

FRAJİL X SENDROMU ÖN TANILI HASTALARDA *FMR1* GENİNDEKİ 3'LÜ TEKRAR SAYI MUTASYONLARIN BELİRLENMESİ*
IDENTIFICATION OF TRIPLET REPEAT MUTATIONS IN THE *FMR1* GENE IN PATIENTS WITH CLINICAL DIAGNOSIS FOR FRAGILE X SYNDROME

Yasin ADA¹, Yagut AKBAROVA², Hakan GÜMÜŞ³, Munis DÜNDAR¹

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Nöroloji Bilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Frajil X Sendromu (FXS) (OMIM 300624); mental retardasyonların etmenleri arasında Down sendromu'ndan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır. Toplumdaki sıklığı erkeklerde yaklaşık 4000'de 1 ve kadınlarda yaklaşık 8000'de 1 olarak bildirilmektedir. FXS'nda klinik bulguları mental retardasyon, belirgin kulaklar, uzun ince bir yüz, davranış bozuklukları, pubertal dönemden itibaren makroorşitizmdir.

FXS'dan sorumlu gen, Xq27.3'e lokalize, 17 ekzon içeren, 38 kb büyüklüğünde, 4308 bp transkripti (NM_002024) olan *FMR1* genidir. Gen, 5' ucunda CpG metilasyon bölgesi ve birinci ekzonun translyasyona uğramayan (UTR) bölgesinde yer alan CGG (sitozin, guanin, guanin) üçlü tekrarları içerir. Gen, 632 amino asitlik (NP_002015). *FMR1* proteini (*FMRP*) kodlar. Çeşitli dokularda ifade edilen bu protein özellikle nöronal sinapslardaki fonksiyonu ile zihinsel gelişim için gereklidir.

Hastaların % 98-99' unda *FMR1* geninin 5' ucundaki CGG tekrarında genişleme ve promotör bölgesinde metillenme, %1-2'sinde ise gen içi delesyon ve nokta mutasyonları görülür.

Normal bireylerde CGG tekrar sayısı ~5-44 arasındadır ve ~45-54 arasında "gri bölge" olarak adlandırılır, ~55-200 arasındaki bireyler ise "premutasyon" yani FXS taşıyıcısıdır. Premutasyon taşıyıcı kadınlarda mayoz bölünmede CGG tekrarında artış gözlenir ve bu olay "antisipasyon" olarak tanımlanır ve bu özellik sendromun kalıtımını diğer X'e bağlı hastalıklardan farklı kılar. CGG tekrar sayısının ≥ 200 olması "full mutasyon" olarak tanımlanır ve FXS fenotipine yol açar.

Bu çalışmada, kırkbir erkek ve dokuz kız olgu (toplam 50 olgu) *FMR1* Sizing PCR (ABBOTT) ve SNP Detective Fragile X (GML) kitleri kullanılarak FXS'na neden olan *FMR1* genindeki CGG trinükleotit sayısı ve metilasyon durumu açısından incelendi. Kırkbir erkek olgunun %14.63 'ünde full mutasyon, %2.43' ünde premutasyon ve bir olgu da ise boyut mozaizmi bulunmuştur. Toplam dokuz kız olgunun %11.11'inde full mutasyon görülmüştür. Full mutasyonların tümü metillenmiş olarak bulundu.

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

*Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-12-3886 nolu proje ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 17.11.2014

Makale Kabul Tarihi: 17.11.2015

ABSTRACT

Fragile X Syndrome (FXS) (OMIM 300624) is most frequently observed familial mental retardation syndrome in males, and second frequent following Down syndrome in general population. The frequency rate is one in every 4000 men as compared to one in every 8000 women. In 98-99% of the cases, the disease is caused by full repeat expansion of CGG (> 200) at 5'UTR of *FMR1* gene and methylation of CpG islands in the promoter region. Deletions and point mutations in the gene is responsible from the remaining 1-2% of the cases.

Clinical indications of FXS are mental retardation, large ears, narrow face, behavioral disorder, macroorchidism after puberty.

