuk Sayısı (%) (yaş ortalaması 7.7)	Kız Çocuk Sayısı (%) (yaş ortalaması 7.33)
Full mutasyon, >200 tekrar	6+1* (%15)/ (%17.07)*	1 (%11.11)
Premutasyon, 55-200 tekrar	1+1* (%2.5)/ (%4.87)*	0 (%0)
Gray zone, 45-55 tekrar	0 (%0)	0 (%0)
Normal <45 tekrar	33	8
Toplam	40+1*	9

*** Size Mozaisizm'li kişiyi eklediğimizdeki durum**

Tablo 4.2. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına FXS şüphesiyle başvuran 3-15 yaş arası 50 çocukta alel bazlı FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre tekrar ortalaması ve yüzdeleri.

	Erkek Çocuklarında İncelenen Alel Sayısı/Tekrar Ortalaması (%) (yaş ortalaması 7.7)	Kız Çocuklarında İncelenen Alel Sayısı/Tekrar Ortalaması (%) (yaş ortalaması 7.33)
Full mutasyon, >200 tekrar	7/292.85 (%16.6)	1/300 (%5.8)
Premutasyon, 55-200 tekrar	2/90.5 (%4.7)	0
Gray zone, 45-55 tekrar	0	0
Normal <45 tekrar	33/28.81 (%78.5)	16/29.68 (%94.1)
Toplam	42	17



Grafik 4.1. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına FXS şüphesiyle başvuran 3-15 yaş arası 50 çocukta CGG tekrar sayılarına göre alel sayılarının dağılımı

4.1. FMR1 SİZİNG PCR KİTİ (ABBOTT) ÇALIŞMA BULGULARI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası 9 kız ve 41 erkek olmak üzere toplam 50 çocuk'tan FMR1 Sizing PCR kiti ile FMR1 genindeki CGG trinükleotit tekrar sayılarının sonuçları tablo 4.3'de özetlenmiştir.

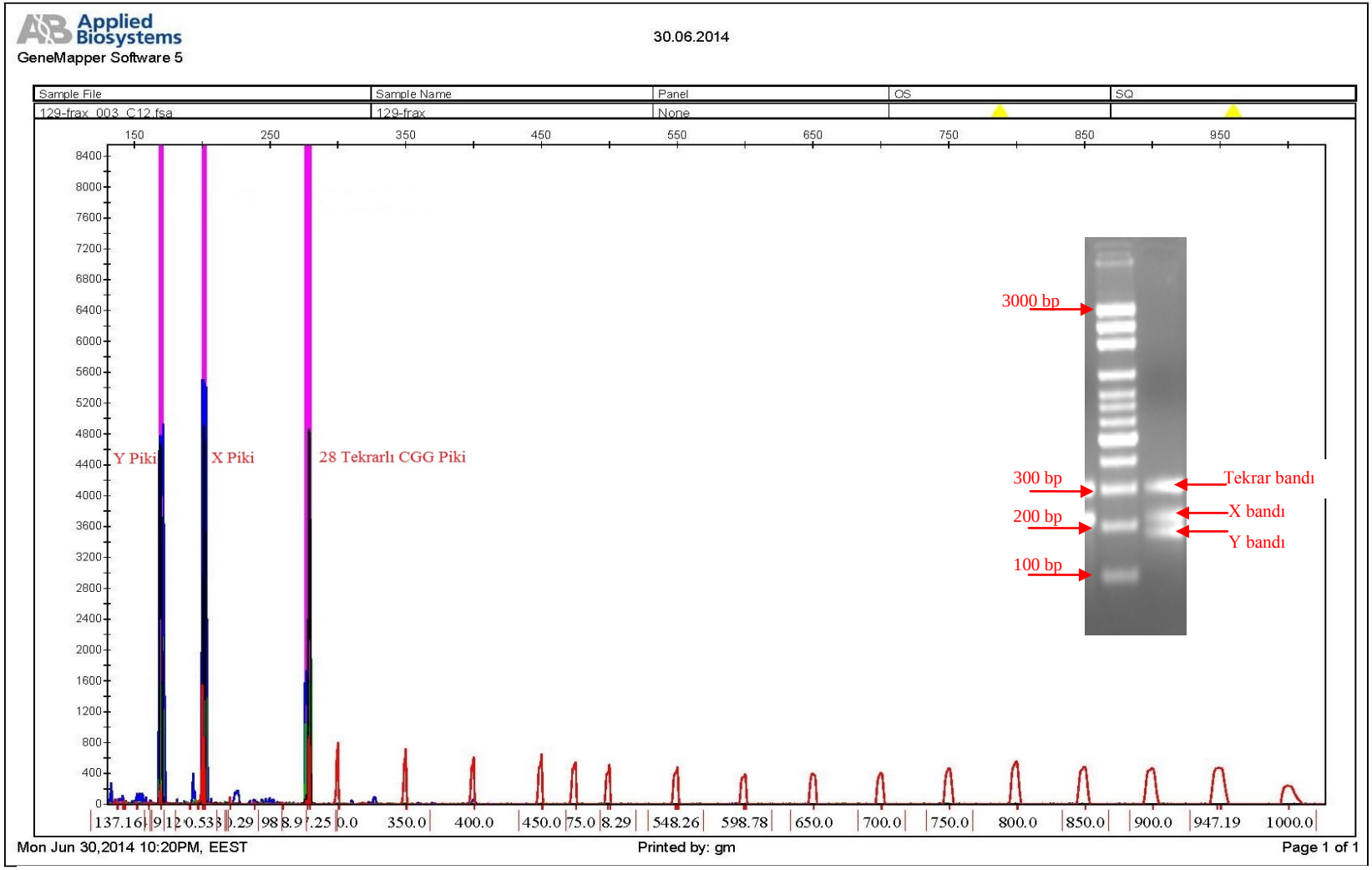
Tablo 4.3. FMR1 Sizing PCR kiti ile yapılan çalışmanın bulguları

Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	CGG Tekrar Size (bp)	CGG Tekrar Sayısı
107	D. A. A.	XY	10	281.68 bp	29
129	E. C. Y.	XY	8	278.81 bp	28
215	E. D.	XX	7	278.87 - 281.75 bp	28-29
257	M. E. S.	XY	5	281.67 bp	29
268**	A. Ö.	XY	12	1085.09 bp	297
346	K. Ş.	XY	6	278.84 bp	28
366	Y. Y.	XY	6	290.49 bp	32
593**	Y. S.	XY	10	1070.63 bp	292
599	F. K.	XY	3	279.09 bp	28
728	S. Y.	XY	12	282.36 bp	29
972**	E. B.	XY	14	1053.91 bp	286
999	H. D.	XY	11	288.83 bp	31
1005	İ. L. T.	XY	4	318.35 bp	41
1316	A. Y. D.	XY	11	286.03 bp	31
1627	İ. E. K.	XY	15	282.56 bp	29
1668	D. D.	XY	7	283.19 bp	30
1741	M. B.	XY	11	282.76 bp	29
1812	F. A.	XY	9	278.97 bp	28
2127	H. A.	XY	9	290.37 bp	32
2223	A. K.	XX	15	282.51- 287.90 bp	29-31
2478	M. A.	XY	6	249.94 bp	18
2485	A. N. D.	XY	4	279.55 bp	28
2562	A. A. B.	XY	5	288.26 bp	31
2886	M. A.	XY	4	261.10 bp	22
2903	M. C.	XX	6	282.53- 285.07 bp	29-30
2965	M. Ö.	XY	13	279.20 bp	28
3008	U. D.	XY	3	262.35 bp	23
3010	Z. K.	XX	9	278.78-281.71 bp	28-29
3070	M. T.	XX	8	278.45-281.39 bp	28-29

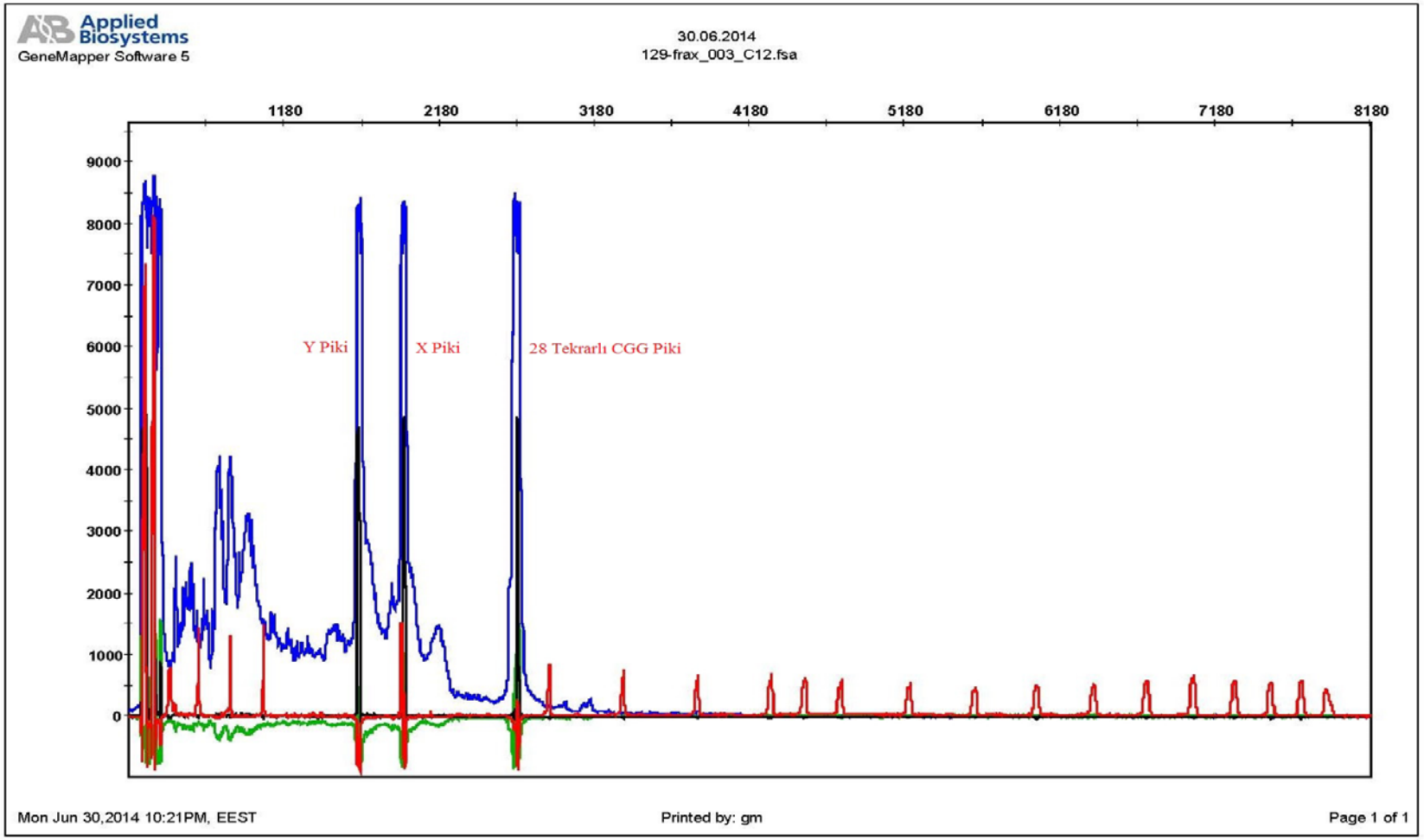
Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	CGG Tekrar Size (bp)	CGG Tekrar Sayısı
3173	U. Ç.	XY	13	281.52 bp	29
3316**	K. K.	XY	5	1082.74 bp	296
3347**	B. K.	XY	3	1050.57 bp	285
3479	S. D.	XX	8	287.43 bp	31
3514	B. B. G.	XY	13	281.89 bp	29
3554	A. D. A.	XY	6	284 bp	30
3555	K. K.	XY	9	257.11 bp	21
3898**	Z. N. B.	XX	5	283.14-1095 bp	30-300
4021	E. K.	XX	3	283.31-306.16 bp	30-37
4173	H. Y.	XY	3	282.59 bp	29
4460	E. E.	XY	4	282.30 bp	29
4223	E. B.	XY	4	282.14 bp	29
4554	F. K.	XX	5	278.86-281.70 bp	28-29
4851***	S. Ö.	XY	12	464.76 bp	90
4889	B. T. A.	XY	6	299.53 bp	35
5083	E. K.	XY	12	282.82 bp	29
5134	A. A. S.	XY	10	282.67 bp	29
5294**	M. T. S.	XY	2	1085.76 bp	297
5355	B. T. Ö.	XY	3	282.33 bp	29
5489	İ. H. O.	XY	8	282.84 bp	29
5532*	M. S.	XY	8	466.76-1086.99 bp	91-297

***** Size Mozaisizm, ** Full Mutasyon, *** Premutasyon görülmüştür.

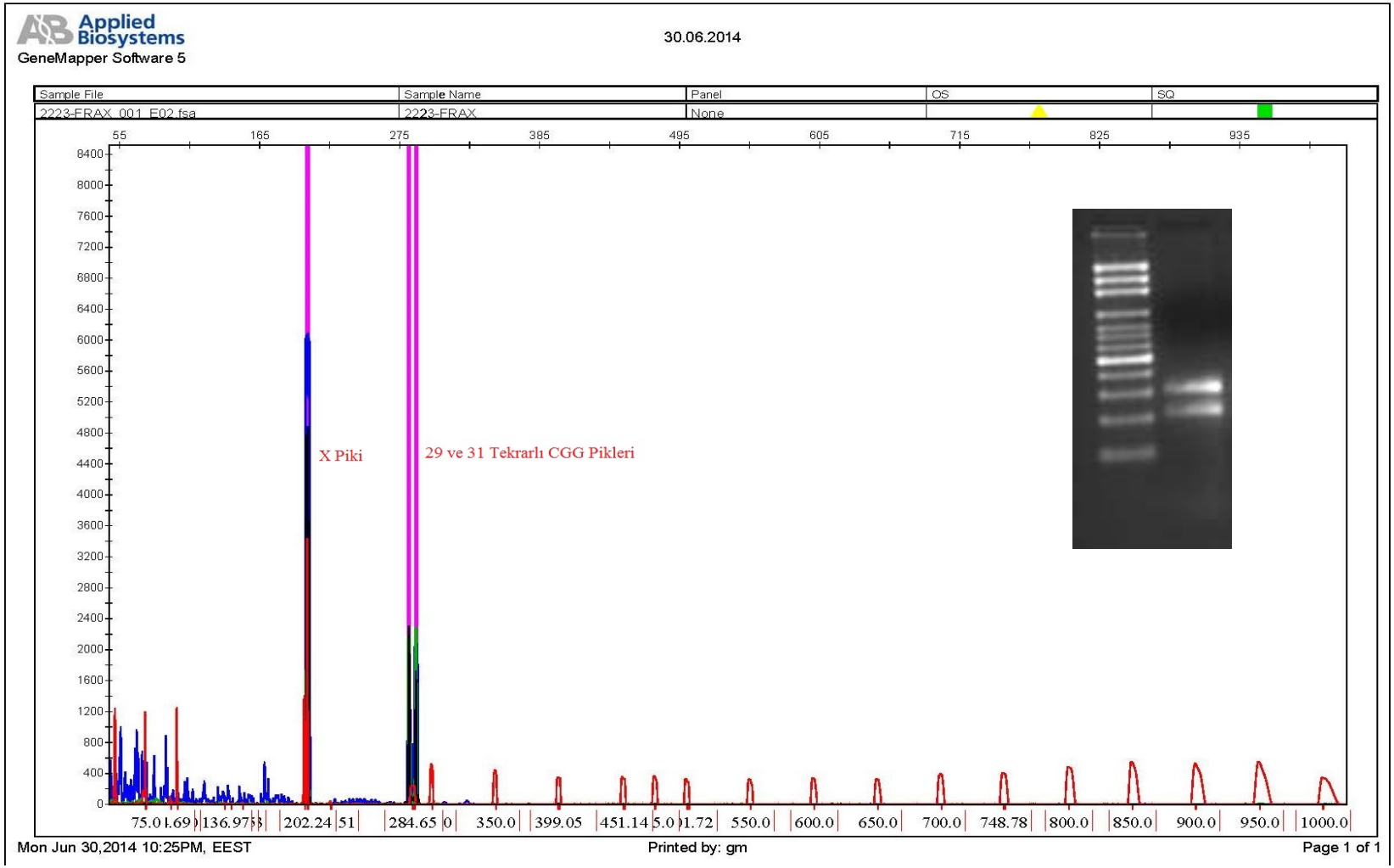
Normal erkek (Şekil 4.1, 4.2), normal kız (Şekil 4.2, 4.3), premutasyonlu erkek (Şekil 4.4, 4.5), size mosaisizimli erkek (Şekil 4.6, 4.7), full mutasyonlu erkek (Şekil 4.8, 4.9) çocukların GeneMapper Analiz ve PCR sonrası çoğaltılmış bölgelerin agaroz jel elektroforez görüntüleri yer almaktadır.