The gene is called as *FMR1*, which is located in Xq27.3, and 38 kb in size containing 17 exons. mRNA of an approximate size of 4308 bp (NM_002024) coding 632 aa (NP_002015) protein called as *FMR1* protein (*FMRP*), expressed in several tissues and function especially in synaptic regions of neurons.

CGG repeat lengths are ~5-44 in normal population. Repeats between ~45 and ~54 is called as 'grey zone'. Individuals with ~55-200 repeat lengths are called premutation or FXS carriers. In female premutation carriers, CGG repeats expands during oogenesis, which is called as anticipation and this phenomenon differentiates FXS inheritance from the classical X-linked recessive inheritance. Individuals with more than 200 CGG repeats are classified as full mutation and associated with FXS.

In this study, CGG trinucleotide count in *FMR1* gene and the methylation status were investigated in 50 (41 male and 9 female patients) by using *FMR1* Sizing PCR (ABBOTT) and SNP Detective Fragile X (GML) kits. Among the 41 male patients, 14.63% had full mutation, 2.43% had premutation and size mosaicism was found in one male patients. Full mutation was found in 11.11% of female patients. All full mutations were methylated.

Keywords: *FMR1* gene; Fragile X syndrome; Xq27.3; Mental Retardation; CGG trinucleotide repeats

Corresponding Author: Yasin ADA Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri

Telefon: 0 352 207 66 66

E-mail: ada_Yasin@yahoo.com.tr

Bu çalışmada FXS ön tanısı alan olgularda, laboratuvarımızda ilk olarak uygulanan moleküler analiz yöntemleriyle üçlü tekrar sayılarının belirlenmesi ve mutasyon saptanan ailelerde genetik danışmanlık verilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 01.2013-12.2013 tarihleri arasında Frajil X sendromu (FXS) şüphesi ile gönderilen ve 13 kriterlik Hagerman skorlama sistemi ile altı ve üzerinde puan alan 3-15 yaş arası dokuz (%18) kız ve 41 (%82) erkek olmak üzere toplam 50 olguda yürütüldü.

Olgulardan 2 cc EDTA'lı kan alınıp genomik Kandan Genomik DNA İzolasyon (RTA-Gebze/Kocaeli Türkiye) kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Yapılan DNA izolasyonları NanoDrop 2000-Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (Thermo Scientific) kullanılarak saflık derecesi ve miktar tayini yapıldı. FMR1 Sizing PCR (ABBOTT-Alameda ABD) kiti kullanılarak 98.5 °C'de 10 saniye, 58 °C'de bir dakika, 75 °C'de altı dakika 15 döngü - 98.5 °C'de (+0.1°C/dngü) 10 saniye, 56 °C'de bir dakika 75 °C'de altı dakika 15 döngü - 4°C sonsuz termal döngü profili uygulanarak termal döngü cihazında (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) PCR gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek jel elektroforez cihazında (OWL EasyCast™ B2 Elektroforez Cihazı-Thermo Scientific) 120 voltta 20 dakika yürütülerek yorumlandı. Aynı örnekler dört kapillerli 3130 Genetic Analyzer Cihazında (Applied Biosystems) yürütülerek Gene Mapper (Applied Biosystems) programında analizi yapılarak FMR1 genindeki CGG trinükleotit sayısı incelendi. Saflık derecesi ve miktar tayini yapılan DNA'lar EpiTect Bisulfite Kiti (QIAGEN) kullanılarak metillenmemiş sitozinlerin tamamı urasile dönüştürüldü. Sodyum bisülfid uygulamasından sonra ürünleri SNP Detective Fragile X (GML-Altendorf Switzaeland) kiti kullanılarak 95 °C'de 15 dakika - 98 °C'de bir dakika, 61 °C'de bir dakika, 72 °C'de iki dakika 30 döngü - 60 °C'de 10 dakika - 15 °C'de sonsuz termal döngü profili uygulanarak

termal döngü cihazında (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) PCR gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünleri dört kapillerli 3130 Genetic Analyzer Cihazında (Applied Biosystems) yürütüldü ve Gene Mapper (Applied Biosystems) programında analizi yapılarak FMR1 genindeki CGG trinükleotit sayısı ve metilasyon durumları incelendi.

İstatistiksel analiz olarak SPSS 22 programı ile cinsiyet ve mutasyon aralıklarındaki bulguları karşılaştırarak bağımsız t testi uygulanmıştır. Olguların yaş ve tekrar sayılarının ortalaması alınarak standart sapma değerleri, cinsiyet arası mutasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

BULGULAR

Yaş ortalaması 7.33 ± 3.42 yıl olan dokuz kız olgunun sekiz'inde (%88.88) CGG tekrar sayıları normal sınırlarda (28 - 37 tekrar, ortalama 29.66 ± 2.25) bulunurken birinde (%11.11) bir allel >200 tekrarlı aynı zamanda metillenmiş ve diğer allelde 30 tekrarlı CGG trinükleotitler bulundu.

Yaş ortalaması 7.70 ± 3.71 yıl olan 40 erkek olgunun 33'ünde (%80.487) CGG tekrar sayılarının normal sınırlarda (18 - 41 yıl, ortalama 28.81 ± 3.9 yıl), altısında (%14.63) ise CGG tekrar sayıları >200 olup aynı zamanda metillenmiş full mutasyon, bir olguda (%2.43) 90 CGG tekrarlı premutasyon, diğer bir olguda (%2.43) boyut mozaizmi (91 - >200 CGG tekrarlı) aynı zamanda metillenmiş full mutasyonlu mozaik CGG trinükleotitler bulundu.

Bu çalışmada toplam 40 erkek olgunun %15'inde full mutasyon, %2.50'inde premutasyon ve bir erkek olguda ise boyut mozaizmi bulundu. Toplam dokuz kız olgunun %11.11'inde full mutasyon görüldü (Tablo I).

Çalışmamızda allel bazlı tekrar sayıları değerlendirildiğinde en küçük tekrar uzunluğu 18 CGG tekrarı ve normal aralıkta en sık görülen tekrar sayısı 29 (%40), 28 (%20), 31 (%12) ve 30 (%10) bulunmuştur. (Tablo II, Grafik 1).

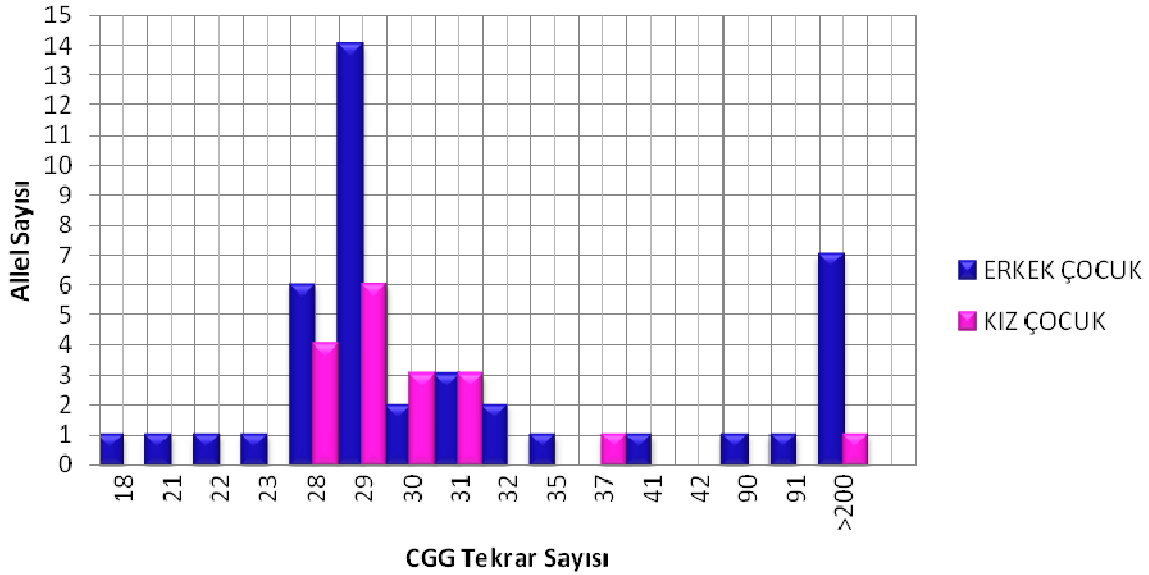
Cinsiyet ve mutasyon aralıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo I, Tablo II).