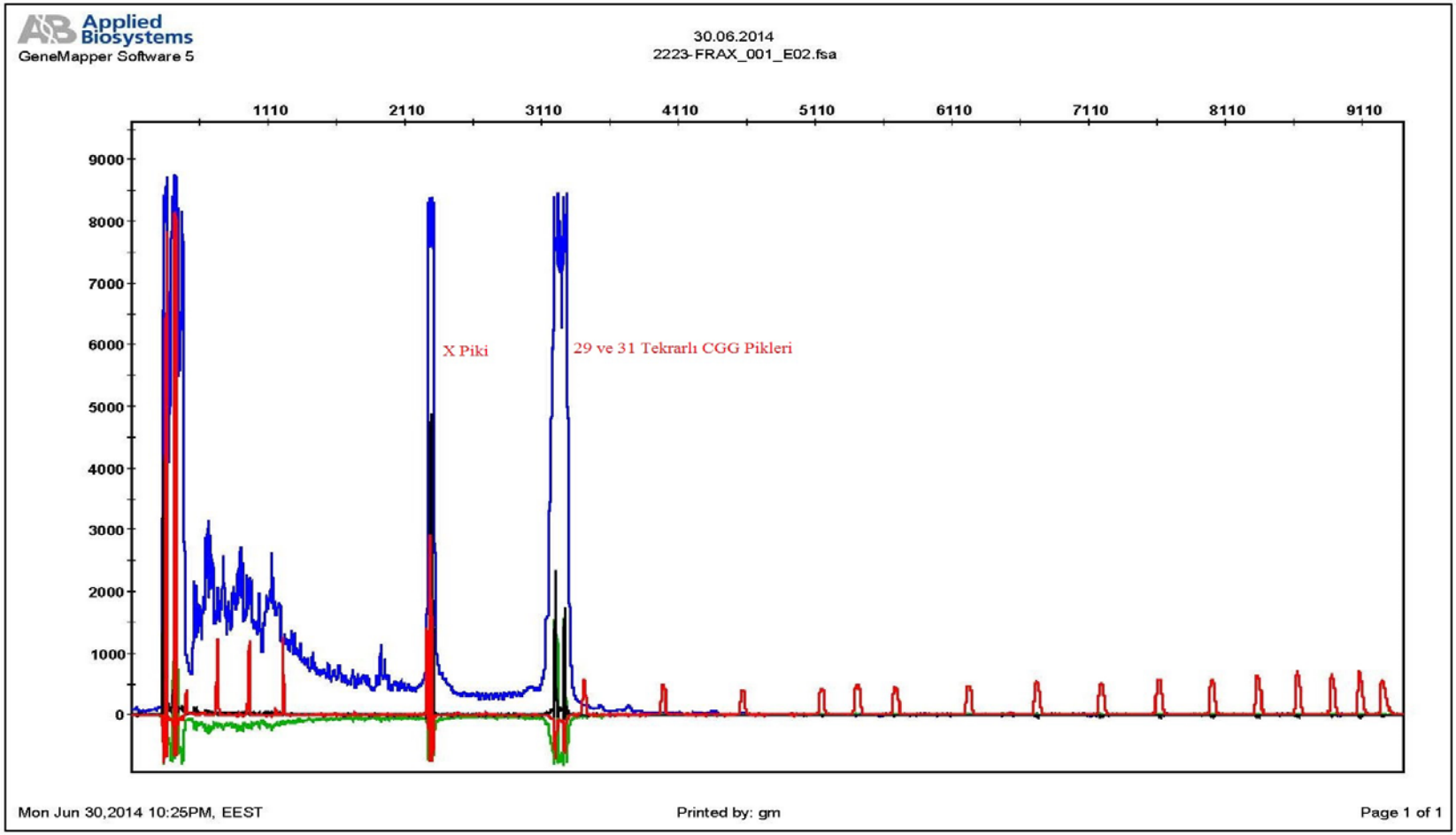
Şekil 4.1. 28 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü
(100 bp'lık Markır ve hastanın PCR sonrası çoğalmış bölgelerin bantları)



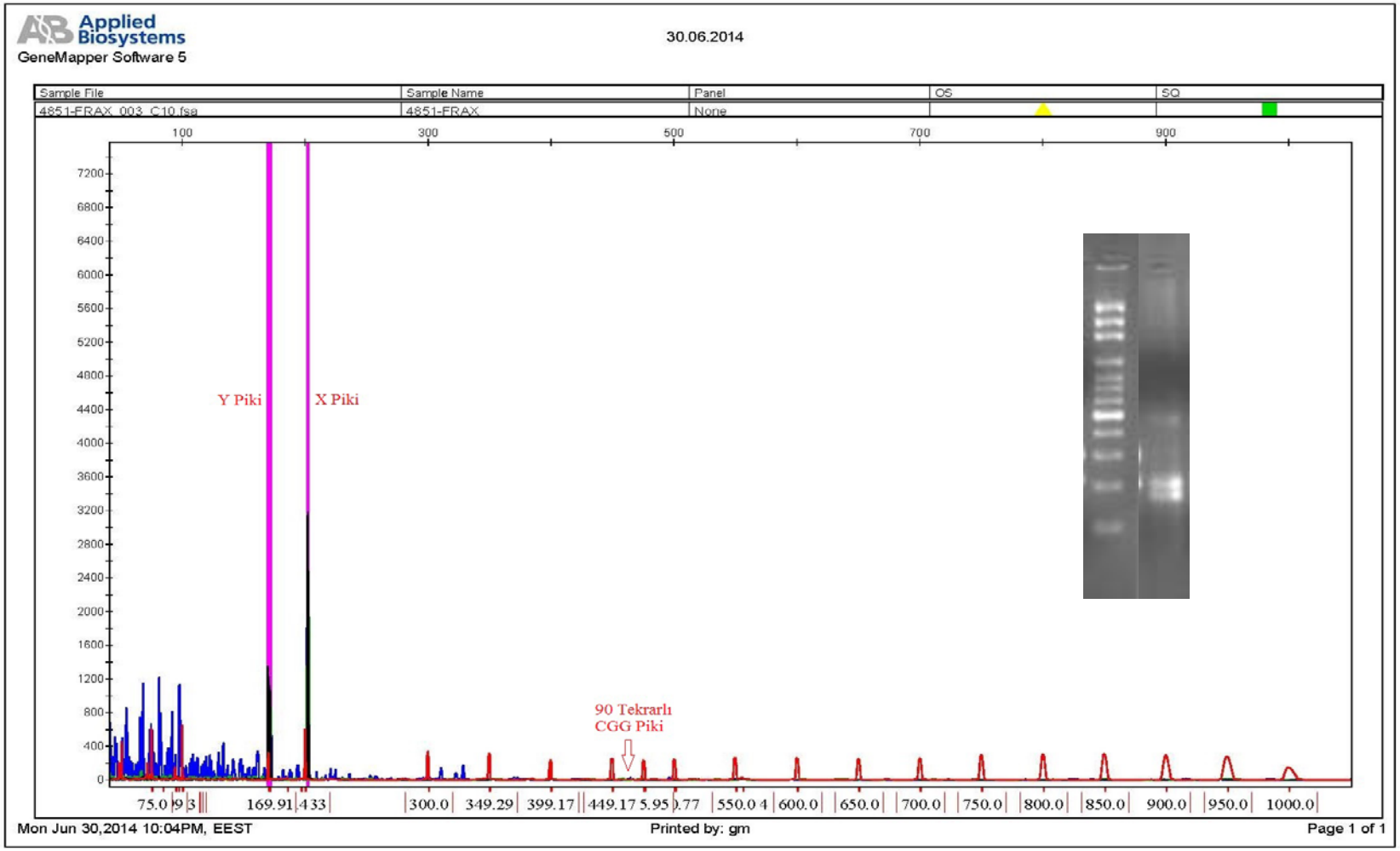
Şekil 4.2. 28 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü



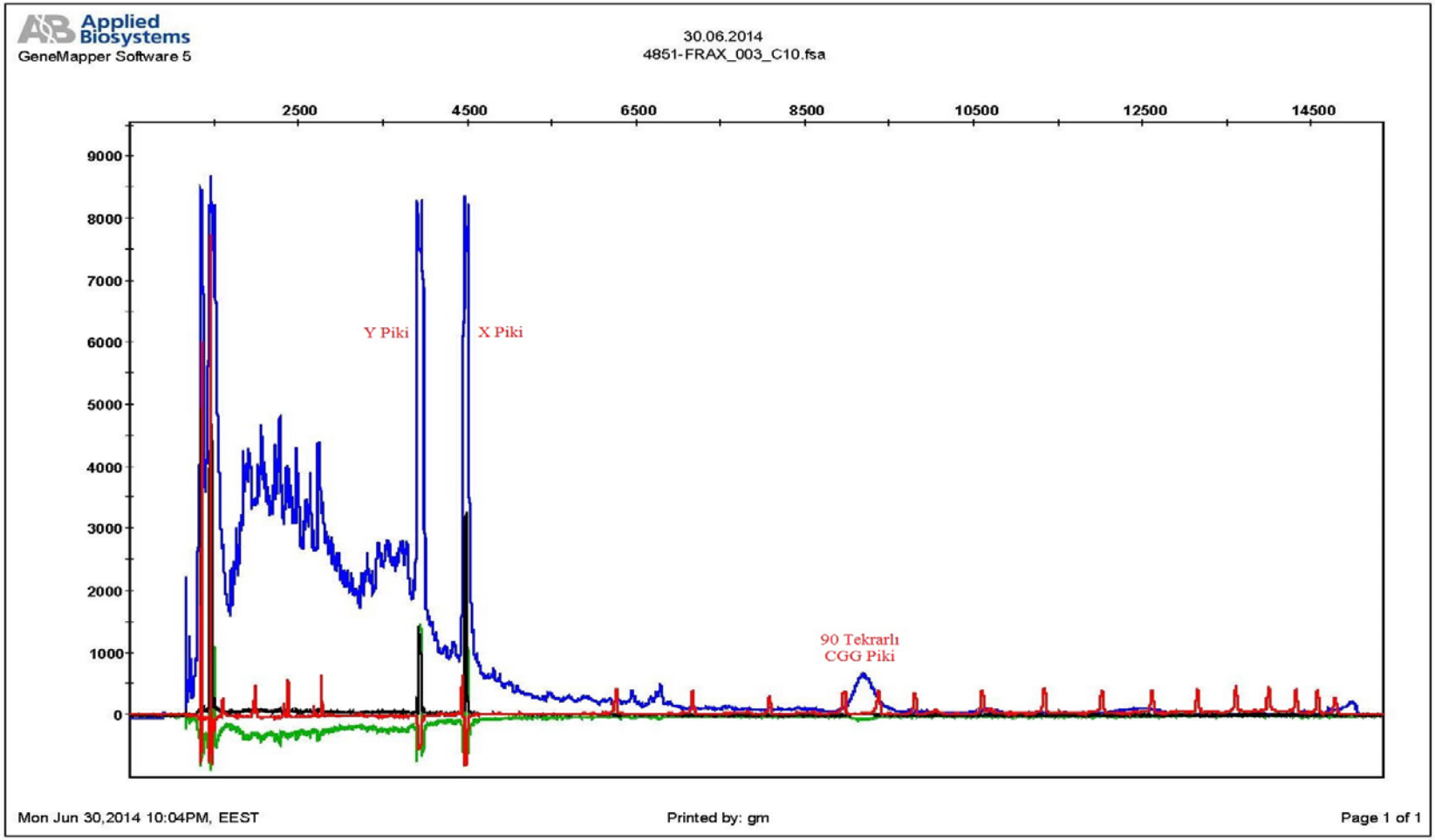
Şekil 4.3. 29 ve 31 Tekrarlı Kız çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü
(100 bp'lık Markır ve hastanın PCR sonrası çoğalmış bölgelerin bantları)



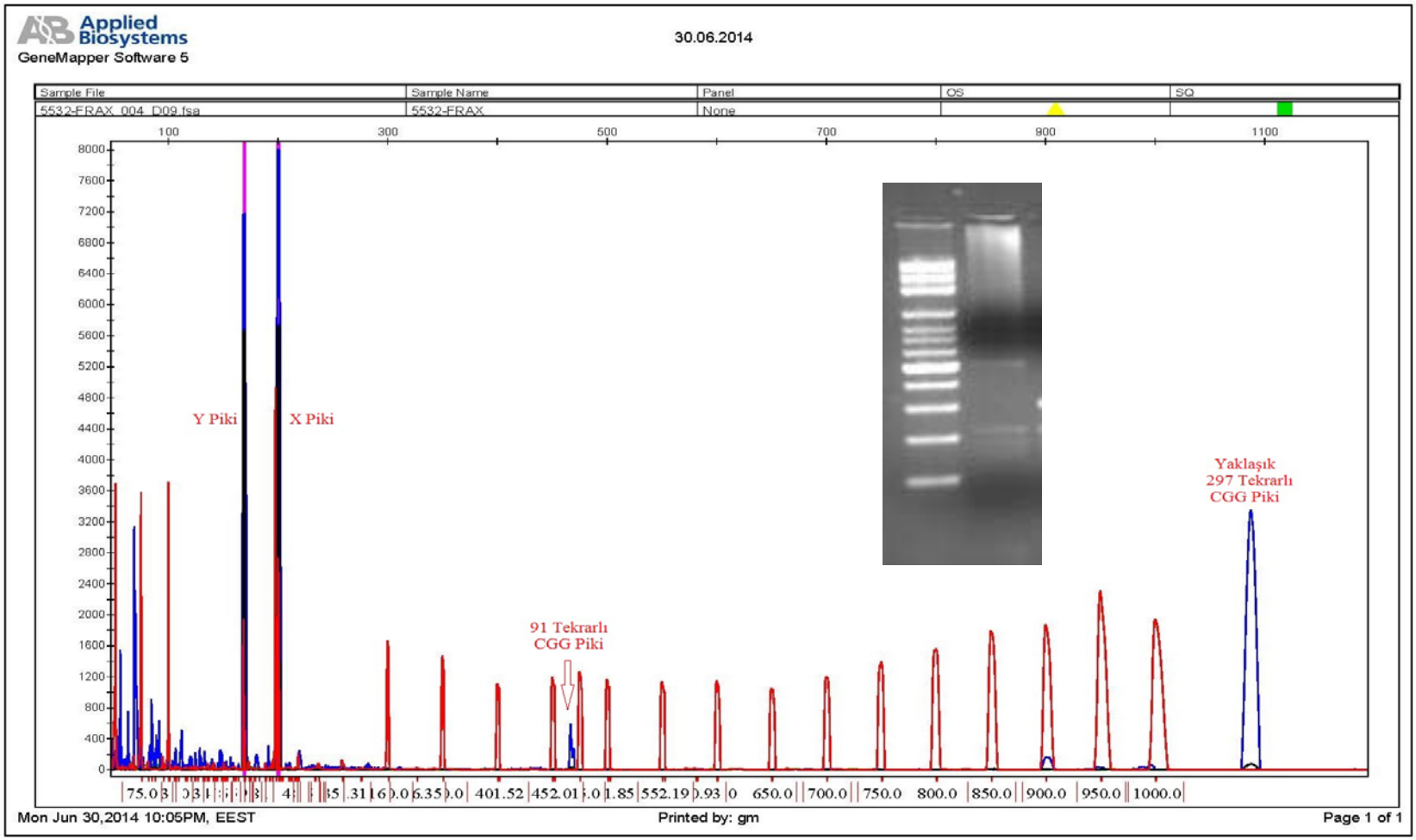
Şekil 4.4. 29 ve 31 Tekrarlı Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü



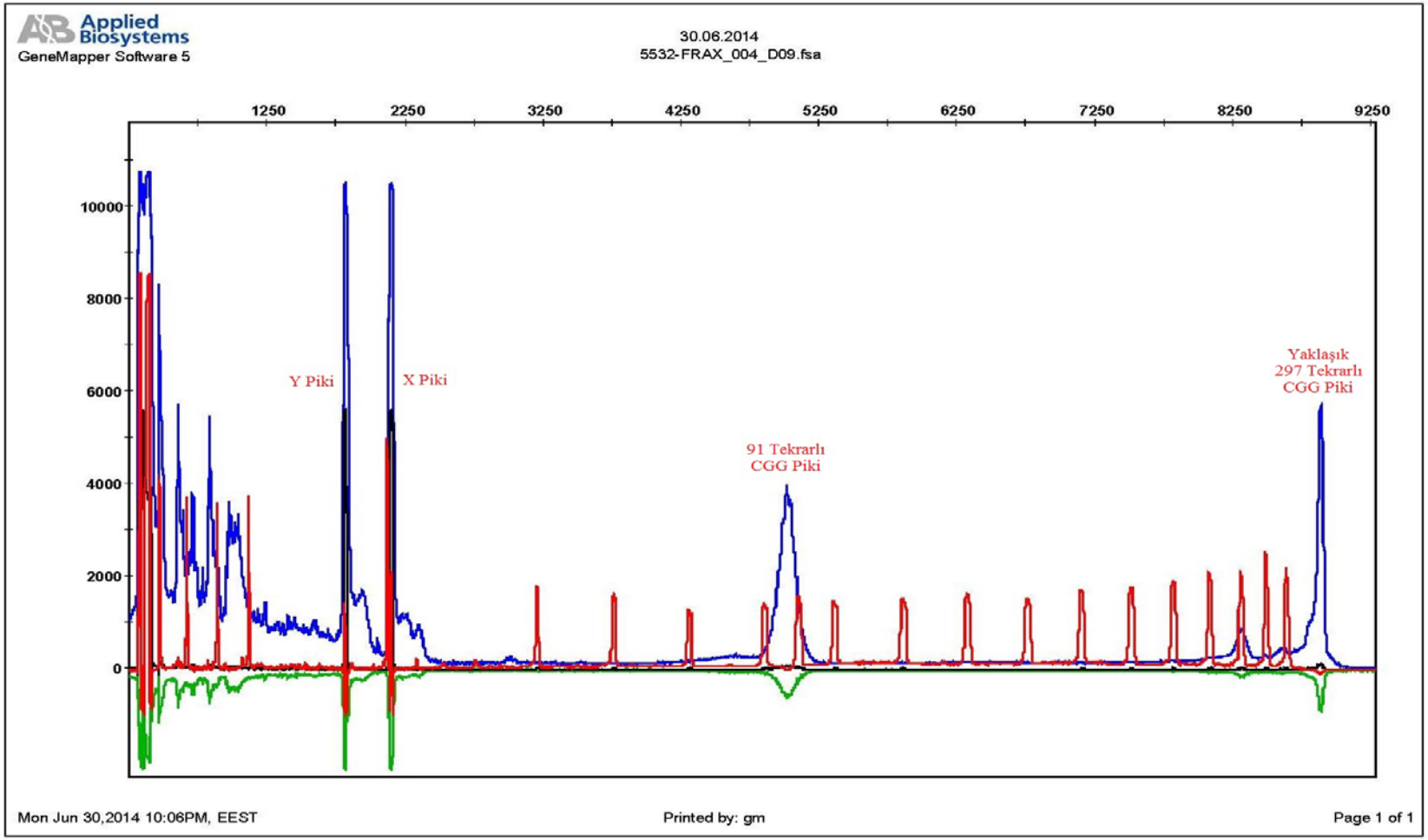
Şekil 4.5. 90 Tekrarlı Premutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü
(100 bp'lık Markır ve hastanın PCR sonrası çoğalmış bölgelerin bantları)



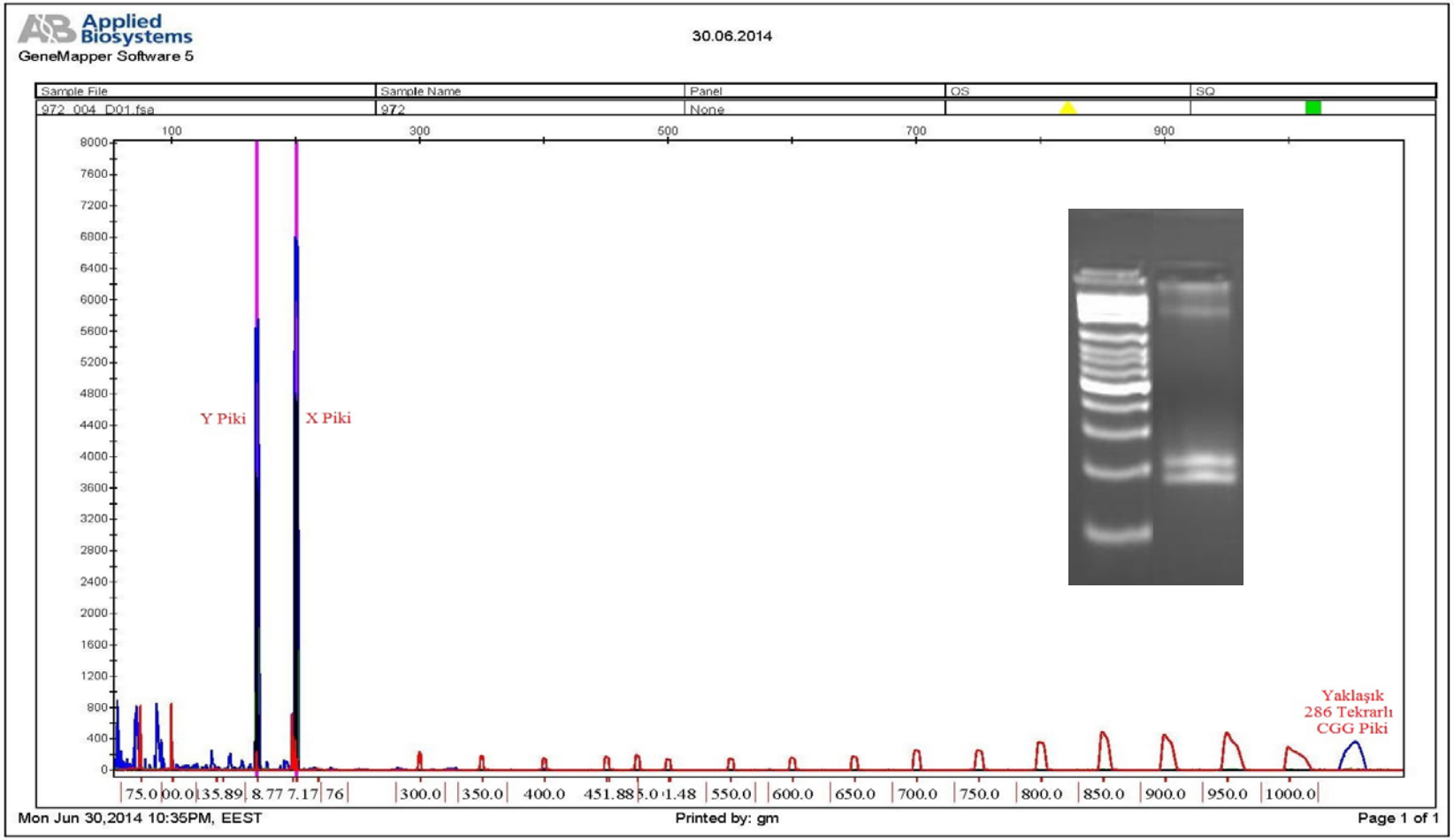
Şekil 4.6. 90 Tekrarlı Premutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü



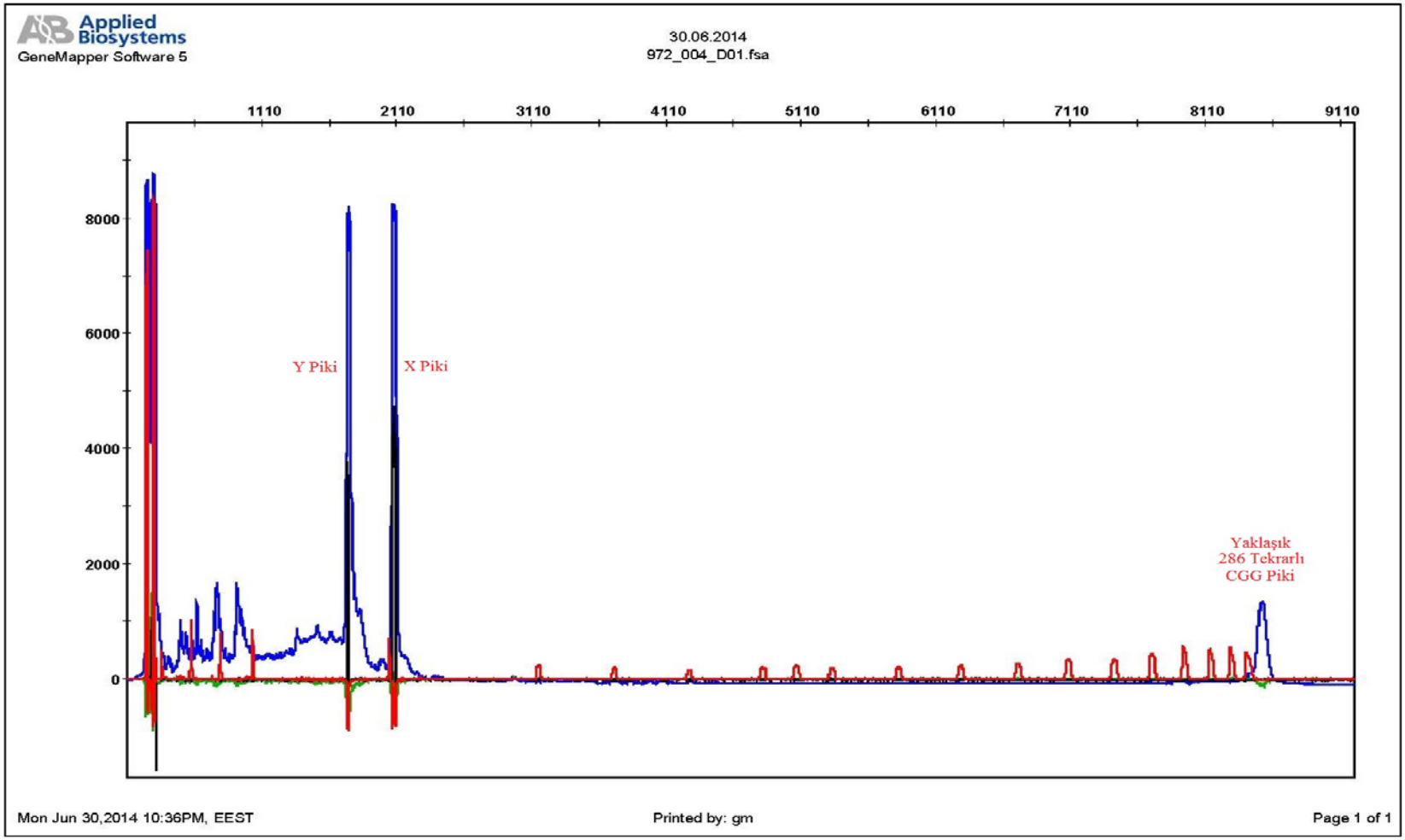
Şekil 4.7. 91 ve 297 Tekrarlı Size Mozaisizm olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü (100 bp'lık Markır ve hastanın PCR sonrası çoğalmış bölgelerin bantları)



Şekil 4.8. 91 ve 297 Tekrarlı Size Mozaisizm olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüsü



Şekil 4.9. 286 Tekrarlı Full mutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve agaroz jel görüntüsü
(100 bp'lık Markır ve hastanın PCR sonrası çoğalmış bölgelerin bantları)



Şekil 4.10. 286 Tekrarlı Full mutasyon olan Erkek çocuğun GeneMapper RAW Data Analiz görüntüs

4.2. SNP DETECTİVE FRAGİLE X KİTİ (GML®) ÇALIŞMA BULGULARI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası 9 kız ve 41 erkek olmak üzere toplam 50 çocuk'tan SNP Detective Fragile X kiti ile FMR1 genindeki CGG trinükleotit tekrar sayılarının sonuçları ve metilasyon durumları tablo 4.4'de özetlenmiştir.

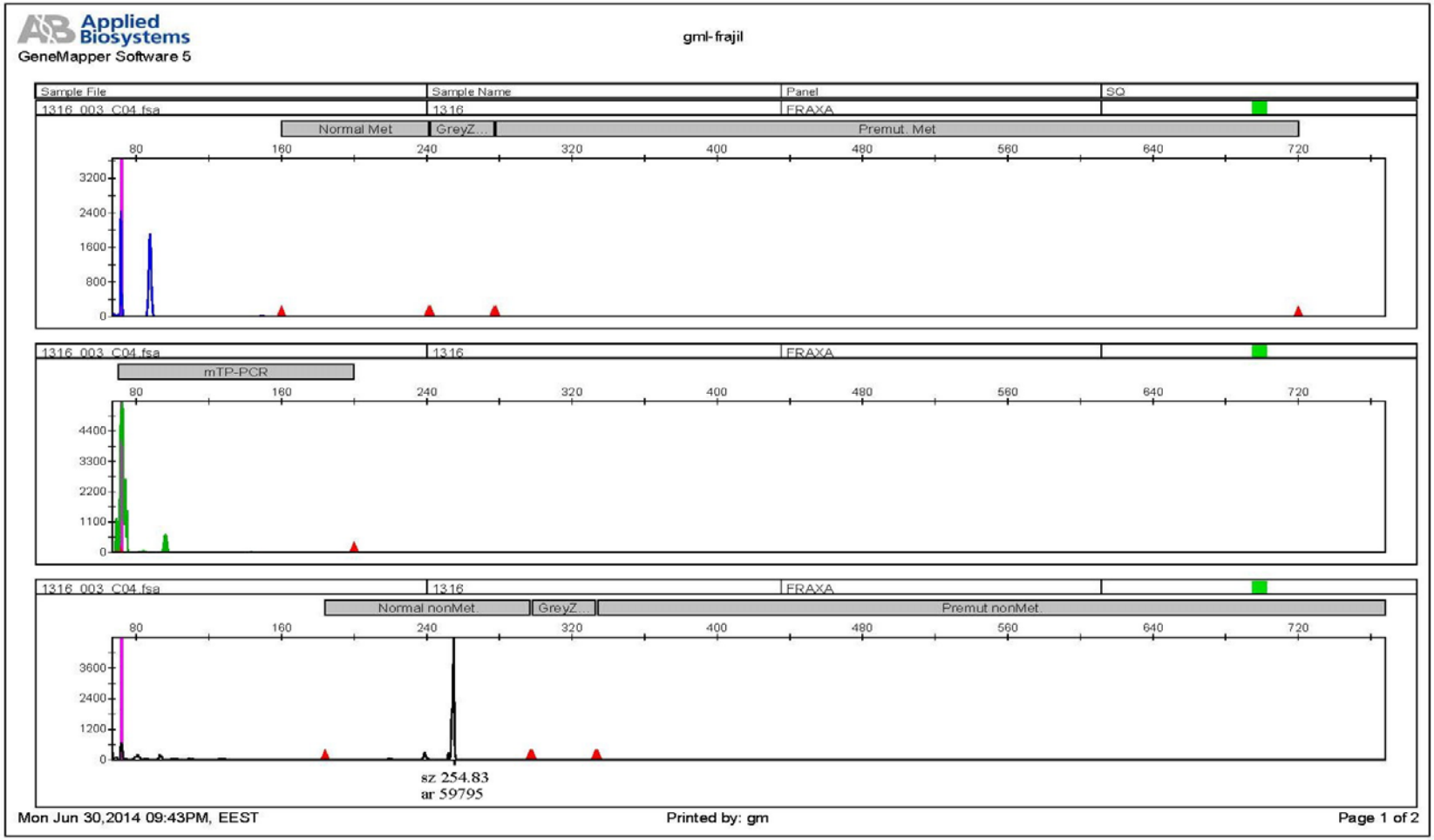
Tablo 4.4. SNP Detective Fragile X kiti ile yapılan çalışmanın bulguları

Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	CGG Tekrar Size (bp) / PCR Tipi	CGG Tekrar Sayısı	Metilasyon Durumu
107	D. A. A.	XY	10	252.69 bp/nonmet-PCR	28	Normal
129	E. C. Y.	XY	8	249.20 bp/nonmet-PCR	27	Normal
215	E. D.	XX	7	191.62-194.46 bp/met-PCR 249.09-252.03 bp/nonmet-PCR	27-28 27-28	Normal
257	M. E. S.	XY	5	251.96 bp/nonmet-PCR	28	Normal
268**	A. Ö.	XY	12		>200	Metillenmiş
346	K. Ş.	XY	6	249.13 bp/nonmet-PCR	27	Normal
366	Y. Y.	XY	6	260.68 bp/ nonmet-PCR	31	Normal
593**	Y. S.	XY	10		>200	Metillenmiş
599	F. K.	XY	3	249.15 bp/nonmet-PCR	27	Normal
728	S. Y.	XY	12	252.17 bp/nonmet-PCR	28	Normal
972**	E. B.	XY	14		>200	Metillenmiş
999	H. D.	XY	11	257.98 bp/nonmet-PCR	30	Normal
1005	İ. L. T.	XY	4	286.81 bp/nonmet-PCR	40	Normal
1316	A. Y. D.	XY	11	254.83 bp/nonmet-PCR	29	Normal
1627	İ. E. K.	XY	15	251.96 bp/nonmet-PCR	28	Normal
1668	D. D.	XY	7	251.98 bp/nonmet-PCR	28	Normal
1741	M. B.	XY	11	251.94 bp/nonmet-PCR	28	Normal
1812	F. A.	XY	9	248.98 bp/nonmet-PCR	27	Normal
2127	H. A.	XY	9	257.86 bp/nonmet-PCR	30	Normal
2223	A. K.	XX	15	194.33-200.22 bp/met-PCR 252.02-257.84 bp/nonmet-PCR	28-30 28-30	Normal
2478	M. A.	XY	6	220.00 bp/nonmet-PCR	18	Normal
2485	A. N. D.	XY	4	249.22 bp/nonmet-PCR	27	Normal
2562	A. A. B.	XY	5	257.91 bp/nonmet-PCR	30	Normal
2886	M. A.	XY	4	232.03 bp/nonmet-PCR	22	Normal
2903	M. C.	XX	6	194.30-197.20 bp/met-PCR 252.04-254.94 bp/nonmet-PCR	28-29 28-29	Normal
2965	M. Ö.	XY	13	249.12 bp/nonmet-PCR	27	Normal
3008	U. D.	XY	3	231.96 bp/nonmet-PCR	21	Normal
3010	Z. K.	XX	9	191.59-194.44 bp/met-PCR 249.08-252.04 bp/nonmet-PCR	27-28 27-28	Normal
3070	M. T.	XX	8	194.30 bp/met-PCR 249.05 bp/nonmet-PCR	28 27	Normal

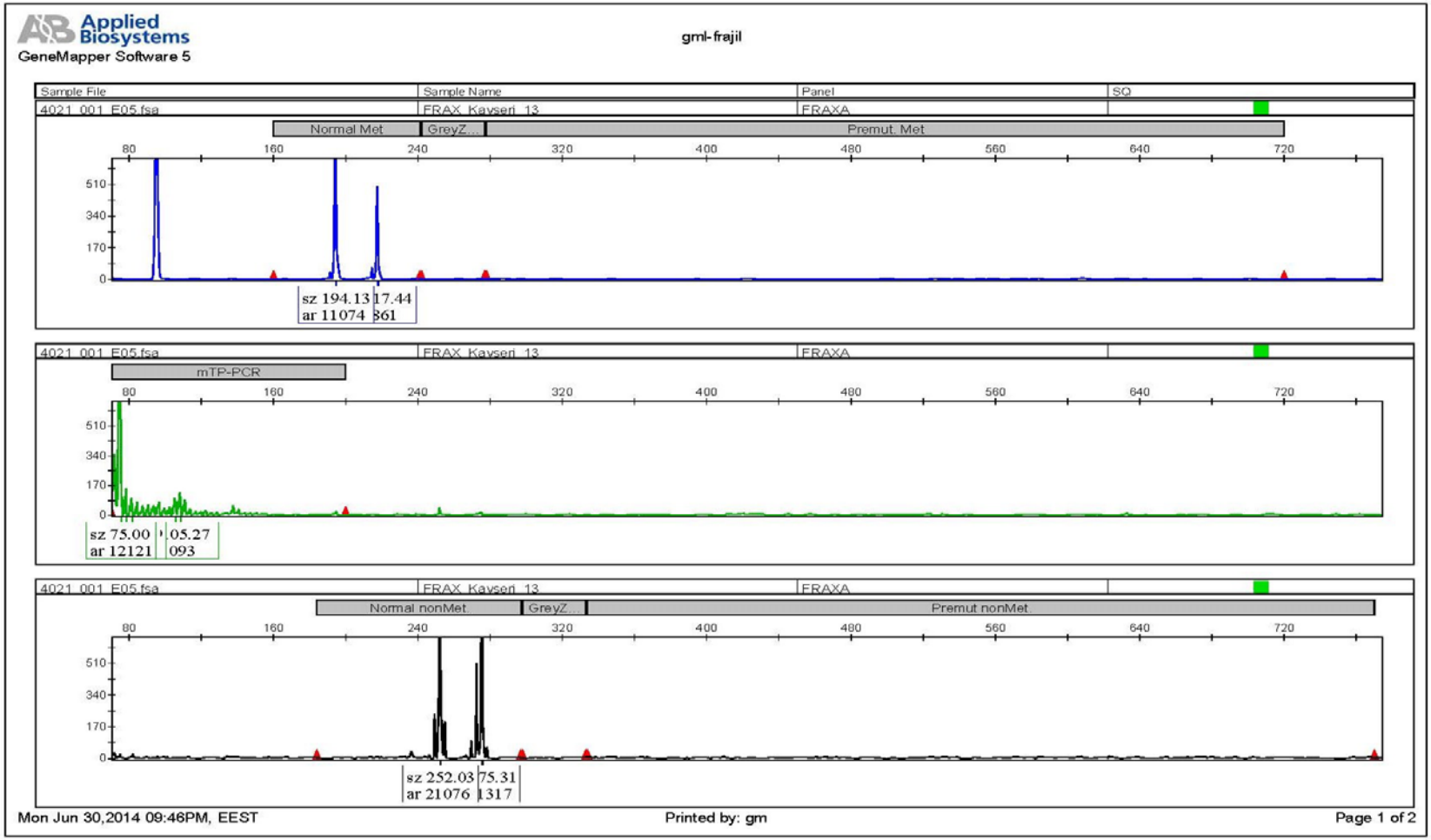
Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	CGG Tekrar Size (bp) / PCR Tipi	CGG Tekrar Sayısı	Metilasyon Durumu
3173	U. Ç.	XY	13	252.00 bp/nonmet-PCR	28	Normal
3316**	K. K.	XY	5		>200	Metillenmiş
3347**	B. K.	XY	3		>200	Metillenmiş
3479	S. D.	XX	8	197.37 bp/met-PCR 252.00 bp/nonmet-PCR	29 28	Normal
3514	B. B. G.	XY	13	249.04 bp/nonmet-PCR	27	Normal
3554	A. D. A.	XY	6	252.20 bp/nonmet-PCR	28	Normal
3555	K. K.	XY	9	226.26 bp/nonmet-PCR	20	Normal
3898**	Z. N. B.	XX	5	194.29 bp/met-PCR 252.13 bp/nonmet-PCR	28 28 >200	Metillenmiş
4021	E. K.	XX	3	194.13-217.44 bp/met-PCR 252.03-275.31 bp/nonmet-PCR	28-35 28-36	Normal
4173	H. Y.	XY	3	251.91 bp/nonmet-PCR	28	Normal
4460	E. E.	XY	4	251.99 bp/nonmet-PCR	28	Normal
4223	E. B.	XY	4	252.07 bp/nonmet-PCR	28	Normal
4554	F. K.	XX	5	191.47-194.26 bp/met-PCR 249.31-252.21 bp/nonmet-PCR	27-28 27-28	Normal
4851***	S. Ö.	XY	12	433.94 bp/nonmet-PCR	89	Normal
4889	B. T. A.	XY	6	269.38 bp/nonmet-PCR	34	Normal
5083	E. K.	XY	12	251.98 bp/nonmet-PCR	28	Normal
5134	A. A. S.	XY	10	252.09 bp/nonmet-PCR	28	Normal
5294**	M. T. S.	XY	2		>200	Metillenmiş
5355	B. T. Ö.	XY	3	251.99 bp/nonmet-PCR	28	Normal
5489	İ. H. O.	XY	8	252.33 bp/nonmet-PCR	28	Normal
5532*	M. S.	XY	8	431.10 bp/nonmet-PCR	88 >200	Metillenmiş