Tablo I. FXS şüphesi bulunan olgularda FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre yüzdeleri ve cinsiyetler arası mutasyon yüzdeleri.

	Erkek Olgu Sayısı (%) Mutasyon Yüzdeleri (yaş ortalaması 7.70)	Kız Olgu Sayısı (%) Mutasyon Yüzdeleri (yaş ortalaması 7.33)	P değeri
Full mutasyon, >200 tekrar	6 (%15) %12.24	1 (%11.11) %2.04	0.700
Premutasyon, 55-200 tekrar	1 (%2.50) %2.04	0 (%0) %0	
Gray zone, 45-55 tekrar	0 (%0) %0	0 (%0) %0	
Normal <45 tekrar	33 (%82.50) %67.34	8 (%88.88) %16.32	
Toplam	40	9	

Tablo II. FXS şüphesi bulunan olgularda allel bazlı FMR1 genindeki CGG trinükleotit mutasyon aralıklarına göre tekrar ortalaması, yüzdeleri ve cinsiyetler arası mutasyon yüzdeleri

	Erkek Olgularda İncelenen Allel Sayısı/Tekrar Ortalaması (%)	Kız Olgularda İncelenen Allel Sayısı/Tekrar Ortalaması (%)	P değeri
	Mutasyon Yüzdeleri (yaş ortalaması 7.70)	Mutasyon Yüzdeleri (yaş ortalaması 7.33)	
Full mutasyon, >200 tekrar	7 (%16.66) %14	1 (%5.55) %2	0.171
Premutasyon, 55-200 tekrar	2/90.5 (%4.76) %4	0 (%0) %0	
Gray zone, 45-55 tekrar	0 (%0) %0	0 (%0) %0	
Normal <45 tekrar	33/28.81 (%78.57) %66	17/29.76 (%94.44) %34	
Toplam	42	18	

**Grafik I.** FXS şüphesi bulunan olgularda CGG tekrar sayılarına göre allel sayılarının dağılımı.**TARTIŞMA**

FXS, mental retardasyonların etmenleri arasında Down Sendromu'ndan sonra ikinci sırada, ailesel mental retardasyonlar içinde ise birinci sırada yer almaktadır (3). Verkerk ve ark (2), 1991 yılında ilk kez *FMR1* geninin cDNA'sını pozisyonel klonlama ile izole ettiler ve Frajil Bölge Mental Retardasyon (*FMR1*) terimini kullandılar. *FMR1* geni (OMIM 309550) Xq27.3 bölgesine yerleşik, 17 ekzonlu 38 kb büyüklüğünde bir genidir (15-17). CGG tekrar bölgesi, genin 1. ekzonu içinde ve CpG adasının 250 bp aşağısındadır. *FMR1* geninin promotörü olarak görev yapan bu bölge FXS' lulara anormal metillenmektedir (1, 15).

Klinik bulgular birçok mental retardasyon sendromları ile benzerlik gösterdiklerinden ayırıcı tanı için

sitogenetik ve moleküler genetik testler son derece önemlidir (14).

FXS'ünü ortaya çıkaran üç temel mekanizma vardır. Bunlardan birincisi; *FMR1* genindeki CGG trinükleotit mutasyonları (full mutasyon), ikincisi bu *FMR1* genin promotörünün metilasyonu, üçüncüsü ise *FMR1* genindeki delesyonlar veya nokta mutasyonları. *FMR1* genindeki metilasyon ve CGG trinükleotit artış mutasyonları FXS'lu vakaların %98-99'unu oluştururken *FMR1* genindeki delesyonlar veya nokta mutasyonlar %1-2'sini oluşturur (8-10, 38).

Normal allellerde en sık görülen tekrar uzunluğu 29 ve 30 CGG tekrarlarıdır (19). Bizim çalışmamızda da en sık görülen tekrar uzunlukları 29 (%40), 28 (%20), 31 (%12) ve 30 (%10) CGG tekrar olarak bulunmuştur

(Tablo II, Grafik 1).

Ara allellerin bir sonraki nesile aktarılmasında tekrar sayısında küçük artış ve azalmalar oluşabilir, ancak FXS'lu bir çocuk doğma riski yoktur. Fakat bu boyuttaki allellere sahip bireyin uzak akrabalarının ve ya gelecek nesillerinin FXS ile ilişkisi olabilir. Ara allel aralığında bir allel tespit edildiğinde aile taraması yapılarak tespit edilen allelin gerçekten ara allel mi yoksa aile içi premutasyon mu olduğu belirlenmesi ve premutasyon tespit edildiğinde somatik mozaisizm olma ihtimali nedeniyle full mutasyon aralığına dikkat edilmesi gerekir (19).

FXS iyi bilinen bir sendrom olmasına rağmen, FXTAS ve FXPOI iyi tanınmamaktadır. Bu sebeple FMR1 mutasyonlu ailelerde diğer aile bireylerinin detaylı klinik değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Klinik genetikçi, bu ailelerde birçok jenerasyon boyunca gelişimsel, nörodejeneratif ve üreme ile ilgili semptomların başlangıç yaşını, şiddetini ve aile bireylerin arasındaki ilişkilerini göz önüne almalıdır (39). FMR1 premutasyon taşıyan kadına tüm gebeliklerinde prenatal tanı yapılması önerilmelidir. Bilinen taşıyıcıların bütün aile üyeleri risk altında olabilir bu yüzden risk taşıyan kişilerin durumlarını belirlemek için test önerilmelidir (19).

Boyut veya metilasyon mozaisizm olan bireyler full mutasyonlu tam metile olan bireylere göre hastalık semptomları daha hafif ve dolayısıyla toplumla olan ilişkileri daha yüksek fonksiyonel olabilir (19). Erkek bireylerde sık görülen boyut mozaisizm bizim çalışmamızda da sekiz yaşındaki erkek çocuğumuzda 91 tekrar uzunlukta metillenmemiş premutasyonlu alleller ve >200 tekrar uzunlukta full mutasyonlu metillenmiş CGG tekrarlı alleller tespit edildi.

2011 yılındaki bir çalışmada klasik FXS semptomları gösteren 29 tekrar sayısı saptanan 35 yaşındaki bir erkek bireyde annenin tekrar sayısı 29 ve 33 olarak belirlenmiştir. FMRP antibody çalışması ile FMRP proteinin eksprese olmadığını belirlenmesi üzerine FMR1 geni sekanslanmış ve genin 2. ekzonunda stop kodunu oluşturan c.80C>A (p.Ser27X) anlamsız (nonsense) bir mutasyon rapor edilmiştir (40).

Mental retardasyonlu erkeklerde FXS tanısı teyidi için FRAXA sitogenetik tespitine dayanarak yapılan ve sendromdan etkilenen erkeklerin özgün tahmin sayısı 100,000'de 80 olarak bildirilmişti ve frajil X literatürlerinde hala sıklıkla kullanılmaktadır. Büyük olasılıkla mental retardasyonlu bireylerde tesadüfi bir şekilde Xq27-q28 de FRAXA yakınlarındaki diğer kromozomal frajil bölgelerin (FRAXD, FRAXE, FRAXF gibi) varlığı yanlış sitogenetik tanıya yol açmıştır. FMR1 geninin moleküler analizi sonrasında FXS erkeklerin sıklığı 1991 yılından sonra azalarak yenilenmiştir. FMR1 geni moleküler çalışmalarla mental retardasyon taşıyan bireylerde FXS'dan etkilenen erkek bireyler için tahmini sıklığı son çalışmalarda 100.000'de 16-25 olarak bildirilmiştir (41).

Moleküler tanı testi olarak altın standart Southern Blot metodu ve PCR metodlarıdır. Southern blot, özgün restriksiyon enzimlerle genomik DNA'yı keserek ve gene özgün problarla hibridizasyon temelli bir tekniktir, tek deneyde FMR1 mutasyonların boyutlarını ve metilasyon durumlarını belirleme avantajı sağlar. An-

cak yoğun emek isteyen ve çalışması bir kaç gün süren ve diğer yöntemlere göre maliyetli bir yöntemdir.

PCR tekniği basitlik ve hızlı olması nedeniyle genel olarak moleküler tanı için tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte FMR1 mutasyonları GC açısından çok zengin oldukları için PCR ile amplifiye edilmesi çok zordur. Southern blot tekniğinin duyarlılık ve özgüllüğü ile rekabet edebilmek ve hatta FMR1 mutasyonların metilasyon durumunu belirlemek için PCR yöntemlerinin geliştirilmesinde çalışılmış ve tanı kitleri oluşturulmuştur (42). FXMR için geçerli moleküler tanı yöntemlerin yarattığı kısıtlamalar ve zorluklar birçok alternatif yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır ve yeni tanı testleri ortaya çıkmıştır; 1) İmmünohistokimyasal yöntem ile FMRP'nin varlığı yada yokluğu belirlenmiş, 2) PCR yöntemleri optimize edilerek TR-PCR (trinükleotit repeat PCR), 3) MS-PCR (metil spesifik pcr), 4) metilasyonlu alleli erkekleri tanımlamak için multipleks ligasyon prob amplikasyon yöntemi, 5) real-time PCR yöntemi gibi bir çok yöntemler geliştirilmiştir (19,42). Günümüzde FXS tanısında bizim de kullandığımız PCR metodlarından TR-PCR ve MS-PCR yöntemler birçok laboratuvarında kullanılan yöntemlerdir. Ancak moleküler yöntemlerin yanı sıra mutlaka FXS şüphesi ile gelen her olguda kromozom analizinin de yapılması gerektiği unutulmamalıdır.

Türkiye'deki full mutasyon sıklığı bilgileri 2000 yılında Cora ve ark. (44) tarafından yapılan çalışmada öğrenme güçlüğü olan kadınlar da 25'de 1 erkeklerde ise 95'de 5 olarak bildirilmiştir (44). 1999 ve 2000 yılında Tunçbilek ve ark. (45) tarafından yapılan çalışmada ise nedeni bilinmeyen öğrenme güçlüğü olan kadınlarda 13'de 0 erkeklerde ise 166'da 5 (45) ve 300'de 5 (46) olarak bildirilmiştir (43).

Çalışmamızda ise 40 erkek olguda %15'inde full mutasyon, %2.50'inde premutasyon ve bir erkek olguda ise boyut mozaisizmi bulunmuştur. Toplam 9 kız olgunun %11.11'inde full mutasyon görülmüştür (Tablo I).

Çalışmamızın toplamında allel bazlı tekrar sayıları değerlendirildiğinde en küçük tekrar uzunluğu 18 CGG tekrarı ve normal aralıkta en sık görülen tekrar sayısı 29 (%40), 28 (%20), 31 (%12) ve 30 (%10) bulunmuştur (Tablo II, Grafik 1).

Cinsiyet ve mutasyon aralıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ve mutasyon aralıkları üzerinde cinsiyetin etkin olmadığı anlaşılmıştır (p>0.05) (Tablo I, Tablo II). Her iki cinsiyette de mutasyon aralıklarındaki tekrar sayıları görülmekte ve her iki cinsiyeti de etkilemektedir.

2013 yılında Amerikan Koleji Tıbbi Genetik ve Genomik Birimi (ACMG) tarafından yayınlanan standart yönergelerinde Frajil X testleri için mutasyon kategorilerinde, kısa tekrar dizilerinin isimlendirmesi konusunda ve birçok konuda yeni düzenlemeler, standartlar ve öneriler sunulmuştur (19).

FXS için henüz kesin bir tedavi olmamasına rağmen erken tanı ile semptomatik ilaçlar ile konuşma, özel eğitim, uğraşı tedavisi ve spor çalışmaları gibi uygulamalardan yararlanma şansı artar ve sendromun bulguları hafifletilebilir. Bazı ülkelerde özellikle Amerika'nın bazı eyaletlerinde FMR1 testi yenidoğan tarama testi olarak uygulanmaktadır. Bizim ülkemizde de bu testin

yenidoğan tarama testleri içinde yer alması gerektiğine inanılmaktadır.

Sendromun sık görülmesi ve ciddi mental gerilikle ilişkili olması nedeniyle genetik danışmanlar ve FXS'lu aileler için FXS hakkında güncel bilgi ve yardım sağlayan uluslararası vakıf ve özel araştırma merkezleri mevcuttur (ABD Ulusal Frajil X Vakfı (<https://fragilex.org/>), FRAXA Araştırma Vakfı (<http://www.fraxa.org/>), Frajil X Klinik ve Araştırma Konsorsiyumu (<http://fxcrc.org/>) (39).

FXS'lu hastaların tümünü tespit edebilmek için FMR1 geninin CGG tekrar sayısı, metilasyonu ve dizi analizleri ile nokta mutasyonları araştırılmalı, ayrıca FXS şüphesiyle gelen bütün hastalara kromozom analizi ile diğer olası mental retardasyon ilişkili kromozom anomalilerinin saptanması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Fu Y, Kuhl D, Pizzuti 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: 359-371.
4. Coffee B, Keith K, Albizua 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, Smith K, Reines 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; 64:196-197.
7. Murray A, Youings S, Dennis N, et al. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: Molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 727-735.
8. 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; 152A: 2512-2520.
9. De Boule K, Verkerk A, Reyniers 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. Fryns JP, Van Den Berghe H. Transmission of fragil (X)(q27) from normal male(s). *Hum Genet* 1982; 61: 262-263.
12. Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X checklist *Am J Med Genet* 1991; 38: 283-287.
13. Buttler MG, Miller LK, Hagerman RJ. Standards for selected anthropometric measurements in males with the fragile X syndrome. 1992; 89: 1059-1062.
14. Fryns JP. The fragile X syndrome: A study of 83 families. *Clin Genet* 1984; 26: 497-528.
15. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, et al. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1147-1153.
16. Warren ST, Ashley CT. Triplet repeat expansion mutations: The example of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 77-99.
17. Oostra BA, Willems PJ. A fragile gene. *BioEssays* 1995; 17:11: 941-947.
18. Kathryn BG, Jeannie V, Stephen TW. Fragile X syndrome. *Eur Hum Genet* 2008; 16: 666-672.
19. 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: 575-586.
20. Antinolo G, Borrego S, Cabeza JC, et al. Reverse mutation in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 237-239.
21. Randi H, Jacky A, Paul H. *FMR1* premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. *J Neuro Disord* 2011; 3: 211-224.
22. Paul JH, Randi JH. The Fragile-X Premutation: A maturing perspective. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 805-816.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Sutherland GR, Baker E, Richards RJ. Fragile sites still breaking. *TIG* 1998; 14: 501-505.
27. Ashley CT, Warren ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 703-728.
28. 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.
29. 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.
30. Lugenbeel KA, Peier AM, Carson NL, et al. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat Genet* 1995; 10: 483-485.
31. 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.
32. Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, et al. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 783-789.
33. Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, et al. The fragile

- X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* 1996; 12: 91-93.
34. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, et al. Germline mosaicism at the fragile X locus. *Am J Med Genet* 1995; 55: 384-386.
 35. Biancalana V, Taine L, Bouix JC, et al. Expansion and methylation status at FRAXE can be detected on Eco RI transfers used for FRAXA diagnosis: Analysis of four FRAXE families with mild mental retardation in males. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 847-854.
 36. Tarleton JC, Soul RA. Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J Pediatrics* 1993; 3: 122-185.
 37. Hagerman R. Fragile X. Treatment of hyperactivity. *Pediatrics* 1997; 99: 753.
 38. Kathryn BG, Jeannie V, Stephen TW. Fragile X syndrome, *Eur Jour Hum Genet* 2008; 16: 666-672.
 39. 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* 2012; 21: 752-760.
 40. Karen G, Karen BN, Alma D, et al. A nonsense mutation in FMR1 causing fragile X syndrome. *Eur Hum Genet* 2011; 19: 489-491.
 41. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the meantly retarded: An epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet*. 1997; 61: 660-667.
 42. 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.
 43. Song FJ, Barton P, Sleightholme V, et al. Screening for fragile X syndrome: A literature review and modelling study. *Health Technol Assess* 2003; 7: 1-106.
 44. Cora T, Demirel S, Acar A. Chromosomal abnormalities in mentally retarded children in the Konya region – Turkey. *Genet Couns* 2000; 11: 53-55.
 45. 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.
 46. 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.