*** Size Mozaisizm, ** Metillenmiş Full Mutasyon, *** Premutasyon görülmüştür.**

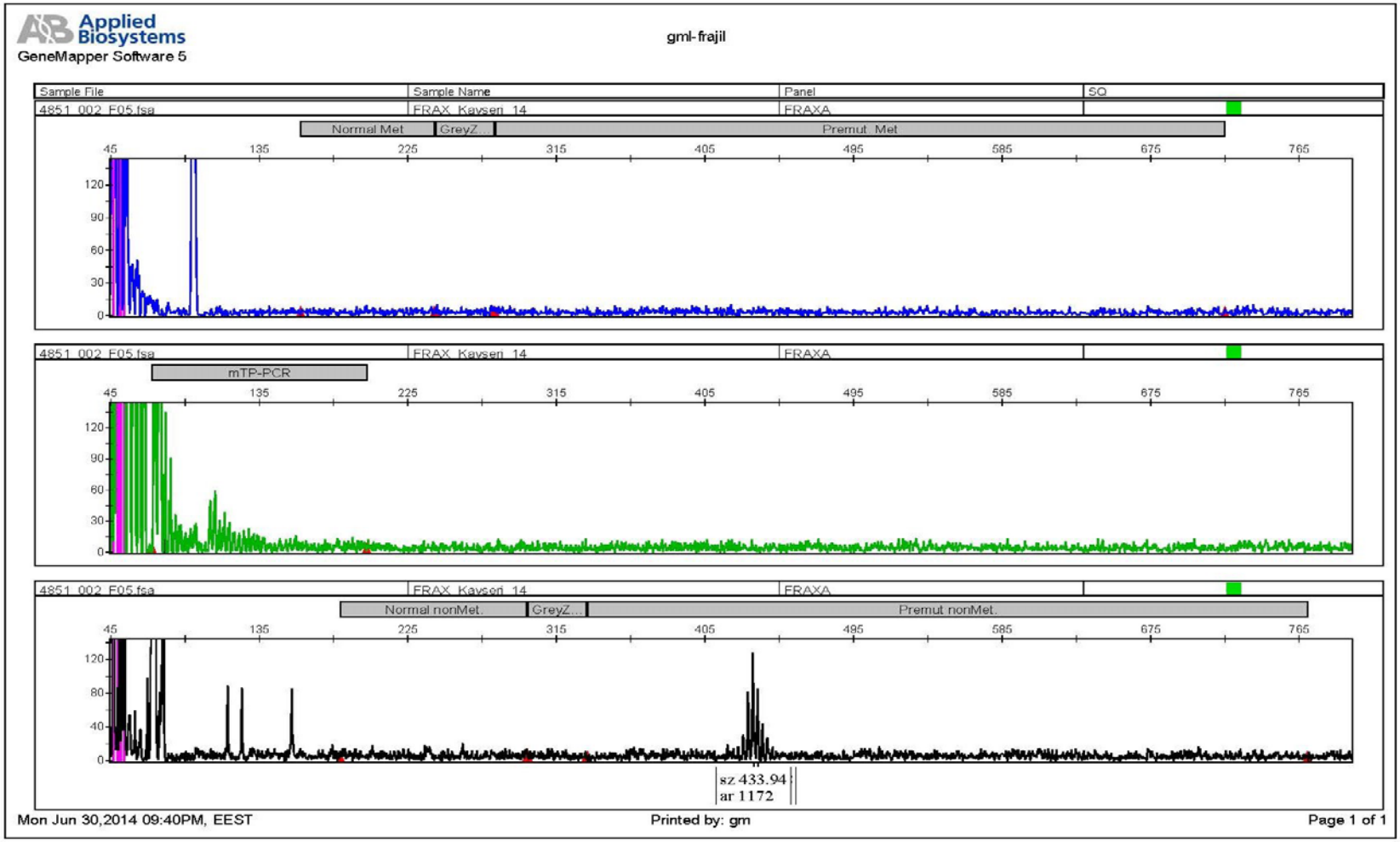
Normal erkek (Şekil 4.11), normal kız (Şekil 4.12), premutasyonlu erkek (Şekil 4.13), size mosaisizimli erkek (Şekil 4.14), full mutasyonlu kız (Şekil 4.15), full mutasyonlu erkek (Şekil 4.16) çocuklarda gözlenen desenler, GeneMapper Analiz görüntüleri ve metilasyon durumları yer almaktadır.



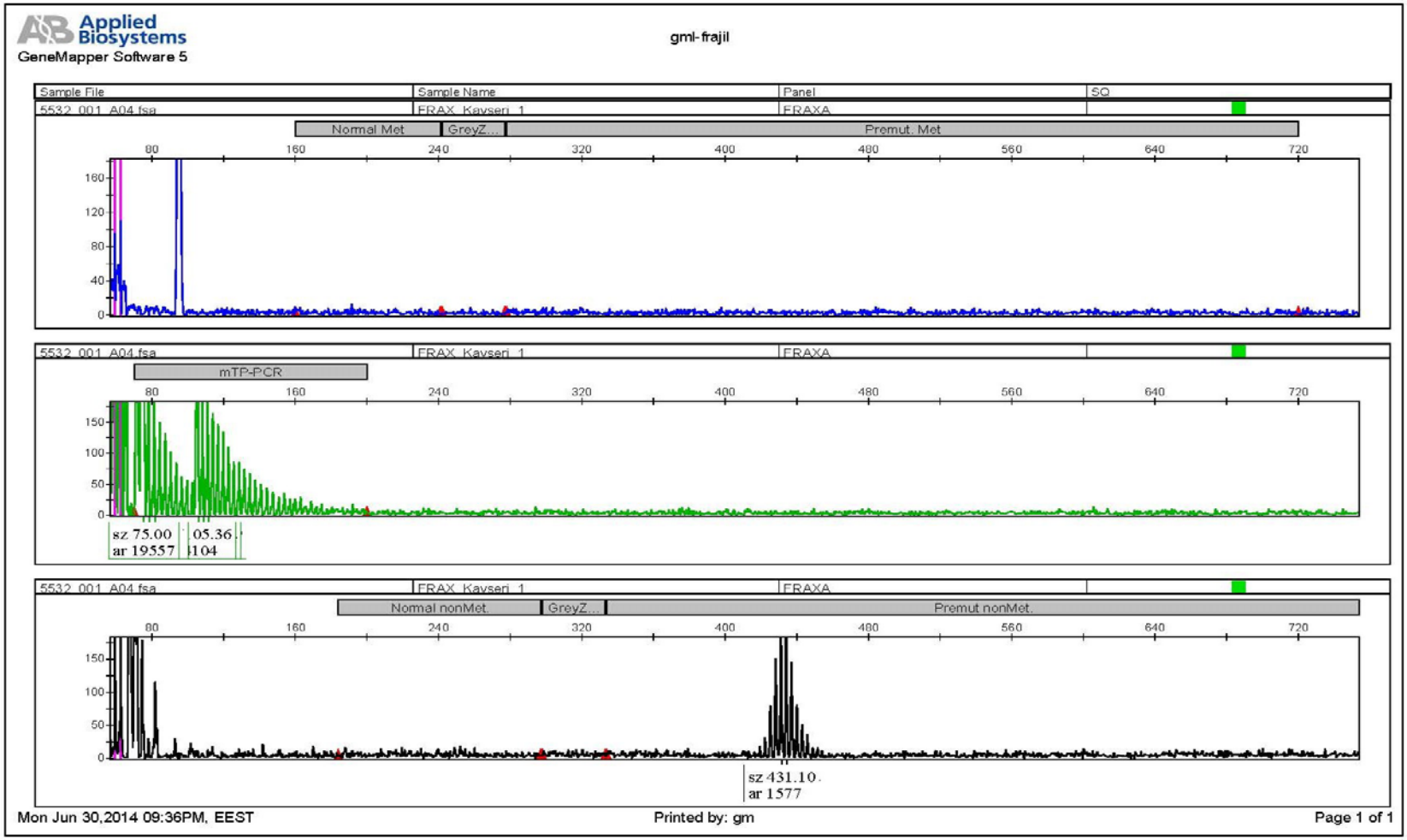
Şekil 4.11. 29 tekrarlı Normal Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü



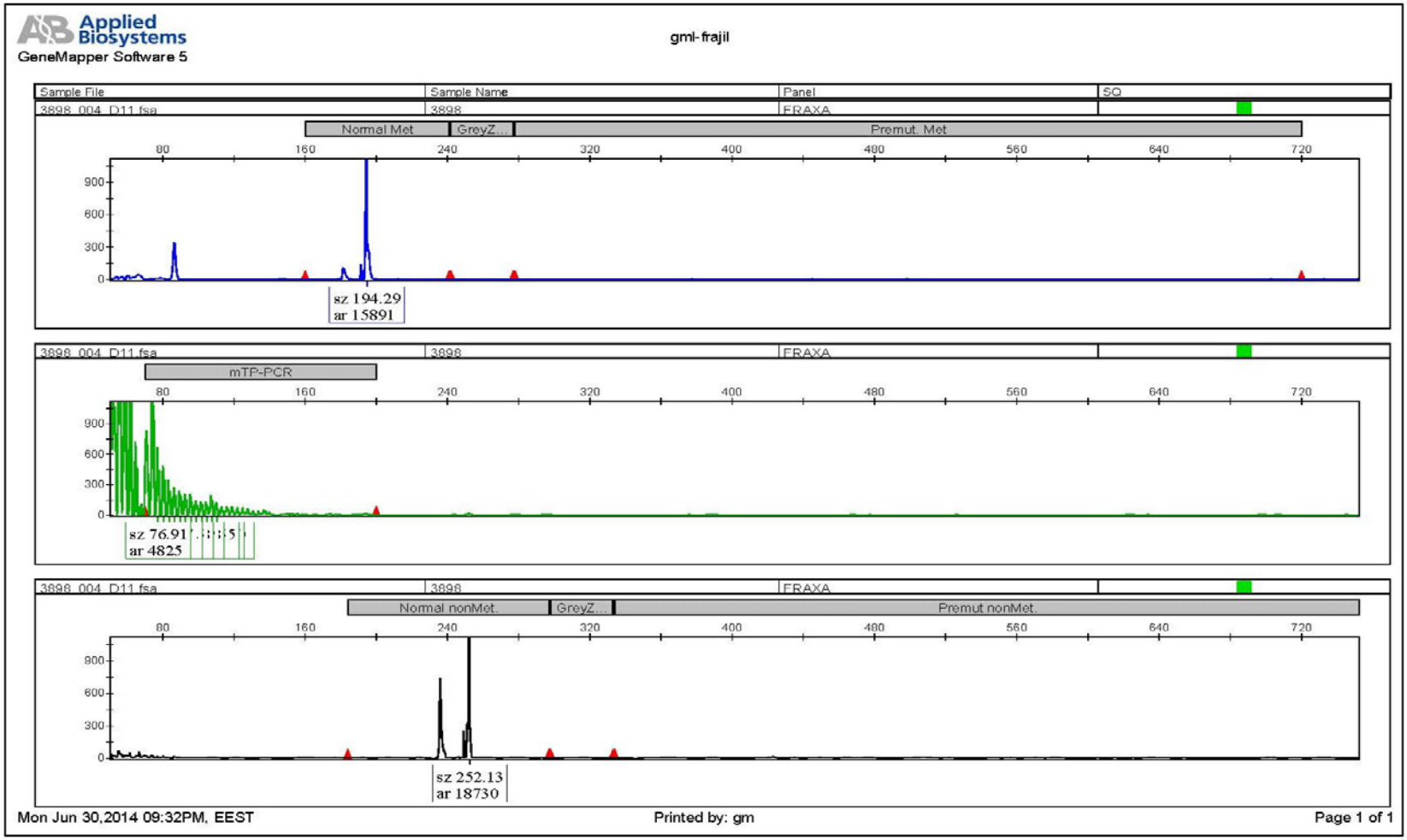
Şekil 4.12. 28 ve 36 tekrarlı Normal Kız çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü



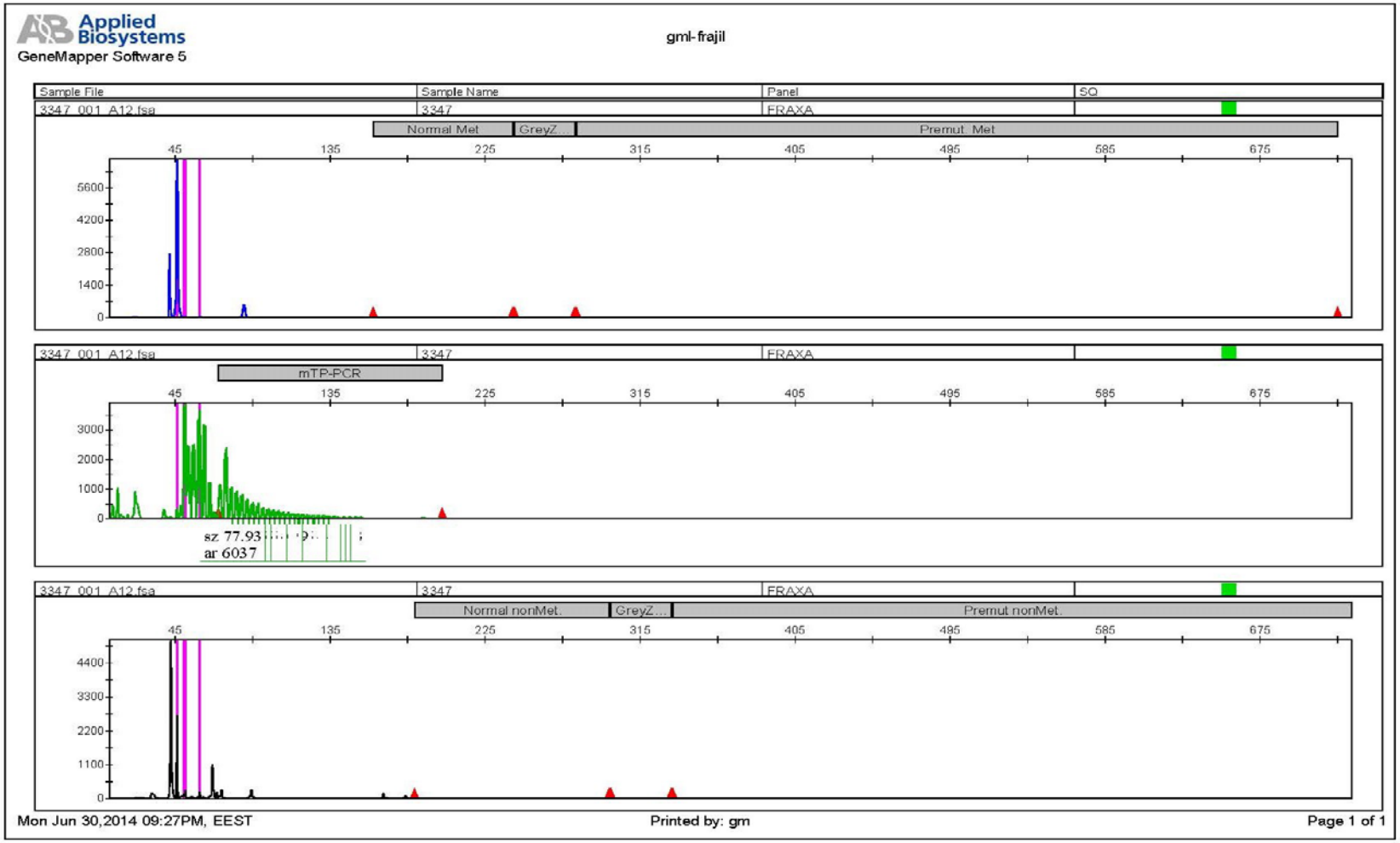
Şekil 4.13. 89 tekrarlı Premutasyonlu Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü



Şekil 4.14. 88 tekrarlı ve Metillenmiş Size Mosaisizmli Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü



Şekil 4.15. 28 tekrarlı ve Metillenmiş Full Mutasyonlu Kız çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü



Şekil 4.16. Metillenmiş Full Mutasyonlu Erkek çocuğun GeneMapper analiz ve desen görüntüsü

4.3. FMR1 SİZİNG PCR KİTİ (ABBOTT) İLE SNP DETECTİVE FRAGİLE X KİTİ (GML®) ÇALIŞMA BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na Frajil X sendromu (FXS) şüphesi ile gelen 3-15 yaş arası 9 kız ve 41 erkek olmak üzere toplam 50 çocuk'tan FMR1 Sizing PCR kiti ve SNP Detective Fragile X kiti ile FMR1 genindeki CGG trinükleotit tekrar sayılarının sonuçları ve metilasyon durumları tablo 4.5'de özetlenmiştir.

Diagnostik amaçlı olan FMR1 Sizing PCR kiti FMR1 genindeki CGG trinükleotit normal (< 45), gri zon (45-54), premutasyon (55-200) tekrar uzunluklarında verimli netice alındı. Full mutasyon (>200) tekrar sayılarını gözden kaçırma riskimiz oluşabilir. 269 tekrara kadar kesin sonuç verilebilir ve 269 tekrardan daha yüksek tekrarda ise tekrar sayısı tahmini değer verilebilir. Bu kit ile sadece ve sadece tekrar sayılarını görebiliriz kitin isminden de anlaşıldığı gibi ve mozaik vakalardan ise size mozaisizmi tespit edebiliriz.

Araştırmaya amaçlı olan SNP Detective Fragile X kiti FMR1 genindeki CGG trinükleotit normal (< 45), gri zon (45-54), premutasyon (55-200) tekrar uzunluklarında verimli netice alındı fakat FMR1 Sizing PCR kiti ile karşılaştırdığımızda yaklaşık bir CGG tekrar yani 3 bç uzunluğu kadar eksik veriler elde edildi bunun sebepleri arasında; tekrar sayısı başlama uzunluğu yanlış hesaplanmış olabilir, cihazın run yaptığı ortamdan (polimerden, bufferdan...) kaynaklı olabilir. Sonuç olarak hem tekrar uzunluğunu hemde metilasyon durumunu vermesi nedeniyle araştırma amaçlı olan kit ileri ki zamanlarda optimizasyon yapılarak diagnostik açıdan kullanılabilir durum da karşımıza çıkabilir. Ancak nadir durumlarda full mutasyonlu olsa bile hücreler metillenmemiş olabilir böylece metilasyon kısmı yada eksik kabul edilir. Bu durum metilasyon mozaisizim ortaya çıkarır. Metilasyon mozaisizmde metillenmemiş ve metillenmiş durumda full mutasyon taşırlar. Metilasyon derecesi FXS şiddetini etkileyebilir.

Tablo 4.5. FMR1 Sizing PCR kiti ve SNP Detective Fragile X kiti ile yapılan çalışmaların karşılaştırılması

Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	FMR1 Sizing PCR Kiti (ABBOTT)		SNP Detective Fragile X Kiti (GML®)		
				CGG Tekrar Size (bp)	CGG Tekrar Sayısı	CGG Tekrar Size (bp) / PCR Tipi	CGG Tekrar Sayısı	Metilasyon Durumu
107	D. A. A.	XY	10	281.68 bp	29.56	252.69 bp/nonmet-PCR	28.89	Normal
129	E. C. Y.	XY	8	278.81 bp	28.60	249.20 bp/nonmet-PCR	27.73	Normal
215	E. D.	XX	7	278.87 - 281.75 bp	28.62-29.58	191.62-194.46 bp/met-PCR 249.09-252.03 bp/nonmet-PCR	27.20-28.15 27.69-28.67	Normal
257	M. E. S.	XY	5	281.67 bp	29.62	251.96 bp/nonmet-PCR	28.65	Normal
268**	A. Ö.	XY	12	1085.09 bp	297.36		>200	Metillenmiş
346	K. Ş.	XY	6	278.84 bp	28.61	249.13 bp/nonmet-PCR	27.71	Normal
366	Y. Y.	XY	6	290.49 bp	32.49	260.68 bp/ nonmet-PCR	31.56	Normal
593**	Y. S.	XY	10	1070.63 bp	292.54		>200	Metillenmiş
599	F. K.	XY	3	279.09 bp	28.69	249.15 bp/nonmet-PCR	27.71	Normal
728	S. Y.	XY	12	282.36 bp	29.78	252.17 bp/nonmet-PCR	28.72	Normal
972**	E. B.	XY	14	1053.91 bp	286.97		>200	Metillenmiş
999	H. D.	XY	11	288.83 bp	31.94	257.98 bp/nonmet-PCR	30.66	Normal
1005	İ. L. T.	XY	4	318.35 bp	41.78	286.81 bp/nonmet-PCR	40.27	Normal
1316	A. Y. D.	XY	11	286.03 bp	31,01	254.83 bp/nonmet-PCR	29.61	Normal
1627	İ. E. K.	XY	15	282.56 bp	29.85	251.96 bp/nonmet-PCR	28.65	Normal
1668	D. D.	XY	7	283.19 bp	30,06	251.98 bp/nonmet-PCR	28.66	Normal
1741	M. B.	XY	11	282.76 bp	29.92	251.94 bp/nonmet-PCR	28.64	Normal
1812	F. A.	XY	9	278.97 bp	28.65	248.98 bp/nonmet-PCR	27.66	Normal
2127	H. A.	XY	9	290.37 bp	32.45	257.86 bp/nonmet-PCR	30.62	Normal
2223	A. K.	XX	15	282.51- 287.90 bp	29.83-31.63	194.33-200.22 bp/met-PCR 252.02-257.84 bp/nonmet-PCR	28.11-30.07 28.67-30.61	Normal
2478	M. A.	XY	6	249.94 bp	18.98	220.00 bp/nonmet-PCR	18.00	Normal
2485	A. N. D.	XY	4	279.55 bp	28.85	249.22 bp/nonmet-PCR	27.74	Normal
2562	A. A. B.	XY	5	288.26 bp	31.75	257.91 bp/nonmet-PCR	30.63	Normal
2886	M. A.	XY	4	261.10 bp	22,7	232.03 bp/nonmet-PCR	22,01	Normal

Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	FMR1 Sizing PCR Kiti (ABBOTT)		SNP Detective Fragile X Kiti (GML®)		
				CGG Tekrar Size (bp)	CGG Tekrar Sayısı	CGG Tekrar Size (bp) / PCR Tipi	CGG Tekrar Sayısı	Metilasyon Durumu
2903	M. C.	XX	6	282.53- 285.07 bp	29.84-30.69	194.30-197.20 bp/met-PCR 252.04-254.94 bp/nonmet-PCR	28.1-29.06 28.68-29.64	Normal
2965	M. Ö.	XY	13	279.20 bp	28.73	249.12 bp/nonmet-PCR	27.70	Normal
3008	U. D.	XY	3	262.35 bp	23,11	231.96 bp/nonmet-PCR	21.98	Normal
3010	Z. K.	XX	9	278.78-281.71 bp	28.59-29.57	191.59-194.44 bp/met-PCR 249.08-252.04 bp/nonmet-PCR	27.19-28.14 27.69-28.68	Normal
3070	M. T.	XX	8	278.45-281.39 bp	28.48-29.46	194.30 bp/met-PCR 249.05 bp/nonmet-PCR	28.1 27.68	Normal
3173	U. Ç.	XY	13	281.52 bp	29.50	252.00 bp/nonmet-PCR	28.66	Normal
3316**	K. K.	XY	5	1082.74 bp	296.58		>200	Metillenmiş
3347**	B. K.	XY	3	1050.57 bp	285.85		>200	Metillenmiş
3479	S. D.	XX	8	287.43 bp	31.47	197.37 bp/met-PCR 252.00 bp/nonmet-PCR	29.12 28.66	Normal
3514	B. B. G.	XY	13	281.89 bp	29.63	249.04 bp/nonmet-PCR	27.68	Normal
3554	A. D. A.	XY	6	284 bp	30.33	252.20 bp/nonmet-PCR	28.73	Normal
3555	K. K.	XY	9	257.11 bp	21.37	226.26 bp/nonmet-PCR	20.08	Normal
3898**	Z. N. B.	XX	5	283.14-1095 bp	30.04-300.66	194.29 bp/met-PCR 252.13 bp/nonmet-PCR	28.09 28.71 >200	Metillenmiş
4021	E. K.	XX	3	283.31-306.16 bp	30.10-37.72	194.13-217.44 bp/met-PCR 252.03-275.31 bp/nonmet-PCR	28.04-35.81 28.67-36.43	Normal
4173	H. Y.	XY	3	282.59 bp	29.86	251.91 bp/nonmet-PCR	28.63	Normal
4460	E. E.	XY	4	282.30 bp	29.76	251.99 bp/nonmet-PCR	28.66	Normal
4223	E. B.	XY	4	282.14 bp	29.71	252.07 bp/nonmet-PCR	28.69	Normal
4554	F. K.	XX	5	278.86-281.70 bp	28.62-29.56	191.47-194.26 bp/met-PCR 249.31-252.21 bp/nonmet-PCR	27.15-28.08 27.77-28.73	Normal
4851***	S. Ö.	XY	12	464.76 bp	90.58	433.94 bp/nonmet-PCR	89.31	Normal
4889	B. T. A.	XY	6	299.53 bp	35.51	269.38 bp/nonmet-PCR	34.46	Normal

Protokol No	Adı ve Soyadı	Cinsiyet	Yaş	FMR1 Sizing PCR Kiti (ABBOTT)		SNP Detective Fragile X Kiti (GML®)		
				CGG Tekrar Size (bp)	CGG Tekrar Sayısı	CGG Tekrar Size (bp) / PCR Tipi	CGG Tekrar Sayısı	Metilasyon Durumu
5083	E. K.	XY	12	282.82 bp	29.94	251.98 bp/nonmet-PCR	28.66	Normal
5134	A. A. S.	XY	10	282.67 bp	29.89	252.09 bp/nonmet-PCR	28.69	Normal
5294**	M. T. S.	XY	2	1085.76 bp	297.58		>200	Metillenmiş
5355	B. T. Ö.	XY	3	282.33 bp	29.77	251.99 bp/nonmet-PCR	28.66	Normal
5489	İ. H. O.	XY	8	282.84 bp	29.94	252.33 bp/nonmet-PCR	28.77	Normal
5532*	M. S.	XY	8	466.76-1086.99 bp	91.25-297.99	431.10 bp/nonmet-PCR	88.36 >200	Metillenmiş

*** Size Mozaisizm, ** Metillenmiş Full Mutasyon, *** Premutasyon görülmüştür.**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

FXS mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromundan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır (3). 1943 yılında Londra'daki Queen Square Hastanesinde J. Purdon Martin and Julia Bell XLMR gösteren mental retardasyon bozukluğunu (FXS) rapor etmişler ve bu bozukluğa Martin ve Bell sendromu olarak tanımlamışlardır. Rapor edilen hastanın birinde makroorşitizm ve hepsinde büyük yüz ve çene vardır. Rapor edilen ailede bulunan erkeklerden en az 9'u etkilenmiş ve anne tarafındaki dedeler (2 erkek kardeş) etkilenmemişler. Martin ve Bell etkilenmiş erkek çocukların dedelerinin etkilenmemiş olmasında bazı baskılayıcı faktörlerin olabileceği hipotezini öne sürmüştürler (31, 32). Lubs (1969), bir ailede üç jenerasyonda da etkilenmiş olan erkeklerde bir markır kromozom (X kromozomunun uzun kolu, distal bölgesinde bir daralmış-kırılabilir bölge) olduğunu belirlemiştir. Daha sonra, makroorşitizmin sitogenetik markır ile karakterize edilen XLMR'li bazı aileler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (36, 37). Bütün bunların ışığında, Martin ve Bell tarafından orijinal olarak yayınlanan pedigri yeniden değerlendirilerek, makroorşitizm ve X kromozomu üzerindeki sitogenetik markırın her ikisinin de birlikte bulunduğu gözlenmiştir (38). İlk yayınlanan bu pedigrinin tanımlanmasında, X kromozomu sitogenetik markır ile ilişkilendirilen XLMR, Martin-Beli sendromu olarak adlandırılmıştır. Bu sendrom şimdi genellikle FXS olarak tanımlanmakta ve tek sitogenetik markır ilişkisine uygun olan, frajil bölge olarak açıklanmaktadır. Rutinde FXS ile birleştirilen klasik karakteristik yüz görünümü ile tanımlanan Martin-Bell fenotipi adlandırması kullanılmaktadır (30).

Verkerk ve arkadaşları, 1991 yılında ilk kez *FMR1* genin cDNA'sını pozisyonal klonlama ile izole ettiler ve Frajil Bölge Mental Retardasyon (*FMR1*) terimini kullandılar. Eichler ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada, ekzon-ekzon PCR

restriksiyon analizi ile FMRI geninin toplam 38 kb'lik 17 ekzon'dan oluştuğunu gösterdiler (53).

Mental retardasyon, belirgin kulaklar, uzun ince bir yüz, davranış bozuklukları, pubertal dönemden itibaren makroorşitizm ile karakterize bu sendromun özelliği, olguların dişi veya erkek oluşu, erkeklerin premutasyon veya full mutasyon taşımaları ile yeni doğan, prepubertal ya da post pubertal dönemde bulunmalarına göre klinik bulgular değişkenlik gösterir (40, 41, 42) (Tablo 2.2, 2.3).

FXS'u için sitogenetik ve moleküler genetik çalışma yapılmadan önce klinik muayenede fiziki kriterlerin değerlendirildiği skorlama sistemi geliştirilmiştir. FXS'lu hastaların tanısında skorlama sistemi ilk olarak SanDiego'da Rimiand (1984) tarafından kullanılmıştır. Yıllar içinde modifiye edilip Hagerman (1987) skorlama sistemi 13 kriteri kapsamaktadır (Tablo 2. 4) (52). 2000 yılında Maes ve arkadaşları tarafından skorlama sisteminde bazı modifikasyonlar yaparak FXS için fenotipik tarama listesi oluşturdular (Tablo 2.5)(81).

FMR1 geni (OMIM 309550) 17 ekzonlu 38 kb büyüklüğünde Xq27.3 bölgesine yerleşmiş bir gendir (53, 54, 55) (Şekil 2.1) (56). CGG tekrar bölgesi, genin 1. ekzonu içinde ve CpG adasının 250 bp aşağısındadır. Bu bölge FXS'lularda anormal olarak metillenmiş olup *FMR1* geninin promotörü olarak görev yapmaktadır (1, 53). *FMR1* geni metilasyonu, doğrudan ya da dolaylı olarak gen aktivasyonunu baskılar. Doğrudan yolda, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önler, dolaylı yolda ise kromatin kondensasyonunun uyarılmasını sağlayarak transkripsiyon düzeneğinin bağlanmasını önler. FXS'nun patogenezinde, *FMR1* promoterinin hipermetilasyonunun kritik rolünü belirlemek amacıyla, erkek frajil X hastaları, lenfoblastoid hücre dizilerinde *in vitro* bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 5-azadeoksisitidin (5-azadC) kullanılarak hipermetillenmiş *FMR1* gen bölgesi demetile edilerek yeniden aktive edilmiş ve spesifik mRNA ve protein ürünü gösterilmiştir. Ayrıca promotörün demetile olup olmadığı metilasyona duyarlı enzimler ile yapılan restriksiyon analizi ile de belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, full mutasyonlu fakat metillenmemiş *FMR1* genine sahip IQ düzeyleri normal olan erkekler için de önemli bir açıklama getirmiştir (74).

FXS'unu ortaya çıkaran 3 temel mekanizma vardır. Bunlardan birincisi; *FMR1* genindeki CGG trinükleotid mutasyonları (full mutasyon), ikincisi bu *FMR1* genin promotörünün metilasyonu, üçüncüsü ise FMR1 genindeki delesyonlar veya nokta mutasyonları. FMR1 genindeki metilasyon ve CGG trinükleotid artış mutasyonları FXS'lu vakaların %98-99'nu oluştururken FMR1 genindeki delesyonlar veya nokta mutasyonlar %2-1'ni oluşturur (8,9,10,75).

Frajil X trinükleotid tekrarları ile oluşan bozuklukların içinde bilinen ilk örneğidir, diğerleri Tablo 2.7'de listelenmiştir. *FMR1* geninin 5' UTR (transle olmayan bölgesi)' deki CGG dizi tekrarlarının ve ACMG (Amerikan Koleji Tıbbi Genetik ve Genomik Birimi) standart yönergelerine göre dört alelik formu vardır. Bunlar normal alel (yaygın alel) ~5 - ~44 tekrardan, intermedit (intermediate-ara alel-grey zone) ~45 - ~54 tekrardan , premutayon ~55 - ~200 tekrardan ve full mutasyon 200-230'dan fazla tekrarlardan oluşur. (Şekil 2. 4) (76, 77).

Normal alellerde en sık görülen tekrar uzunluğu 29 ve 30 CGG tekrarlarıdır (77). Bizim çalışmamızda da en sık görülen tekrar uzunluğu 28 (%20.4) -29 (%40.8) -30 (%10.2) -31 (%10.2) CGG tekrarlı olarak bulunmuştur (Tablo 4.2, Grafik 4.1).

Ara alellerin bir sonraki nesile aktarılırken tekrar sayısında küçük artış ve azalmalar oluşabilir ancak FXS'lu bir çocuk olma riski yoktur. Ama bu boyuttaki alellere sahip bireyin uzak akrabaların ve ya gelecek nesillerin FXS ile ilişkisi olabilir. Bu aralıktaki alellerin mutasyon olabilmesi için aile çalışması ile teyt edilerek premutasyon olarak ifade edilebilir (77). 52 tekrarlı grey zone alelline sahip ve 56 tekrarlı premutasyon alellerine sahip bir jenerasyonun gelecek nesillere tekrarlarının genişlemesiyle full mutasyonlu alellere dönüştüğü bildirilmiştir (80). Risk altında olan ara alelli (intermediate-sınır-grey zone) olan kişilerin akrabaları test yaptırarak ailedeki alel stabiletesini belirleyebilir (77).

Bir premutasyon tespit edildiğinde somatik mozaizim olma ihtimali nedeniyle full mutasyon aralığına dikkat edilmesi gerekiyor. *FMR1* alelleri premutasyon boyut aralığında ise FXS ile ilişkisi yoktur ve hipermetile değildir (77). Ancak, böyle bireylerin üç farklı (veya daha fazla) klinik yansıması olduğu belirgin bir şekilde ortaya konulabilir (Şekil 2.12)(137); FXS spekturumun üzerinde hafif bilişsel ve/veya davranış

problemleri, Prematür Over Yetmezliği 1 / Frajil X'e bağlı Primer Over Yetmezliği (POF1/FXPOI) ve yeni tanımlanan, büyük yetişkin taşıyıcıların nörodejeneratif bozukluğu olan Frajil X'e bağlı tremor/ataxia sendromu (FXTAS) (137,138). Bir çok genetik danışmanlar FXS aşına olmasına rağmen, FXTAS ve FXPOI ile ilgili deneyimleri pek yoktur. Bu sebeple FMR1 mutasyonlu ailelerde risk değerlendirmesi için gerekli klinik araştırma kapsamı hafife alınmaktadır. Bu gibi ailelerde bir pedigri alarak birçok jenerasyon boyunca gelişimsel, nörodejeneratif ve üreme ile ilgili semptomların başlangıç yaşını ve şiddetine göre çeşitli konstelasyonlara danışmanın dikkat etmesi gerekir. FXTAS tanı kriterleri ve klinik bulgular tablo 2.8-2.10 belirtilmiştir. Tek bir jenerasyonda full mutasyona genişlemiş en küçük *FMR1* premutasyon aleli 56 tekrardan oluştuğu rapor edilmiştir (86). *FMR1* premutasyon taşıyan kadın tüm gebeliklerinde prenatal tanı yapılması önerilmelidir. Bilinen taşıyıcıların bütün aile üyeleri risk altında olabilir bu yüzden risk taşıyan kişilerin durumlarını belirlemek için test önerilmelidir (77).

Full mutasyon oluşan bölgeler genomik instabilite bölgeleridir ve anormal olarak yüksek düzeyde metillenmiştir bu da *FMR1* genini inaktive edebilir (90). Transkripsiyonu inaktive ettiği için mRNA ve proteinin azalmasına hatta üretilmemesine buda mental retardasyona neden olur (91). De novo somatik mutasyonlar nedeniyle mozaisizm *FMR1* CGG tekrar bölgesinde oluşmaz ancak boyut/size mozaikleri ve metilasyon mozaikleri gözlenmiştir (92, 93). Mozaiklik olduğu zaman dokuya özgü farklılık görülebilir. Boyut/size veya metilasyon mozaisizm olan bireyler full mutasyonlu tam metile olan bireylerden daha yüksek fonksiyonel olabilir (77).

Size/Boyut mozaisizm; bazı hücreler full mutasyonlu olup metillenmiş, bazı hücreler ise premutasyonlu olup metillenmemiş alt populasyonlu bireyler için kullanılır. Mozaik erkeklerde sık görülen formu temsil eder. Bazen normale yakın ya da normal uzunluktaki küçük subpopulasyonda olabilir (77). Bizim çalışmamızda da 8 yaşındaki M.S. isimli erkek çocuğumuzda 91 tekrar uzunlukta metillenmemiş premutasyonlu hücreler ve yaklaşık 297 tekrar uzunlukta full mutasyonlu ve metillenmiş CGG tekrarlı hücreler yani size mozaisizm tespit edildi.

Metilasyon Mozaisizm ise full mutasyon boyut aralığındaki bir *FMR1* alel ile metillenmemiş full mutasyon ve metillenmiş full mutasyon içeren hücreleri ihtiva eden subpopulasyonlu bireyler için kullanılır (77). Bu mutasyon tipi oldukça nadirdir.

FMR1 geninde delesyon sonucu ortaya çıkan birkaç vaka belirlenmiştir (95, 96, 97, 98, 99, 100). Genin fonksiyonel domaininde oluşan nokta mutasyonlar *FMR1* genin fonksiyon kaybına neden olmakta buda FXS fenotipi oluşumu için yeterlidir (9).

2010 yılına kadar rapor edilmiş *FMR1* geninde sadece 4 nokta mutasyonu bildirilmiştir; bunlar p.Ile304Asn olan missens mutasyon, 5. ekzon üzerinde 1 bp (baz çiftlik) c.373delA delesyon olmasıyla çerçeve kayma muatsyonuna neden olup proteinin erken sonlanmasına sebep olmuştur, 2. ekzonun ekzon/intron sınırlarında 2 bp'lık değişim g.23714GG>TA olmuştur ve p.Arg138Gln olan missens mutasyondur (9, 102, 104).

2011 yılında ki bir çalışmada klasik FXS semptomları gösteren 35 yaşında ki bir erkek bireyde CGG tekrar sayısına bakılmış, 29 tekrar çıkmış bunun üzerine annenin de CGG tekrar sayısına bakılmış 29 ve 33 tekrar çıkmış. Erkek bireyde FMRP antibadi çalışılarak FMRP proteinin eksprese olmadığını görmüşler. *FMR1* genini sekanslayarak genin 2. ekzonunda c.80C>A bir değişim olduğunu buda stop kodunu oluşturduğundan p.Ser27X istenilen protein oluşmadığını bununda bir nonses mutasyon olduğunu rapor etmişlerdir (105).

FXS'unun toplumda ki sıklığı erkeklerde yaklaşık 4000'de 1 ve kadınlarda yaklaşık 8000'de 1 olduğu bilinmektedir (3, 4, 5, 6, 7).

Sitogenetik testlere dayanarak yapılan FXS'lu bireylerin ilk tahmini sıklığı, erkeklerde 1000'de 1 - 2600'de 1 ve kadınlarda 2000'de 1 - 4000'de 1 idi (209, 210).

FXS erkeklerin tahmini yaygınlığı 1991 yılından yani *FMR1* geninin izolasyonundan bu yana kadar aşağıya yönlü revize edilmiştir. Mental retardasyonlu erkeklerde FXS tanısı teyidi için FRAXA sitogenetik tespitine dayanarak yapılan ve sendromdan etkilenen erkeklerin özgün/orjinal tahmin sayısı 100,000'de 80 olarak (Frajil X literatürlerinde hala sık sık kullanılmaktadır) bildirilmiştir. Büyük olasılıkla mental retardasyonlu bireylerde tesadüfü bir şekilde FRAXA yakınlarındaki diğer kromozomal frajil

bölgelere (FRAXD, FRAXE, FRAXF gibi) sahip olan bireylerinde ilk tahminlere dahil edilmiştir (Xq27-q28 bölgesinde yakın bulunması nedeniyle bu frajil bölgelerin sitogenetik ayırımı zordur). Daha yakın dönemdeki *FMR1* moleküler genetik test çalışmaları ile FXS'dan etkilenen erkek bireyler için tahmini sıklığı 100,000'de 16-25 olarak bildirilmiştir (Klinik bulguda mental retardasyon özelliği olan bireylerde) (211).

FXS tanısında kullanılan yöntemlere baktığımızda 1991 yılından FMR1 genin tanımlanmadan önce Lubs (1969), bir ailede üç jenerasyonda da etkilenmiş olan erkeklerde bir markır kromozom (X kromozomunun uzun kolu, distal bölgesinde bir daralmış-kırılabilir bölge) olduğunu belirlemiş. Sutherland ve arkadaşları, folat yokluğunda eksprese olan frajil bölgeyi Xq27.3-q28 bölgesinde olduğunu tespit ederek X kromozom üzerindeki kırıklığı yani markırı açıklamışlar. Ve 1991 yılına kadar FXS tanısı için sitogenetik yöntemler kullanılmıştır. Genin tanımlanmasıyla moleküler tanı yöntemler doğmaya başladı. Moleküler tanı testi olarak altın standart dediğimiz Southern Blot metodu ve PCR metotları kullanılmaya başlanmıştır.

Southern blot, spesifik restriksiyon enzimlerle genomik DNA'yı parçalayarak ve gene spesifik problarla hibridizasyon temelli bir tekniktir, tek deneyde *FMR1* mutasyonların size/boyutlarını ve metilasyon durumlarını belirleme avantajını sağlar. Ancak yoğun emek isteyen ve sonuç verilmesi bir kaç gün süren ve diğer yöntemlere göre maliyetli bir yöntemdir.

PCR tekniği basitlik ve seri şekilde hızlı olması nedeniyle genel olarak moleküler tanı için tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte *FMR1* mutasyonları GC açısından çok zengin (çoğu zaman hemen hemen saf >200 CGG tekrarları çok uzun uzandığı gösterir) oldukları için PCR ile amplifiye edilmesi çok zordur. Southern blot'ın duyarlılık ve özgüllüğü ile rekabet edebilmek ve hatta *FMR1* mutasyonların metilasyon durumunu belirlemek için kayda değer çaba ile PCR yöntemlerinin geliştirilmesinde yatırım yapılmıştır. Bu yöntemler PCR deneylerinde önemli çabalara neden olmuştur ve tanı kitleri oluşmuştur (136). FXMR için geçerli moleküler tanı yöntemlerin yarattığı kısıtlamalar ve zorluklar basitleştirilmesi veya FXMR durumlarda (inaktive edilmiş *FMR1* geni eksikliği FMRP) veya etkilenmemiş taşıyıcı (premutasyon) ya tanımlanmasını otomatikleştirme amacıyla, birçok alternatif yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır ve yeni tanı testleri ortaya çıkmıştır; İmmünohistokimya ile

FMRP varlığına yada yokluğu tayin edilebiliyor, PCR yöntemleri optimize edilerek TR-PCR ve MS-PCR yöntemler geliştirilmiştir, metilasyonlu alelli erkekleri tanımlamak için multileks ligasyon prob amplikasyon yöntemi, real-time PCR yöntemi gibi bir çok yöntemler geliştirilmiştir (77,136). Şuan için FXS tanısında bizimde kullandığımız PCR metotlarından TR-PCR ve MS-PCR yöntemler bir çok laboratuvarlar arasında kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemleri kullanırken mutlaka FXS şüphesi ile gelen her hastadan kromozom analiz testide istenilmesi gerekir.

Full mutasyona sahip erkeklerin genel populasyonda görülme sıklığı ~ 4000'de 1 olarak tahmin edilmektedir. Kadınlarda görülme sıklığı ise erkek bireylerde görülme sıklığının yarısı yada ~8000-5000'de 1 olarak tahmin edilmektedir (77, 212).

Türkiye'deki full mutasyon sıklığı bilgileri 2000 yılında Core ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada öğrenme güçlüğü olan kadınlar da 25'de 1 erkeklerde ise 95'de 5 olarak (218), 1999 ve 2000 yılında Tunçbilek ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise nedeni bilinmeyen öğrenme güçlüğü olan kadınlarda 13'de 0 erkeklerde ise 166'da 5 (219) ve 300'de 5 (220) olarak bulunmuştur (217).

Bizim çalışmamızda ise toplam 40 erkek çocuğun %15'ında full mutasyon, %2.5'inde premutasyon, ve 1 erkek çocukta ise size mozaisizm bulunmuştur. Toplam 9 kız çocuğunun %11.11'inde full mutasyon görülmüştür (Tablo 4.1). Alel bazlı tekrar sayılarını incelediğimizde en küçük tekrar uzunluğuna sahip alel 18 CGG tekrarlı, en büyük uzunluğuna sahip alel yaklaşık 300 CGG tekrarlı ve normal aralıkta en sık görülen tekrar uzunluğu 28 (%20.4) -29 (%40.8) -30 (%10.2) -31 (%10.2) CGG tekrarlı olarak bulunmuştur (Tablo 4.2, Grafik 4.1).

2013 yılında ACMG (Amerikan Koleji Tıbbi Genetik ve Genomik Birimi) tarafından yayınlanan standart yönergelerinde Frajil X testleri için mutasyon kategorilerinde, kısa tekrar dizilerinin isimlendirmesi konusunda ve bir çok konuda yeni düzenlemeler, standartlar ve önerilen sunmuştur (77).

FXS'dan sorumlu olan gen, X kromozomu üzerinde yer aldığı halde bu sendromun kalıtımı klasik X' e bağlı kalıtım modeline uymamakta ve çok özgün karakterler göstermektedir (236). Sherman ve arkadaşları tarafından (1985) frajil X ailelerinde

yapılan pedigri incelemelerinde, hastalığın görülme olasılıkları arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Klinik olarak etkilenmiş ve sitogenetik olarak gösterilmiş erkek olguların annelerinin babaları fenotipi ve sitogenetik olarak normaldi. Normal taşıyıcı erkek (NTM) olarak isimlendirilen bu erkeklerin erkek çocukları normal iken, kızların erkek çocuklarının %79'unda, erkek kardeşlerinde ise %18 oranında hastalık riski olduğu bildirildi ve bu durum Opitz (l986) tarafından "Sherman paradoksu" olarak tanımlanmıştır. Sherman ve arkadaşlarının (1988) yaptıkları diğer bir inceleme sonuçlanna göre, frajil X taşıyıcısı annelerin fenotipine bağlı olarak da mental retardasyon risklerinin değiştiği, mental retardasyonlu bir taşıyıcının oğlunun mental retardasyonlu olma olasılığının %50 buna karşın kız çocuklarının hastalık riskinin %28 olduğu, normal taşıyıcı kadınların erkek çocuklarının hasta olma olasılığının %38 olduğu, kız çocukları için riskin %16 olduğu bildirildi.

X kromozomunun biri üzerinde *FMR1* premutasyonuna sahip bir kadının gelecek nesillere mutasyonu geçirme riski % 50 dir. Premutasyon stabil değildir ve anneden çocuğa geçerken, premutasyon olarak kalır veya full mutasyona genişleyebilir.

FXS aile üyelerinin içinde premutasyon (PM) riski PM mekanizması ve nesilden nesile full mutasyon (FM) geçişlerine göre tahmin edilebilir. Pembry ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Şekil 2.17 de FXS hastaların kadın yakınları arasında taşıyıcı olma tahminleri verilmiştir (217). Nolin ve arkadaşları tarafından iki farklı çalışmada premutasyon alelli annelerin gebelikleri sonucunda oluşan çocuklarında full mutasyona genişleme risk analizleri yapmışlardır (Tablo 2.16, Tablo 2.17) (84).

Anneden gelen premutasyon full mutasyona genişleme riski CGG tekrar uzunluğuna ve bu CGG üçlü tekrarlar arasındaki AGG dizisinin varlığına yada yokluğuna bağlıdır.

AGG triplet kaybının replikasyon sırasındaki kayma sonucu oluşan delesyondan dolayı meydana geldiği ve bu kaybın DNA sentezi sırasında geciken (lagging) zincirde meydana geldiği öne sürülmektedir (114). *FMR1* geni CGG tekrar bölgesi içinde dağılmış olan AGG'ler diziyi sağlamlaştırarak replikasyon sırasında kaymayı önler (115). Genişlemelerin moleküler mekanizması için bir çok model öne sürülmüştür; Genişleyebilir tekrarlayan bölgelerde olağandışı DNA yapısının oluşması, DNA

replikasyon modelleri, DNA tamir modelleri, DNA rekombinasyon modelleri, DNA zincir kayma modeli (Şekil 2.6-2.10) (117).

Murray ve arkadaşları tarafından HTA raporundaki verileri kullanarak, regresyon analizi sonucu bir risk modeli yapmışlardır (217). Oluşturulan bu model yeniden revize edilip FXS'lı ailelerde ve genel popülasyondaki premutasyondan full mutasyona genişleme riskleri için modeller oluşturulmuştur (217).

Genetik danışmanlar *FMR1* gen mutasyonları için önemli ölçüde riskli olan bireyler için test öncesi bilgi sağlamada önemli bir rol oynamaktadır. Premutasyonlu çocuk sahibi olmak isteyen anneler için risk analizlerinin yapılmasında gerekirse PGD yöntemi hakkında bilgi vermeleri gibi bir çok hususta danışmanlık vermelidir.

Şimdilik tam tedavileri olmamasına rağmen FXS kişiler ne kadar erken tanı alırlarsa o kadar semptomatik olarak yardımcı olan ilaçlar ile tedavisi, konuşma tedavisi, özel eğitim, uğraşı tedavisi ve spor çalışmaları gibi uygulamalardan yararlanma şansı artar ve sendromun hafifletilmesi hızlanır. Bazı ülkelerde özellikle Amerika'nın bazı eyaletlerinde FMR1 testi yenidoğan tarama testi olarak çalışılmaktadır. Bizim ülkemizde de yenidoğan tarama testleri içinde dahil olması gerekir.

Genetik danışmanlar ve FXS'lu aileler için FXS hakkında güncel bilgi ve yardım sağlayan uluslararası vakıf ve özel araştırma merkezleri vardır (140). Bunlar; Ulusal Frajil X Vakfı, FRAXA Araştırma Vakfı ve Frajil X Klinik ve Araştırma Konsorsiyumu.

Sonuç olarak; *FMR1* gen mutasyonları için genetik danışmanların detaylı şekilde bilgilendirilmesi ve genetik danışmanların bu bilgiler ışığında danışmanlık vermesi gerekir. Genetik danışmanların laboratuar çalışanları ile direk temasa geçip hastalar hakkında bilgi alış verişi yaparak hastalara daha iyi danışmanlık yapabilirler.

Premutasyonlu çocuk sahibi olmak isteyen anneler için daha iyi genetik danışmanlık ve risk analizi yapabilmek için *FMR1* geni dizi analizi yaparak AGG tekrarları ve CGG tekrarları ışığında risk değerlendirilmesi gerekir.

TR-PCR çalışılan hastalarda;

Hasta erkek ise

premutasyon aralığında tekrar tespit edildiğinde eğer hastada otizim veya mental retardasyon var ise,

full mutasyon yani >200 tekrar uzunlukta bir alele sahip ise metil spesifik PCR çalışılması gerekir.

Hasta kadın ise

iki alelden biri normal diğeri büyük premutasyona sahip ise,

biri normal diğeri >200 tekrar uzunlukta bir alele sahip ise,

tek normal alele sahip ve mental retardasyon yok erken ovaryum yetmezliği var ise metil spesifik PCR çalışılması gerekir.

FXS'lu hastaların %100'nu tespit edebilmek için FMR1 geninin CGG tekrarlarına, metilasyonuna ve dizi analizlerine bakılması gerekir. Ayrıca FXS şüphesiyle gelen bütün hastalara kromozom analizi yapılması gerekir.

6. KAYNAKLAR

1. Fu Y, Kuhl D, Pızzutı A, et al. Variation of the CGG repeat at the Fragile X site results in gene instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991; 67: 1047–1058
2. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, 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 1991; 65: 905-914
3. Crawford D, Acuna J, Sherman S. FMR1 and the Fragile X syndrome: human genome epidemiology review. Genet Med. 2001; 3: 359–71
4. Coffee B, Keıth K, Albızua I, et al. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. Am J Hum Genet 2009; 85: 503–514
5. Garber K, Smıth K, Reınes D, et al. Transcription, translation and Fragile X Syndrome. Curr Opin Genet Dev 2006; 16: 270–275
6. Turner G, Webb T, Wake S, et al. Prevalence of fragile X syndrome. Am J Med Genet 1996; 64:196–7
7. Murray A, Youıngs S, Dennıs 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
8. Collıns Sc, Bray Sm, Suhl Ja, et al. Identification of novel FMR1 variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. Am J Med Genet A 2010; 152A: 2512–2520
9. De Boulle K, Verkerk A, Reynıers E, et al. A Point Mutation in the FMR-1 gene associated with Fragile X mental retardation. Nat Genet 1993; 3: 31–35

10. Tarleton J, Taylor A, Crandall K, et al. A single base alteration in the CGG repeat region of FMR1: Possible effects on gene expression and phenotype. J Med Genet 2002; 39: 196–200

11. Hagerman RJ, Silverman AC. Fragile X syndrome; Diagnosis, Treatment and Research. Baltimore: Johns Hopkins University Press 1991

12. Fryns JP. The fragile X syndrome: a study of 83 families. Clin Genet 1984; 26: 497-528

13. Richards R, Holman K, Kozman H, et al. Fragile Xsyndrome: genetic lokalization by linkage mapping of two microsattellite repears FRAXAC 1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. J Med Genet 1991; 28: 818-23.

14. Bassell Gj, Warren St. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. Neuron 2008; 60: 201–14

15. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science 1977; 197: 265-266

16. Kronquıst Ke, Sherman Sl, Spector Eb. Clinical significance of tri-nucleotide repeats in Fragile X testing: a clarification of American College of Medical Genetics guidelines. Genet Med 2008; 10: 845–7

17. Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, et al. High functioning fragile X males: demonnstration of an unmethylated fully expanden FMR-I mutation associated with protein expression. Am J Med Genet 1994; 51: 298-308

18. Biancalana V, Taine L, Bouix JC, et al. Expansion and methylation status at FRAXE can be detected on Eco Rl transfers used for FRAXA diagnosis: Analizis of four FRAXE families with mild mental retardation in males. Am J Hum Genet 1996; 59: 847-854

19. Tarleton JC, Soul RA. Molecular genetic advences in fragile X syndrome. JPediatrics 1993; 3: 122-185

20. 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

21. Halley D, Van Den Ouweland A, Deelen W, et al. Strategy for reliable prenatal detection of normal mal e carriers of the fragile X syndrome. Am J Med Genet 1994; 51: 471-473

22. Von Koskull H, Gahmberg 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

23. Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradyoactive PCR test. J Am Med Assoc 1993; 270: 1569-1575

24. Rousseau F. The fragile X syndrome: implications of molecular geneticsfor the clinical syndrome. Eur J Clinical-Inves 1994; 24 1-10

25. Hagerman R. Fragile X. Treatment of Hyperactivity. Pediatric 1997; 99:5: 753.

26. Uzm. Dr. Burak Doğangün. Özel Eğitim Gerektiren Psikiyatrik Durumlar, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi No:62, s 157-174, Mart 2008

27. Dıagnostıc And Statıstıcal Manual Of Mental Dısorders, Fourth Edıtıon, DSM-IV, 2005: p 46

28. D' Adamo P, Menegon A, Nigro C.L, et al. Mutation in GD/1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. Nat Genet 1998; 19: 134-139

29. Brooks SS, Wisniewski K, Brown T. New X-linked mental retardation (XLMR) syndrome with distinct facial appearance and growth retardation. Am J Med Genet 1994; 51: 586-590

30. Sherman S. Epidemiyology: in Fragile X Syndrome - Diagnosis, Treatment and Research. Hagennan RJ, Cronister A, 2 nd ed. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1996: p 165-192

31. Opitz JM, Westphal JM, Daniel A. Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. Am J Med Genet 1984; 17: 101-109

32. Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. J Neurol Psychiat 1943; 6: 154-157

33. Escalanh JA, Grunspun H, Frote-Pessoa O. Severe sex-linked mental retardation. J Genet Hum 1971; 19: 137-140

34. Tumer G, Eastman C, Casey J, et al. Xlinked mental retardation associated with macro-orchidism. J Med Genet 1975; 12: 367-371

35. Cantu JM, Scaglia HE, Medina M, et al. Inherited congenital normofunctional testicular hyperplasia and mental deficiency. Hum Genet 1976; 33: 23-33

36. Ruvalcaba RHA, Myhre SA, Roosen-Runge EC, et al. X-linked mental deficiency megalotestes syndrome. J Am Med Assoc 1977; 238: 1646-1650

37. Tumer G, Till R, Daniel A. Marker X chromosomes, mental retardation and macro-orchidism. N Engl J Med 1978; 299: 1472

38. Richards BW, Webb T. The Martin-Bell-Renpenning syndrome. J Med Genet 1982; 19: 79

39. Filippi G, Arslanian A, Dagna-Bricaelli F, et al. Premutation for the Martin-Beli syndrome analyzed in alarge pedigree segregating also for G6PDdeficiency. I.A working hypothesis on the nature of the FRAXmutations. Am J Med Genet 1991; 40: 387-394

40. Fryns JP, Van Den Berghe H. Transmission of fragil (X)(q27) from normal male(s). Hum Genet 1982; 61: 262-263

41. Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X checklist Am J Med Genet 1991; 38: 283-287

42. Buttler MG, Miller LK, Hagerman RJ. Standarts for selected anthropometric measurements in males with the fragile X syndrome. 1992; 89: 1059-1062

43. Butler MG, Pratesi R, Watson MS, et al. Antropometric and craniofacial patterns in mentally retarded males with emphasis on the fragil X syndrome. Clin Genet 1993; 44: 129-138

44. Staley L, Hull C, Mazzocco MM, et al. Molecular elinical correlations in fragile X children and adults. Am J Dis Child 1993; 147: 723-726

45. Buttler MG, Mangrum T, Gupta R, et al. A 15-item checklist for screening mentally retarded for the fragile X syndrome. Clin Genet 1991; 39: 347-354

46. Reiss AL, Abrams MT, Greenlaw R, et al. Neurodevelopmetal effects of the FMR-1 full mutation in humuns. Nat. Medi. 1995; 1: 159-167

47. Grant R, Sutherland GR, Mulley JC. Fragile X syndrome and other causes of X linked mental handicap. Principles and Practice of Medical Genetics 1997; 1745-1761

48. Abrams MT, Reiss AL, Freund LS, et al. Molecular-Neurobehavioral associations in females with in females with the fragile X full mutation. Am J Med Genet 1994; 51: 317-327

49. Lachiewicz AM, Dawson DV. Behavior problems of young girls with: fragile X syndrome: factor scores on the Conners' parent's questionnaire. Am J Med Genel 1994; 51: 364-369

50. Dykens EM, Hodapp RM, Leckman JF. Behavior and Development in Fragile X Syndrome, Volume 28, SAGE Publications, London, 1994

51. Chronister A, Schreiner R, Wittenberg M, et al. Heterozygous: fragile-X female: Historical, physical, cognitive, and cytogenetic features. Am J Med Genet 1991; 38: 269

52. Hagerman RJ. Fragile X syndrome. Curr Probl Pediatr 1987; 627-674

53. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, et al. Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet 1993; 2: 1147-1153

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

55. Oostra BA, Willems PJ. A fragile gene. BioEssays 1995; 17:11: 941-947

56. Debra JM, Carl K, Gale B, et al. Sequence Variation Within the Fragile X Locus. Genome Res 2001; 11: 8: 1382–1391

57. 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

58. Vertino PM, Yen RWC, Gao J, et al. De Novo, Methylation of CpG Isiand sequence in human fibroblasts overexpressing DNA (Cytosine-5)

methyltransferase. Mol Cell Biol 1996; 4555-4565

59. Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, et al. Role of Iate replication timing in the silencing of X-linked genes. Hum Mol Genet 1996; 5: 9: 1345-1353

60. Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? TIG 1997; 13: 11: 444-449

61. Ashley C, Wilkinson KD, Reines D, et al. FMR1 protein: Conserved RNP family domains and selective RNA binding. Science 1993; 262: 563-565

62. Karen TS, Bradford C, Daniel R. Occupancy and synergistic activation of the FMR1 promoter by Nrf-1 and Sp1 in vivo. Hum Mol Genet 2004; 13: 15: 1611-1621

63. Li XQ, Guo YY, De W, et al. DNA Methylation and Micrornas in Cancer. World J Gastroenterol. 2012; 18: 9: 882-888

64. Eroğlu P, Non-Hodgkin Lenfomalı Olgularda P15ınk4b Promotör Bölgesindeki DNA Metilasyonunun Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin 2007: 108

65. Özdemir F., Kolerektal Kanserli Hastalarda SFRP1 Geninin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2009: 82

66. Pehlivan M., Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında SFRP1 Geninin Promotör Bölgesinin Epigenetik ve Genetik Değişikliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İzmir 2008: 135

67. Güneş S, Kulaç T. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü. Turkish Journal of Urology. 2013; 39: 3: 181-7

68. Öztürk Ş. Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde ASC Ve MEFV Genlerinin Metilasyonunun Rolü, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2008: 77

69. Dalton SR, Bellacosa A. DNA Demethylation By TDG. Epigenomics 2012; 4: 4: 459-67.

70. D'Addario C, Di Francesco A, Pucci M, et al. Epigenetic Mechanisms and Endocannabinoid Signalling. FEBS J 2013; 280: 9: 1905-17.

71. Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. et al. Epigenomics of Ovarian Cancer and its Chemoprevention. Front Genet 2011; 2: 67

72. Jiang Y, Liu S, Chen X, et al. Genome-Wide Distribution of DNA Methylation and DNA Demethylation and Related Chromatin Regulators in Cancer. Biochim Biophys Acta 2013; 1835: 2: 155-63

73. Abithol M, Menini C, Delezoide A.L, et al. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of *FMR1* expression in the human fetal brain. Nat Genet, 1993; 4: 147-153

74. Chiurazzi P, Grazia Pomponi M, Wıllemsen R, et al. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. Hum Mol Genet 1998; 7: 1: 109-113

75. 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 Genel 1998; 7: 12: 1935-1946

76. Kathryn BG, Jeannie V, Stephen TW. Fragile X syndrome, Eur Jour Hum Genet 2008; 16: 666–672

77. Kristin GM, Elaine L, Elaine BS. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics, Genet Med 2013; 15: 7: 575-586

78. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, et al. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of premature ovarian failure. Hum Reprod 2010; 25: 5: 1335–1338

79. Spath MA, Feuth TB, Smits AP, et al. Predictors and risk model development for menopausal age in fragile X premutation carriers. Genet Med 2011; 13: 643–650

80. Fernandez-Carvajal I, Lopez PB, Pan R, et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. J Mol Diagn 2009; 11: 306–

310

81. Maes B, Fryns JP, Ghesquiere P, et al. Phenotypic checklist to screen for fragile X syndrome in people with mental retardation. Ment Retard 2000; 38: 207– 215

82. McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A, et al. Genetic counseling for fragile x syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. J Genet Couns 2005; 14: 249– 270

83. Hunter JE, Abramowitz A, Rusin M, et al. Is there evidence for neuropsychological and neurobehavioral phenotypes among adults without FXTAS who carry the FMR1 premutation? A review of current literature. Genet Med 2009; 11: 79–89

84. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. Am J Hum Genet 2003; 72: 454–464

85. Kallinen J, Heinonen S, Mannermaa A, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome and the risk of expansion of a premutation. Clin Genet 2000; 58: 111–115

86. Fernandez-Carvajal I, Lopez PB, Pan R, et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. J Mol Diagn 2009; 11: 306–310.

87. Pieretti M, Zhang F, Fu YH, et al. Absence ofexpression of the *FMR-1* gene in fragile X syndrome. Cell, 1991; 66: 817-822

88. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, et al. DNA methylation represses. FMR-1 transcription in fragile X syndrome. Hum Mol Genet 1992; 1: 397-400

89. MacConkie-Rosel A, Lachiewicz AM, Spiridigliozzi GA, et al. Evidence that methylation of FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. Am J Hum Genet 1993; 53: 800-809

90. Sutherland GR, Baker E, Richards RJ. Fragile sites still breaking. TIG 1998; 14: 12: 501-505

91. Ashley CT, Warren ST. Trinucleotid repeat expansion and human disease.

Annu Rev Genet 1995; 29: 703-728

92. Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, et al. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. Am J Med Genet 1994; 51: 298–308

93. Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, et al. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. Hum Mol Genet 1995; 4: 2103–2108

94. Antinolo G, Borrego S, Cabeza JC, et al. Reverse mutation in fragile X syndrome. Am J Hum Genet 1996; 58: 237-239

95. Wöhrle D, Kotzot D, Hirst MC, et al. A microdeletion of less than 250kb, including the proximal part of the FMR-ı gene and the Fragile-X site, ina male withc the elinical phenotype of fragile-X syndrome. Am J Hum Genet 1992; 51: 299-306

96. Gu Y, Lugenbeel KA, Vockley JG, et al. De novo deletion in *FMR1* İn patient with devetopmental detay. Hum Mol Genet 1994; 3: 9: 1705-1706.

97. Gedeon AK, Baker E, Robinson M, et al. Fragile X syndrome without CGG amplification has an FMR-I deletion. Nat Genet 1992; 1: 341-344

98. Tarleton JC, Saul RA. Malecular genetic advances in fragile X syndrome. J Ped 1993; 122: 2: 169-185

99. Albright SG, Lachiewicz AM, Tarleton JC, et al. Fragile X phenotype in patient with a large de novo deletion in Xq27-q28. Am J Med Genet 1994; 51: 294-297

100. Wolff DJ, Gustashaw KM, Zurcher V, et al. Deletions in Xq26.3;q27:3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattem. Hum Genet 1997; 100: 256-262

101. Siomi H, Choi M, Siomi MC, et al. Essential role for KH domainsin RNA binding; impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. Cell 1994; 77: 33-39

102. Lugenbeel KA, Peier AM, Carson NL, et al. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMRl in fragile X syndrome. Nat

Genet 1995; 10: 483-485

103. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, et al. Germline mosaicism at the fragile X locus. Am J Med Genet 1995; 55: 384-386

104. Collins SC, Bray SM, Suhl JA et al. Identification of novel FMR1 variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. Am J Med Genet A 2010; 10: 2512–2520.

105. Karen G, Karen BN, Alma D. et al. A nonsense mutation in FMR1 causing fragile X syndrome. Eur. Jour. Hum. Genet. 2011; 19: 489–491

106. Richards RI, Sutherland GR. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. Cell 1992; 70: 709-712

107. Willems PJ. Dynamic mutations hit double figures. Nat Genet 1994; 8: 213-215

108. MacMurray C. Mechanisms of DNA expansion. Chromosoma 1995; 104: 2-13

109. Singer RH. Triplet repeats and human disease. Mol Med 1996; 65-69

110. Chen X, Santhana MSV, Catasti P, et al. Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: Structure and biological implications. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 5199-5203

111. Jennifer RG, Huda YZ. Dıseases Of Unstable Repeat Expansıon: Mechanısms And Common Prıncıples. Nat Rev Genet 2005; 6: 742-755

112. Snow K, Tester DJ, Kruckeberg K, et al. Sequence analysis of the fragile X trinucleotide fepeat: implications for the origin of the fragile X mutation. Hum Mol Genet 1994; 3: 9: 1543-1551

113. Eichler EE, Macpherson JN, Murray A, et al. Haplotype and interspersion analysis of the *FMR1* CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. Hum Mol Genet 1996; 5: 3: 319-330

114. Hirst MC, Grewal PK, Davies KE. Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. Hum Mol Genel 1994; 3: 9: 1553-1560

115. Zhong N, Yang W, Dobkin C, et al. Fragile X gene instability: anehoring AGGs ana linked microsatellites. Am J Hum Genet 1995; 57: 351-361

116. Eichler EE, Holden JJA, Popovich BW, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. Nat Genet 1994; 8: 88-94

117. Sergei MM. Expandable DNA repeats and human disease. Nat Ins Rev 2007; 447: 932-940

118. Zhong N, Dobkin C, Ted Brown W. A complex mutable polymorphism located within the fragile X gene. Nat Genet 1993; 5: 248-253

119. Chiurazzi P, Kozak L, Neri G. Unstable triplet and their mutational mechanism: Size reduction of the CGG repeat Vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome. Am J Med Genet 1994; 51: 517-521

120. Eichler EE, Kunst CB, Lugenbeel KA, et al. Evolution of the cryptic *FMR1* CGG repeat. Nat Genet 1995; 11: 301-308

121. Hansen RS, Canfield TK, Lamb MM, et al. Association of fragile X syndrome with delayed replication of the *FMR1* gene. Cell 1993; 73: 1403-1409

122. Migeon BR. Role of DNA methylation in X inactivation and the fragile X syndrome. Am J Med Genel 1993; 47: 685-685

123. Wöhrle D, Hirst MC, Kennerknecht I, et al. Genotype mosaicisim in fragile X tissues. Hum Genet 1992; 89: 114-116

124. Nelson DL, Warren ST. Trinucleotide repeat instability: when and where? Nat Genet 1993; 4: 107-108

125. Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, et al. The fragile X premutation in carrier and its effect on mutation size in offspring. Am J Hum Genet 1995; 56: 1147-1155

126. Tamanini F, Willemsen R, Van Unen L, et al. Differential expressian of FMR1, FXRI and FXR2 proteinsin human brain and testis. Hum Mol Genet 1997; 6: 8: 1315-1322

127. Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, et al. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widwly distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. Hum Mol Genet 1995; 4: 5: 783-789

128. Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, et al. The fragile X mental retardation

protein is associated with ribosomes. Nat Genet 1996; 12: 91-93

129. 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: 8: 1083-1091

130. Feng Y, Gutekunst C-A, Eberhart DE, et al. Fragile X mental retardation protein: Nucleoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. J Neurosci 1997; 17: 5: 1539-1547

131. Chorbin F, Bouillon M, Fortin A, et al. The: fragile X mental retardation protein is associated with poly(At m.RNA in actively transtating polyribosomes. Hum Mol Genet 1997; 6: 9: 1465-1472

132. Verheij C, De Graaff E, Bakker CE, et al. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. Hum Mol Genet 1995; 4: 5: 895-901

133. Tamanini F, Meijer N, Verheij C, et al. FMRP is associated to the ribosomes via RNA. Hum Mol Genet 1996; 5: 6: 809-813

134. Siomi M, Zhang Y, Siomi H, et al. Specific, Sequences in the fragile X syndrome, protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. Mol Cell Bio 1996; 3825-3832

135. Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has chacteristics of an RNA-binding protein. Cell 1993; 74: 291-298

136. François R, Yves L, Johanne B, et al. The Fragile X Mental Retardation Syndrome 20 Years After the *FMR1* Gene Discovery: an Expanding Universe of Knowledge. Clin Bio Rev 2011; 32: 135-162

137. Randi H, Jacky A, Paul H. *FMR1* premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. J Neuro Disord 2011; 3: 211–224

138. Paul JH, Randi JH. The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. Am J Hum Genet 2004; 74: 805–816

139. Deborah AH, Joan AO'K. Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome: The Expanding Clinical Picture, Pathophysiology, Epidemiology, and Update

on Treatment Tremor and Other Hyperkinetic Movements The Expanding Clinical Picture of FXTAS. 2012; 1-11

140. Brenda F, Liane A , Amy C et al. Genetic Counseling and Testing for FMR1 Gene Mutations: Practice Guidelines of the National Society of Genetic Counselors, J Genet Counsel, Springer, 2012

141. Ben AO, Rob W. FMR1: a gene with three faces, Biochim Biophys Acta 2009 1790: 6: 467–477

142. Randi H, Paul H. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, Lan Neu 2013; 12: 8: 786–798

143. Michael D. Wittenberger, MD., Randi JH, et al. The FMR1 premutation and reproduction. American Society for Reproductive, Fertility and Sterility Med Els 2007; 87: 3: 456-465

144. Schuettler J, Peng Z., Zimmer J, et al. Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of $(CGG)_n$ triplets in exon 1. Genet Hum Repro 2011; 26: 5: 1241–1251

145. Durkın SG, Glover T. Chromosome fragile sites. An Rev Genet 2007; 41: 69-192

146. Debacker K, Kooy Fr. Fragile sites and human disease. Hum Mol Genet 2007; 16: 2R: 150-158

147. Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. Bio et Biophy Acta 2007; 1779: 1: 3-16

148. Winnepenninckx B, Debacker K, Ramsay J, et al. CGG-repeat expansion in the DIP2B gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1. Am J Hum Genet 2007; 80: 2: 221-31

149. Hansen RS, Canfield TK, Lamb MM, et al. Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. Cell 1993; 73: 1403-1409

150. Wang YH. Chromatin structure of human chromosomal fragile sites. Canc Let 2006; 232: 70-78

151. Wen GY, Jenkıns EC, Goldberg EM, et al. Ultrastructure of the fragile X chromosome: new observations on the fragile site. Am J Med Genet 1999; 83: 331-333

152. Schwartz M, Zlotorynskı E, Kerem B. The molecular basis of common and fragile sites. Cancer Letters 2006; 232: 13-26

153. Sutherland GR, Baker E. The clinical significance of fragile sites on human chromosomes. Clinc Genet 2000; 58: 157-161

154. Jahnson VP, Carpenter NJ, Skorey PA. Martın-Beli syndrome segregating in a large kindred with normal transmitting males: clinical, cytogenetic and linkage study. Am J Med Genetic 1991; 38: 275-282

155. Nielson KB, Tommerup N, Poulsen H. Carrier detection and X inactivation studies in the fragile X syndrome. Hum Genet 1983; 64: 240-245

156. Glover TW. FudR Induction of the X chromosomes fragile site. Evidence for the mechanism of folic acit and thymidine inhibition. Am J Hum Genet 1981; 33: 234-242

157. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, et al. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of CpG island in FRAXE mental retardation. Cell 1993; 74: 127-134

158. Holland J, Oostra BA, Bobrow M, et al. Trinucleotide repeat ainplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. Cell, 1993; 74: 127-134

159. Moncton DG, Caskey T. Unstable triplet repeat diseases. Circu 1995; 91: 513-520

160. Mull JC, Yu S, Loesch DZ, et al. FRAXE and mental retardation. J Med Genet 1995; 32: 162-169

161. Müller U, Graeber MB, Haberhausen G, et al. Molecular basis and diagnosis of neurogenetic disorders. J Neuro Scien 1994; 124; 119-140

162. Allingham-Hawkins DJ, Ray PT. FRAXE expansion is not a common etiological factor among developmentally delayed males. Am J Med Genet 1995; 56: 72-76

163. Mila M, Sanchez A, Badenas C, et al. Estivill X. Screning for FMR1 and FMR2 mutations in 222 individuals from Spanish special schools: identification of a case of FRAXE- associated mental retardation. Hum Genet 1997; 100: 503-507

164. Chakrabarti L, Knight SJ, Flannery AV, et al. A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. Hum Mol Genet 1997; 5: 29: 275-282

165. Chakrabarti L, Bristulf J, Foss GS, et al. Exspression of the murine homologue of *FMR2* in mouse brain and during development. Hum Mol Genet 1998; 7: 3: 441-448

166. Brown WT. The FRAXE syndrome: is it time for routine screening? Am J Hum Genet 1996; 58: 903

167. Holinski-Feder E, Chahrok:hzadeh S, Baldwin JK, et al. FRAXE testing. Am J Hum Genet 1996; 59; 1168-1169

168. Gecz J, Oostra BA, Hockey A, et al. FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. Hum Mol Genet 1997; 6: 3: 435-441

169. Hamel BCJ, Smits APT, De Graaf E, et al. Segregation of FRAXE in large family: clinical, psychometric, cytogenetic, and molecular data. Am J Hum Genet 1994; 55: 923-931

170. Knight SJL, Ritchie RJ, Chakrabarti L, et al. A study of FRAXE in mentally retarded individuals referred for:fragile X syndrome (FRAXA) testing in the United Kingdom. Am J Hum Genet 1996; 58: 906-913

171. Hirst MC, Barnicoat A, Flynn G, et al. The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. Hum Mol Genet 1993; 2: 2: 197-200

172. Ritchie RJ, Knight SJL, Hirst MC, et al. The cloning of FRAXF: trinucleotide repeat expansion and methylation ata third fragile site in distal Xqter. Hum Mol Genet 1994; 3: 2: 2115-2121.

173. Wang Q, Gren E, Barnicoat A, et al. Cytogenetic versus DNA diagnosis in routine referrals for fragile X syndrome. Lancet 1993; 342: 1025-1026

174. Tranabjaerg L, Lubs HA, Borghgraef M, et al. Sevenılı International Workshop on the Fragile X and X- Linked Mental Retardation. Am J Med Genet 1996; 64: 1- 14.

175. Turner G, Webb T, Wake S, et al. Prevalance of fragile X syndrome. Am J Med Genet 1996; 64: 196-197

176. 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 ımprove the cost-effectiveness of fragile X screening studies. Hum Hered 1998; 48: 256-265

177. Oostra BA, Jacky PB, Ted Brown W, et al. Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. J Med Genet 1993; 3: 410-413

178. Brown WT. Molecular analysis of fragile X syndrome. Current Protocols in Human Genetics. New York, Wiley, 1994: pp 9.5.1-9.5.14

179. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, et al. On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. Am J Med Genet 1992; 43:197-207

180. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. N Engl J Med 1991; 325: 1673-81

181. Strom CM, Crossley B, Redman JB, et al. Molecular testing for Fragile X Syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. Genet Med 2007; 9: 46-51

182. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, et al. Genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. Am J Hum Genet 1994; 55: 225-37

183. Nolin SL, Glicksman A, Houck GE J, et al. Mosaicism in fragile X affected males. Am J Med Genet 1994; 51: 509-512

184. Devys D, Biancalana V, Rousseau F, et al. 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 1992; 43: 208-216

185. Nolin SL, Ding XH, Houck GE, et al. Fragile X full mutation alleles composed of few alleles: implications for CGG repeat expansion. Am J Med Genet 2008; 146A: 60-5.

186. Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, et al. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR-1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. Hum Mol Genet 1994; 3: 927-930

187. Cohen IL, Nolin SL, Sudhalter V, et al. Mosaicism for the FMR1 gene influences adaptive skills development in fragile X-affected males. Am J Med Genet 1996; 64: 365-369.

188. Wöhrle D, Salat U, Gläser D, et al. Unusual mutations in high functioning fragile X males: apparent instability of expanded unmethylated CGG repeats. J Med Genet 1998; 35: 103-111

189. de Vries BB, Severijnen LA, Jacobs A, et al. FMRP expression studies in blood and hair roots in a fragile X family with methylation mosaics. J Med Genet 2003; 40: 535-539.

190. Luo XF, Zhong JM, Zhang XZ, et al. Hair root fragile X mental retardation protein assay for the diagnosis of fragile X syndrome. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi 2009; 11: 817-20

191. Potter NT. You can build it ... but will they come?: the potential “expansion” of testing methodologies for fragile X syndrome. J Mol Diagn 2009; 11: 279-280

192. Romero-Espinoza P, Rosales-Reynoso MA, Willemsen R, et al. FMR1 protein expression in blood smears for fragile X syndrome diagnosis in a Mexican population sample. Genet Test Mol Biomarkers 2010; 14: 511-514

193. Iwahashi C, Tassone F, Hagerman RJ, et al. A quantitative ELISA assay for the fragile x mental retardation 1 protein. J Mol Diagn 2009; 11: 281-289

194. Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, et al. A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. Clin Chem 2010; 56: 399-408

195. Saluto A, Brussino A, Tassone F, et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation

1 gene. J Mol Diagn 2005; 7: 605-612

196. Dodds ED, Tassone F, Hagerman PJ, et al. Polymerase chain reaction, nuclease digestion, and mass spectrometry based assay for the trinucleotide repeat status of the fragile X mental retardation 1 gene. Anal Chem 2009; 81: 5533-5540

197. Strom CM, Huang D, Li Y, et al. Development of a novel, accurate, automated, rapid, high-throughput technique suitable for population-based carrier screening for Fragile X syndrome. Genet Med 2007; 9: 199-207

198. Hantash FM, Goos DG, Tsao D, et al. Qualitative assessment of FMR1 (CGG)n triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: Implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. Genet Med 2010; 12: 162-173

199. Lyon E, Laver T, Yu P, et al. A simple, high-throughput assay for Fragile X expanded alleles using triple repeat primed PCR and capillary electrophoresis. J Mol Diagn 2010; 12: 505-511

200. Tassone F, Pan R, Amiri K, et al. A rapid polymerase chain reaction based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. J Mol Diagn 2008; 10: 43-49

201. Dahl C, Gronskov K, Larsen LA, et al. A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome. Clin Chem 2007; 53: 790-793

202. Karunasagar A, Pandit L, Kumar S, et al. Use of methylation sensitive polymerase chain reaction for detection of fragile X full mutation & carrier state in males. Indian J Med Res 2005; 122: 429-433

203. Nygren AO, Lens SI, Carvalho R. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification enables a rapid and reliable distinction between male FMR1 premutation and full-mutation alleles. J Mol Diagn 2008; 10: 496-501.

204. Tzeng CC, Liou CP, Li CF, et al. Methyl-CpG-binding PCR of bloodspots for confirmation of fragile X syndrome in males. J Biomed Biotechnol 2009; 2009:

643-692

205. Zhou Y, Lum JM, Yeo GH, et al. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. Clin Chem 2006; 52: 1492-1500.

206. Elias MH, Ankathil R, Salmi AR, et al. A new method for FMR1 gene methylation screening by multiplex methylation-specific real-time polymerase chain reaction. Genet Test Mol Biomarkers 2011; 15: 387–393

207. Zhou Y, Law HY, Boehm CD, et al. Robust fragile X (CGG)n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. J Med Genet 2004; 41: e45

208. Chen L, Hadd AG, Sah S, et al. High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: evidence for novel FMR1 methylation patterns undetected in Southern blot analyses. Genet Med 2011; 13: 528–538

209. Turner G, Robinson H, Laing S, et al. Preventive screening for the fragile X syndrome. N Engl J Med 1986; 315: 607–609

210. Webb TP, Bundey SE, Thake AI, et al. Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome. Am J Med Genet 1986; 23: 573–580

211. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the meantally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. Am J Hum Genet. 1997; 61: 660–667

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

213. Lévesque S, Dombrowski C, Morel ML, et al. Screening and instability of FMR1 alleles in a prospective sample of 24,449 mother-newborn pairs from the general population. Clin Genet 2009; 76: 511–523

214. Peprah E. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations. Ann Hum Genet 2012; 76: 178–191

215. Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, et al. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. Am J Med Genet 2002; 110: 226–233

216. Elbaz A, Suédois J, Duquesnoy M, et al. Prevalence of fragile-X syndrome and FRAXE among children with intellectual disability in a Caribbean island, Guadeloupe, French West Indies. J Intellect Disabil Res 1998; 42: 1: 81–89

217. Song FJ, Barton P, Sleightholme V, et al. Screening for fragile X syndrome: a literature review and modelling study. Health Technol Assess 2003; 7: 16: 1–106

218. Cora T, Demirel S, Acar A. Chromosomal abnormalities in mentally retarded children in the Konya region – Turkey. Genet Couns 2000; 11: 53–55

219. Tuncbilek E, Alikasifoglu M, Boduroglu K, et al. Frequency of fragile X syndrome among Turkish patients with mental retardation of unknown etiology. Am J Med Genet 1999; 84: 202–203.

220. Tuncbilek E, Alikasifoglu M, Aktas D, et al. Screening for the fragile X syndrome among mentally retarded males by hair root analysis. Am J Med Genet 2000; 95: 105–107

221. Charles MS, Beryl C, Joy BR, et al. Molecular testing for Fragile X Syndrome: Lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. Genet Med 2007; 9: 1: 46–51

222. Levesque S, Dombrowski C, Morel ML, et al. Screening and instability of FMR1 alleles in a prospective sample of 24,449 mother-newborn pairs from the general population. Clin Genet 2009; 76: 511–523

223. Berkenstadt M, Ries-Levavi L, Cuckle H, et al. Preconceptional and prenatal screening for fragile X syndrome: experience with 40,000 tests. Prenat Diagn 2007; 27: 991–994

224. Otsuka S, Sakamoto Y, Siomi H, et al. Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. Brain Dev 2010; 32: 110–114

225. Huang KF, Chen WY, Tsai YC, et al. Pilot screening for fragile X carrier in pregnant women of Southern Taiwan. J Chin Med Assoc 2003; 66: 204–209

226. Tzeng CC, Cho WC, Kuo PL, et al. Pilot fragile X screening in normal population of Taiwan. Diagn Mol Pathol 1999; 8: 152–156

227. Rousseau F, Rouillard P, Khandjian EW, et al. Prevalence 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: 5: 1006–1018

228. Toledano-Alhadef H, Basel-Vanagaite L, Magal N, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. Am J Hum Genet 2001; 69: 352–360

229. Seltzer MM, Baker MW, Hong J, et al. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. Am J Med Genet 2012; 159B: 589–597

230. Dombrowski C, Levesque S, Morel ML, et al. Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. Hum Mol Genet 2002; 11: 4: 371–378

231. Adams SA, Steenblock KJ, Thibodeau SN, et al. Premutations in the FMR1 gene are uncommon in men undergoing genetic testing for spinocerebellar ataxia. J Neurogenet 2008; 22: 77-92

232. Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. Hum Genet 2005; 117: 376–82

233. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. Semin Reprod Med 2011; 29: 299–307

234. Cellini E, Forleo P, Ginestroni A, et al. Fragile X premutation with atypical symptoms at onset. Arch Neurol 2006; 63: 1135–1138

235. Cronister A, Teicher J, Rohlfs EM, et al. Prevalence and instability of fragile X alleles: implications for offering fragile X prenatal diagnosis. Obstetrics and Gynecology, 2008; 111: 3: 596–601

236. Gustavson KH, Blomquist H, Holmgren G. Prelavalaance offragile X syndrome in mentally retarded children in a Swedish couty. Am J Dis Child 1986; 23: 581-588

237. Nusbaum RL, Ledbetter DH. The fragile-X syndrome: The metabolic and molecular bases of Inhented disease. Seriver CR, Beaudet A.~ Sly SW~ Valle

D: McGraw-Hıltlnc NY l995; 1: 795-810

238. Chronister A. Genetic Counseling: in Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research. Hagerman RJ, Cronister, A, 2 nd ed. Baltimore, John Hopkins Univ. Press. 1996: p 251-282

239. Nolin SL, Lewis FA 3rd, Ye LL, et al. Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. Am J Hum Genet 1996; 59: 1252–1261

240. Heitz D, Rousseau F, Devys D, et al. Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X–related CpG island. Sci 1991; 251: 1236–1239

241. Yu S, Mulley J, Loesch D, et al. Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. Am J Hum Genet 1992; 50: 968–980

242. 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

243. Va¨ isa¨nen ML, Ka¨hko¨ nen M, Leisti J. Diagnosis of fragile X syndrome by direct mutation analysis. Hum Genet 1994; 93: 143–147

244. Ashley-Koch AE, Robinson H, Glicksman AE, et al. Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. Am J Hum Genet 1998; 63: 776–785

245. Brown WT, Houck GE. Ding X, et al. Reverse mutations in the fragile X syndrome. Am J Med Genet 1996; 64: 287–292

246. Murray J, Cuckle H, Taylor G, et al. Screening for fragile X syndrome. Health Technol Assess 1997; 1: 1–69

247. Ryynanen M, Heinonen S, Makkonen M, et al. Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies. Eur J Hum Genet 1999; 7: 212–216

248. Geva E, Yaron Y, Shomrat R, et al. The risk of fragile X premutation expansion is lower in carriers detected by general prenatal screening than in carriers from known fragile X families. Genet Test 2000; 4: 289–292

249. Pesso R, Berkenstadt M, Cuckle H, et al. Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. Pre Diag 2000; 20: 611–614

250. Toledano-Alhadef H, Basel-Vanagaite L, Magal N, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. Amn J Hum Genet 2001; 69: 351–360

251. 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

252. Moutou C, Vincent MC, Biancalana V, et al. Transition from premutation to full mutation in fragile X syndrome is likely to be prezygotic. Hum Mol Genet 1997; 6: 971–979

253. Zygulska M, Bal J, Deelen WH, et al. Analysis of unstable DNA sequence in FMR1 gene in Polish families with fragile X syndrome. Acta Biochim Pol 1996; 43: 383–388

254. Grigsby J, Bennett R, Brega A, et al. Fragile X-associated tremor-ataxia syndrome (FXTAS): An X-linked neurodegenerative phenotype. Abstract 280, Presented at the American College of Medical Genetics meeting, Dallas, 2005

255. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. Genet Med 2005; 7: 584–587

256. Asley AE, Sherman SL. Population dynamics of a meiotic expansion model for the fragile X syndrome. Am J Hum Genet 1995; 57: 1414-1425

257. Loesch DZ, Huggins R, Petrovic V, et al. Expansion of the CGG repeat in fragile X in the FMRl gene depends on sex of the offspring. Am J Hum Genet 1995; 57: 1408-1413

258. Heitz D, Devys D, Imbert G, et al. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. J Med Genel 1992; 29: 794-801

259. Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, et al. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. Ann Hum Genet 1984; 48: 21-37

260. Brown WT, Jenkins EC, Goonewardena P, et al. Prenatally detected fragile X

females: long-term follow-up studies show high risk of mental impairment. Am J Med Genet 1992; 43: 96-102

261. Willems PJ, VanRoy B, De Boulle K, et al. Segregation of the fragile X mutation from an affected male to his normal daughter. Hum Mol Genet 1992; 1: 511-515

262. Reyniers E, Vits L, De Boulle K, et al. The full mutation in the FMR-1 gene of mal e fargile X patients is absent in their sperm. Nat Genet 1993; 4: 143-146

263. Van den Ouveland AMW, De Vries BBA, Lida P, et al. DNA diagnosis of the fragile X syndrome in a series of 236 mentally retarded subjects and evidence for areversal of mutation in the FMR-1 gene. Am J Med Genet 1994: 51; 482-485

264. Van den Ouweland AMW, Deelen WH, Kunst CB, et al. Loss of mutation at the FMR1 locus through multiple exchanges between matemal X chromosomes. Hum Mol Genet 1994; 3: 10: 1823-1827

265. ACMG Standards and Guidelines for Clinical Genetics Labs. http://www.acmg.net/AM/Template.cfm?Section=Laboratory_Standards_and_Guidelines&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=7439. (29.03.2013)

266. College of American Pathologists. Molecular pathology checklist, item MOL.49630. Standard nomenclature. www.cap.org. (29.03.2013)

267. Human Genome Variation Society. Nomenclature for the description of sequence variants. http://www.hgvs.org/mutnomen. (29.03.2013)

268. Nolin SL, Glicksman A, Ding X, et al. Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010. Prenatal Diagnosis 2011; 31: 10: 925–931

269. Tsafrir A, Altarescu G, Margalioth E, et al. PGD for fragile X syndrome: ovarian function is the main determinant of success. Hum Repro 2010; 25: 10: 2629–2636

270. Hagerman R, Berry-Kravis E, Kaufmann W, et al. Advances in the treatment of fragile X syndrome. Pediat 2009; 123: 1: 378–390

271. Ogren M, Lombroso P. Reversing the effects of fragile X syndrome. Journal of

the Am Aca Chil Adole Psyc 2008; 47: 8: 863–867

272. Partington MW, Robinson H, Laing S, et al. Mortality in the fragile X syndrome: preliminary data. Am J Med Genet 1992; 43: 120-123

KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fragile X sendromlu hastalarda FMR1 genindeki 3'lü tekrar artış sayı mutasyonlarının belirlenmesi
ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	
EUDRACT NUMARASI	
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Munis Dündar
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZM. TEZİ [ ] AKADEMİK AMAÇLI [ ] DR. TEZİ [ ] Y.LİSANS TEZİ [X]
ARAŞTIRMA FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 [ ] FAZ 2 [ ] FAZ 3 [ ] FAZ 4 [ ] BE/BY [ ] DİĞER [ ] Diğer ise belirtiniz İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA [ ] Belirtiniz
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ [X] ÇOKMERKEZ [ ] ULUSAL [ ] ULUSLARARASI [ ]

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe [ ]	İngilizce [ ]	Diğer [ ]

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI		Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	[ ]	
SİGORTA	[ ]	
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	[ ]	
İLAN	[ ]	
YILLIK BİLDİRİM	[ ]	
SONUÇ RAPORU	[ ]	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	[ ]	
DİĞER	[ ]	

ASLI GİBİDİR
BAYANCAN
Fakülte Sefi

2010.016.140

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2011/389 | Karar Tarihi : 07.06.2011

Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Munis Dündar'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI: Erciyes Üniversitesi Senatosunun 08.12.2010 tarih ve 16 nolu toplantı kararı

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Doç.Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Doç.Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Doç.Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi	E.Ü. Tıp Fak.	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Rektörlük	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [X] H [ ]	
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E [ ] K [X]	E [ ] H [X]	E [x] H [ ]	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	E.Ü. Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu	E [X] K [ ]	E [ ] H [X]	E [ ] H [X]	



EKLER

EK 1:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

I. BİLGİLENDİRME BÖLÜMÜ

Araştırmanın Adı: : Fragile X Sendromlu Hastalarda FMR1 Genindeki 3'lü Tekrar Artış Sayı Mutasyonların Belirlenmesi

Araştırmanın Amacı: Frajil X sendromu genetik bir hastalıktır. Öğrenme güçlüklerinin en yaygın kalıtımsal nedenidir. Kızlara göre erkeklerde daha sık görülür. Bu hastalık, öğrenme ve davranışla ilgili birtakım sorunlara neden olur. Erkeklerin hastalıktan etkilenme oranı kızlara göre daha ciddidir. Frajil X sendromlu çocuklarda görülen diğer sorunlar arasında geç konuşma, konuşma ve dil gelişiminde bozukluk sayılabilir. Bazı çocuklar ve yetişkinler, yineleyen davranış, zayıf dikkat aralığı ve aşırı hareketlilik gibi sorunlar yaşarlar. Hastalıktan etkilenen pek çok çocuk, zayıf göz teması, el çırpma, sosyal kaygı, anormal utangaçlık ve ısrarla rutini isteme gibi otizm özellikleri sergiler. Bazı çocuklar ve yetişkinler saraya yakalanabilirler. Frajil X sendromuyla ilişkili fiziksel özellikler arasında oldukça büyük bir baş, uzun bir yüz, göze çarpan kulaklar ve büyük çene sayılabilir. Bununla birlikte, bu özellikler nadiren belirgindir. Bu özelliklerin belirgin olmayışı, eksik veya geç tanı konulmasına neden olabilir.

Frajil X Sendromuna nasıl tanı konulur: Bir kişide ön mutasyon veya tam mutasyon olup olmadığını belirlemek için genetik test uygulanır. Bu test, küçük bir kan örneğiyle yapılır.

Frajil X Sendromuna tanı koymanın önemi; Çocukta frajil X sendromuna tanı koymak önemlidir, çünkü bu yolla çocuk eğitim, konuşma ve dil gelişimi, davranış gibi alanlarda uzman yardımı alabilir. Yetişkinlerde frajil X sendromuna tanı koymak, bu kişilerin karşılaştıkları belirli sorunların anlaşılmasına ve yönetilmesine yardımcı olabilir. Frajil X sendromuna tanı koymak önemlidir, çünkü böylece hastalıktan etkilenen çocukların risk altında bulunan akrabaları genetik danışmanlığı, taşıyıcı testi ve doğum öncesi tanı hizmetlerinden yararlanabilir.

Araştırmanın Süresi: 12 AY

Araştırmaya Katılan Gönüllünün Sayısı: 50 kişi

Araştırmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden dört mililitre kan alınacaktır. İsimleriniz tamamen gizli tutulacaktır.Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır.Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.Yapmak istediğimiz çalışmanın size bir risk getirmesi beklenmemektedir. Kan aldırmanın genelde hiçbir zararı olmamasına karşın, kolunuzda nadiren çok az kanama veya morarmaya yol açabilir. Araştırmanın sonucunda aranan bilgi elde edildiğinde size sonuçlar verilecektir.Bu formu imzalamadan önce veya imzaladıktan sonra çalışma ile ilgili 24 saat boyunca aşağıda adı yazılı kişiye sorularınızı sorabilirsiniz:

Araştırmacının:

Adı ve Soyadı: Yasin ADA **Cep Tel:** 0539 434 56 56

Adres: Erciyes Üni. Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi 2.Kat Tıbbi Genetik AD.

II. GÖNÜLLÜ OLUR BÖLÜMÜ

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen kişi tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün:
Adı: Tarih:
Soyadı:
İmza:
Açıklamaları Yapan Kişinin:
Adı: Tarih:
Soyadı:
İmza:
Tanık Olan Kişinin:
Adı: Tarih:
Soyadı:
İmza:

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: YASİN ADA

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 17 Haziran 1987, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 539 434 56 56

email: 4022931006@erciyes.edu.tr ; y_ada087@hotmail.com/

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 38039 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Talas Lisesi, Talas/KAYSERİ	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010- Halen	Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce