

Raziskovalni članek / Research article

ODKRIVANJE SINDROMA FRAGILNEGA KROMOSOMA X NA OSNOVI TEHNOLOGIJE PCR PRI MOŠKI POPULACIJI IZ SEVEROVZHODNE SLOVENIJE

DETECTION OF FRAGILE X SYNDROME BASED ON PCR TECHNOLOGY IN THE MALE POPULATION OF NORTH-EASTERN SLOVENIA

V. Kunčnik¹, A. Erjavec Škerget^{2,3}, Š. Stangler Herodež^{2,3}, B. Zagradišnik², N. Kokalj Vokač^{2,3}

(1) *Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

(2) *Laboratorij za medicinsko genetiko, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Maribor, Slovenija*

(3) *Oddelek za molekularno biologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija*

IZVLEČEK

Uvod. Fragilni sindrom X (FXS) je najpogostejši vzrok za dedno obliko duševne manjrazvitosti pri moških. Povzročja ga nestabilna pomnožitev trinukleotidnih ponovitev CGG v genu FMR1 na kromosomu X. Dokončna diagnoza FXS sloni na molekularni genetski analizi z metodo po Southernu, ki pa je zahtevna in dolgotrajna. V prispevku predstavljamo strategijo testiranja pri sumu na prisotnost FXS na osnovi testa z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), ki je izključitvene narave, vendar je učinkovito vodilo pri odločitvah o nadaljnjem testiranju z metodo po Southernu. Predstavljamo rezultate retrospektivno opravljene analize na skupini moških preiskovancev iz severovzhodne Slovenije.

Bolniki in metode. Retrospektivna študija je bila izvedena na 104 vzorcih genomske DNA preiskovancev moškega spola, ki so bili obravnavani v genetskem laboratoriju z napotitvenimi diagnozami: sum na FXS, nepojasnjena umska manjrazvitost ter displastični znaki z avtizmom ali brez njega. Pri izbranih preiskovanih genetskega vzroka njihovih težav nismo odkrili. S tehniko PCR in agarozno elektroforezo smo določali prisotnost oz. odsotnost normalnega števila ponovitev tripleta CGG v regiji FMR1.

Rezultati. Od 104 vzorcev smo bili s tehniko PCR uspešni pri 99 vzorcih. Pri petih vzorcih od 104 (4,81 %) zaradi slabe kakovosti DNA rezultata nismo mogli podati. Prisotnost normalnega števila tripletov CGG smo dokazali pri 98 preiskovanih, pri enem preiskovancu od 99 (1,01 %) pa smo postavili sum na FXS. Z metodo po Southernu smo diagnozo FXS tudi potrdili.

Zaključki. Predstavljena metodologija na osnovi PCR je primerna kot preliminarni test za izključitev FXS pri preiskovanih moškega spola. Prisotnost polne mutacije smo našli pri 1,01 % moških preiskovancev, pri katerih smo postavili sum na FXS.

Ključne besede: sindrom fragilnega kromosoma X, kromosom X, gen FMR1, duševna manjrazvitost, verižna reakcija s polimerazo, tehnika PCR.

ABSTRACT

Background. Fragile X syndrome (FXS) is the most common cause of inherited mental retardation in males. It is caused by an unstable expansion of a trinucleotide CGG repeat in the FMR1 gene on chromosome X. The definitive diagnosis of FXS is based on molecular genetic analysis, using the Southern blot technique, which is a demanding and time-consuming technique. In this study we present a diagnostic strategy based on PCR assay, designed as an exclusion test for detection of the FMR1 mutation. We present the results of a retrospective analysis in a group of male subjects from NE Slovenia.

Methods. We present a retrospective study of 104 male subjects with the following referral diagnoses: suspected FXS, unexplained mental retardation or dysplastic signs with / without autism. The cause of their disability had not been revealed by previous diagnostic tests. We performed PCR analysis of genomic DNA extracted from the peripheral blood of subjects. Using the PCR technique and agarose electrophoresis we determined the presence / absence of the normal number of repeats of the CGG triplet in the FMR1 region.

Results. The PCR method was successful in 99 of 104 subjects. In five of the 104 samples (4.81 %) no results could be obtained because of bad DNA quality. The presence of normal CGG sequence variations was detected in 98 subjects. In one subject (1.01 %, 1/99) we established the suspicion of FXS, which was subsequently confirmed by Southern blot analysis.

Conclusions. The presented methodology based on PCR assay is suitable as a preliminary test to exclude FXS in male subjects. Using this approach we detected the full mutation in 1.01 % of male subjects with suspected FXS.

Key words: fragile X syndrome, chromosome X, FMR1 gene, mental retardation, polymerase chain reaction, PCR technique.

UVOD

Fragilni sindrom X (FXS), ki ga imenujemo tudi Martin-Bellov sindrom, je eden najpogostejših vzrokov za pojavljanje genetsko pogojene duševne manjrazvitosti pri moških. Izmed znanih genetskih napak, katerih spremljevalni pojav je duševna manjrazvitost, je najpogostejša trisomija kromosoma 21, fragilni kromosom X pa naj bi bil na drugem mestu (1). Prizadeti so lahko tako moški kot ženske, ženske navadno v blažji obliki. Prav tako so lahko tako moški kot ženske neprizadeti prenašalci oz. nosilci permutacije (2). Prevalenca FXS je pri moških med 1 primer bolezni na 4.000 in 1 na 6.000, v ženski populaciji je prevalenca približno za polovico manjša (3, 4). Prevalenca prenašalcev oziroma nosilcev permutacije je približno 1 primer na 750 moških in 1 primer na 250 pri ženskah (3).

FXS je na kromosom X vezana semidominantno dedna motnja z zmanjšano penetranco, ki ne sledi Mendlovemu vzorcu dedovanja (2). Najpogosteje opisana mutacija, ki povzroča fragilno mesto na kromosomu Xq27.3, je mutacija v genu FMR1 (5) in nastane zaradi prekomernega povečanja števila ponovitev trinukleotida CGG v eksonu 1. V splošni populaciji je ta lokus večinoma stabilen in ga sestavlja manj kot 40 ponovitev CGG ter prehaja iz generacije v generacijo brez pomembnih sprememb. Ker stabilnost števila ponovitev CGG ni absolutna, lahko v oocitih med mejozo pride do povečanja števila ponovitev, ki doseže intermediarno dolžino (45 do 54 ponovitev CGG) ali permutacijsko (55 do 200 ponovitev CGG). S pomnožitvijo ponovitev se zmanjša stabilnost, zato pričakujemo nadaljnje povečevanje števila ponovitev. Med mejozo v moških spolnih celicah do podobnih pomno-

žitev ne prihaja (4, 6). FXS lahko povzročijo tudi delecije, točkovne mutacije in nesmiselne mutacije v genu FMR1, a so ti vzroki redkejši (manj kot 1 odstotek) (3, 4, 7).

Razlikujemo med dvema klinično pomembnima ravnema pomnožitve CGG: polna mutacija (več kot 200 ponovitev CGG, kar vodi do metilacije in utišanja gena FMR1) ter odsotnost proteina FMRP, ki se odraža s klasičnim fenotipom za FXS. Pri permutaciji med 55 in 200 ponovitvami se gen FMR1 še izraža, tvori se protein FMRP in zato ni klasičnega fenotipa FXS, vendar pa je večje tveganje za prezgodnjo menopavzo pri ženskah in za sindrom tremor-ataksija pri moških (3, 4). Genetska napaka je dinamična, kar pomeni, da je število ponovitev nestabilno iz generacije v generacijo, zato je vzorec dedovanja težko napovedati. Tudi stopnja metilacije lokusa je v neposredni povezavi s klinično sliko FXS (1, 4, 8).

Na količino proteina FMRP tako pomembno vpliva: število ponovitev CGG (večje število ponovitev CCG je povezano z nižjo ravniyo FMRP), somatski mozaicizem (vezan na dolžino lokusa in metilacijski proces) in spol (ženske imajo en normalen in en mutirani gen FMR1) (6, 9).

Klinična slika

Klinična slika je odvisna od stopnje mutacije (polna mutacija ali permutacija) in metilacije, stopnje pomanjkanja proteina FMRP in od spola (3, 4). Moški s polno mutacijo so običajno pomembno prizadeti, pri ženskah s polno mutacijo pa je stopnja prizadetosti lahko zelo različna (3).

V klinični sliki prevladujejo kognitivne in vedenjske težave (10). Najpomembnejši klinični znaki so razvojni zaostanek (vključno z zapoznelim doseganjem razvojnih mejnikov na motoričnem in govornem področju), duševna manjrazvitost in učne težave, predvsem pri matematiki. Značilen je upad kognitivnih sposobnosti in prilagoditvenih vedenj-

skih veččin po zgodnjem otroštvu. Upad se kaže kot počasnejše pridobivanje novih veččin in ne kot upad že osvojenih veččin (1, 3, 11).

Vedenjski fenotip fantov s FXS si deli značilnosti z ADHD, anksioznostjo in s spektroatvistično motnjo (npr. hiperaktivnost, nepozornost, izogibanje očesnemu stiku, stereotipni gibi, kot so ploskanje, socialna anksioznost, ponavljanje besed in fraz) (3, 6). Izražene so lahko tudi plahost, depresija in nagnjenost k agresiji (1). 25–30 % otrok s FXS izpolnjuje diagnostična merila za avtizem, dodatnih 20 % pa tudi za pervazivno razvojno motnjo.

S sindromom FXS so povezani tudi telesni znaki, ki postanejo bolj očitni med puberteto: dolg in ozek obraz s poudarjenima čelom in brado (prognatija), velika ušesa in povečana moda z normalno funkcijo (prostornina več kot 25 mL po puberteti) – makro-orhidizem (1, 3).

Splošno sprejetih kliničnih diagnostičnih MERIL za testiranje FXS nismo zasledili, v Tabeli 1 pa povzemamo najpogosteje navedene klinične znake pri moških s FXS (1, 3, 4, 6, 10–12).

Pri dekletih je fenotip pri polni mutaciji fragilnega kromosoma X zaradi individualnih razlik v inaktivaciji fragilnega kromosoma X veliko bolj variabilen kot pri fantih (3, 11). Približno polovica deklet s polno mutacijo fragilnega kromosoma X je normalno intelektualno razvita, druga polovica pa ima navadno blažje znake od fantov. Možen je cel spekter kognitivnih, vedenjskih in telesnih znakov (3, 13). Kognitivna prizadetost je v tesni povezanosti s stopnjo (in)aktivacije fragilnega kromosoma X in ne z velikostjo pomnožitve (3).

Pri posameznikih s permutacijo obstajajo tri potencialna področja prizadetosti: prezgodnja menopavza pri ženskah (pri 20 % nosilk permutacije), sindrom tremor-ataksija po 50. letu starosti (pri tretjini moških s permutacijo, pri ženskah redkeje in v blažji obliki) ter blažje oblike nevrokognitivnega primanjkljaja (3, 6).

Diagnosticiranje

Pred odkritjem gena Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) leta 1991 se je za dokazovanje FXS uporabljala citogenetska analiza, ki je zaznala fragilno mesto na kromosomu Xq27.3. Omenjena kromosomska analiza se v diagnosticiranju FXS zaradi nižje občutljivosti in višje cene ne uporablja več, nadomestilo pa jo je molekularno diagnosticiranje (1, 4, 8). Danes diagnoza FXS sloni na molekularni genetski analizi, s katero določimo povečano oziroma spremenjeno število ponovitev tripleta CGG v regiji FMR1 (6). Analiza PCR zadošča za dokazovanje normalnih alelov, ki imajo do 50 ponovitev, in za izključitev diagnoze FXS pri večini preiskovancev. Pri diagnosticiranju tako standardno uporabljamo presejanje z metodo PCR, nato pa dodatno analiziramo vzorce, ki se s PCR niso pomnožili (pri moških) ali kažejo en alel (pri ženskah), z metodo po Southernu (5).

Metoda po Southernu je v večini referenčnih laboratorijev zlati standard molekularne diagnostike FMR1. Z njeno pomočjo lahko hkrati določimo velikost in metilacijsko stanje gena FMR1. Analiza Southern je tudi metoda izbire za dokončni izvid pri prenatalni diagnostiki. Metoda je dolgotrajna, zahtevna in relativno draga, njena pomanjkljivost pa je tudi slabo razločevanje med majhnimi permutacijami in velikimi intermediarnimi aleli, zato jo pogosteje uporabljamo kot potrditveno metodo in ne kot metodo za presejanje (5, 10).

V prispevku predstavljamo na PCR osnovano tehnologijo določanja prisotnosti normalnega števila trinukleotidnih ponovitev CGG v regiji FMR1, ki jo uporabljamo kot rutinsko diagnostično metodo v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor. Z omenjeno tehniko smo zaradi validacije opravili retrospektivno študijo na genetskem materialu moških preiskovancev iz severovzhodne Slovenije, ki so bili napoteni na testiranje zaradi nepojasnjene duševne manjrazvitosti in/ali displastičnih znakov ali suma na FXS z avtističnim vedenjem ali brez njega, ki so po dosedanjih genetskih preiska-

vah ostali brez pojasnjene diagnoze s pregledanim kariotipom in/ali s tehnologijo mikromrež.

MATERIALI IN METODE

Izbira preiskovancev

V raziskavo smo vključili genetski material 104 preiskovancev moškega spola, ki so bili v obdobju od leta 1999 do vključno leta 2011 obravnavani v Laboratoriju za medicinsko genetiko v UKC Maribor. Del preiskovancev smo že v okviru diagnostičnega postopka testirali na prisotnost mutacije za FXS, drugo skupino preiskovancev pa smo obravnavali in vključili v študijo o iskanju vzrokov za nepojasnjeno duševno manjrazvitost (študija MŠZŠ, št. L3-2145). Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije (št. 64/05/04). Vsi preiskovanci so imeli normalen kariotip in/ali pregledan genom s tehnologijo mikromrež (Agilent, 60K). Na genetske preiskave so bili napoteni zaradi suma na FXS (13 preiskovancev ali 12,5 %), zaradi nepojasnjene umske manjrazvitosti (IMR) (73 preiskovancev ali 70,2 %), displastičnih znakov (14 preiskovancev ali 13,5 %), kombinacije duševne manjrazvitosti z avtizmom (3 preiskovanci ali 2,9 %) in kombinacije duševne manjrazvitosti z dismorfniimi znaki (1 preiskovanec ali 1,0 %).

Analiza DNA na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Osamitev DNA smo opravili po standardiziranem laboratorijskem protokolu Laboratorija za medicinsko genetiko (SOP 75 GL 201, UKC MB) iz približno 5 ml periferne venske krvi preiskovancev. V primeru manjše količine izhodnega materiala ali osamitve iz citogenetske celične suspenzije smo za osamitev genomske DNA uporabili komercialni komplet reagentov (Invitrogene, QIAGEN) ali avtomatsko delovno postajo za osamitev nukleinskih kislin QIACUBE (QIAGEN). Količino in kakovost pridobljenega materiala smo ovrednotili spektrofotometrično (Eppendorf).

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo izvedli z uporabo začetnih oligonukleotidov FraXA-F (GC-TCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT) in FraXA-R (AGCCCCGCACTTCCACCACCAGC-TCCTCCA) (Sigma). Začetni oligonukleotidi so bili izbrani tako, da omogočajo pomnožitev specifičnega dela genomske DNA pri preiskovancu, če je bilo v izbranem odseku prisotno normalno število ponovitev CGG. Pripravljali smo 20-mikrolitrsko reakcijo, sestavljeno iz 2mM mešanice posameznih nukleotidov (dNTP Set 100mM, QIAGEN), pufra za PCR (10X Taq Buffer Fermentas), raztopine Q-Solution (Qiagen) ter encima Taq polimeraza (Taq DNA Polymerase, 5U/ul, Fermentas) ter dodane genomske DNA preiskovanca. Verižno reakcijo smo v 30 ciklih izvajali v termobloku (Eppendorf) pod naslednjimi pogoji: 30 sekund denaturacije pri 94 °C, 30 s pritrjevanja začetnih oligonukleotidov pri 62 °C, nato še 60 s podaljševanja nove verige pri 72 °C.

Pri povprečni dolžini 20 ponovitev tripleta je kot produkt PCR pomnožitve nastal segment dolžine 281bp. Sum na prisotnost povišanega števila pono-

vitev smo postavili ob izpadu pomnoževanja verižne reakcije s polimerazo za FXS in če se je preiskovančeva genomska DNA uspešno pomnožila v kontrolni reakciji PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen GNB3 (ref PMID: 10978395). Potrjevanje mutacije FraXA z analizo Southern blot smo tako opravili le pri tistih vzorcih, pri katerih pomnoževanje po protokolu zaFXS ni bilo uspešno.

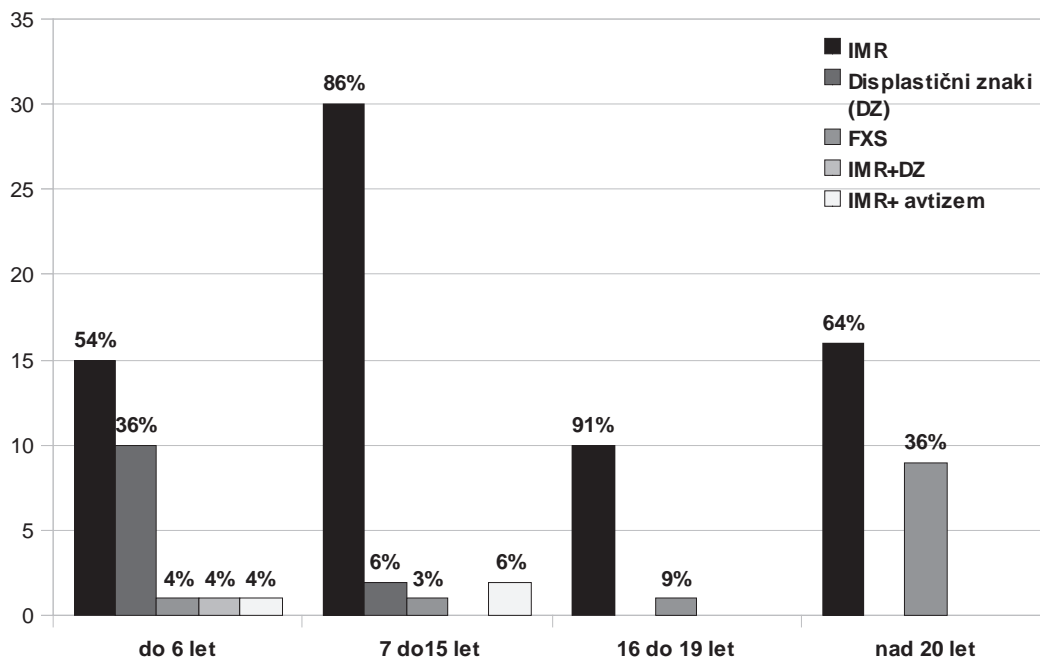
Rezultate po PCR smo ovrednotili z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabljali smo 3-odstotni gel, elektroforezo pa smo izvajali 10 minut pri napetosti 160V.

REZULTATI

Preiskovanci

Z metodo PCR smo uspešno testirali 99 od izbranih 104 vzorcev (95,2 %). Povprečna starost 99 preiskovancev ob vključitvi v raziskavo je bila 17,11 let (najmanj 10 mesecev in največ 85 let). Razdelili

Slika 1. Starostne skupine in napotne diagnoze genetskega materiala preiskovancev (n=99), vključenih v testiranje za FXS.
Figure 1. Age groups and referral diagnoses of subjects (n = 99) included in the testing for FXS.



smo jih v štiri starostne skupine: predšolski otroci (do 6 let), osnovnošolci (7–15 let), srednješolci (16–19 let) in odrasli (starejši od 20 let). V raziskavo smo zajeli 28 predšolskih otrok, 35 osnovnošolcev, 11 srednješolcev in 25 odraslih preiskovancev.

Večina predšolskih otrok je bila na preiskave napotena pod diagnozo nepojasnjena duševna manjrazvitost (15/28 ali 53,6 % predšolskih preiskovancev) ali zaradi diagnoze displastični znaki (10/28 preiskovancev ali 35,7 %). Pri osnovnošolcih in srednješolcih je prevladovala napotna diagnoza nepojasnjena duševna manjrazvitost (85,7 % od 35 osnovnošolskih in 90,9 % od 11 srednješolskih otrok). Pri odraslih preiskovancih je bil najpogostejši vzrok napotitve nepojasnjena duševna manjrazvitost (16 preiskovancev ali 64,0 % vseh odraslih preiskovancev), ostali so bili napoteni neposredno na testiranje za FXS (10 preiskovancev ali 36,0 % vseh odraslih preiskovancev) (Slika 1).

Diagnosticiranje s PCR

Od 104 genomskih DNA preiskovancev, ki smo jih vključili v molekularno genetsko testiranje za FXS, pri 5 vzorcih (4,81 %) pomnoževanje za FXS in kontrolni fragment ni bilo uspešno zaradi slabe kakovosti DNA.

Od 99 uspešno izvedenih analiz PCR smo pri 98 preiskovancih (98,99 %) izključili prisotnost muta-

cije ali permutacije: po agarozni elektroforezi smo dokazali prisotnost fragmenta velikosti 281bp, ki je nastal kot rezultat uspešnega pomnoževanja s PCR (Slika 2, vzorec FX3, FX4).

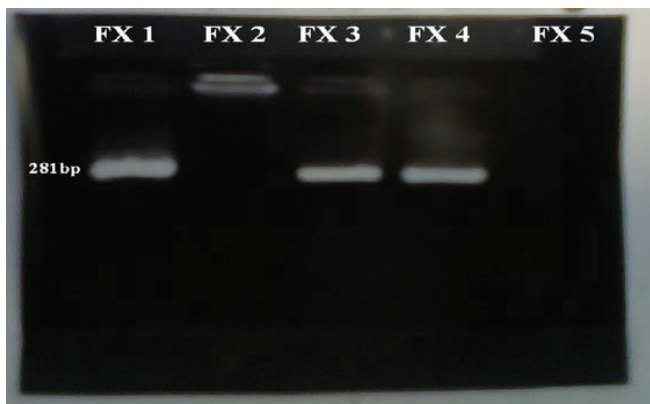
Pri enem preiskovancu (1,01 % od 99) smo lahko postavili sum na FXS zaradi odsotnosti specifičnega fragmenta FXS, pri čemer smo preverili kakovost genomske DNA in ugotovili, da je ustrežna (Slika 2).

Vzorec, pri katerem smo postavili sum na FXS (Slika 2), smo za potrditev mutacije v genu FMR1 poslali na dodatne analize s tehnologijo Southern blot, s katero smo potrdili povečano število tripletov CGG in s tem mutacijo v eksonu 1 gena FMR.

FXS smo dokazali pri 5-letnem fantu, ki je bil na preiskave s strani izbranega pediatra napoten z diagnozo displastičnih znakov (makrocefalija, prominentno čelo, širši nosni koren, mikrognatija). Iz družinske anamneze je bilo razvidno, da je duševna manjrazvitost prisotna pri materinem sorodstvu (dve mamini sestri z blažjo obliko DM) in pri očetovem (bratrančev 9-letni otrok z diagnozo idiopatska duševna manjrazvitost).

RAZPRAVLJANJE

Klinično in molekularno diagnosticiranje FXS se je od prvih opažanj, ko so prepoznali družinsko pogojeno in na spol vezano obliko duševne manj-



Slika 2. Rezultati diagnosticiranja FXS po metodi PCR (verižna reakcija s polimerazo) (FX1, FX2, FX3, FX4, FX5 = vzorci preiskovancev; FX1 = kontrolni vzorec z normalnim številom ponovitev (prisoten signal – izključena mutacija FraXA); FX2 = vzorec, kjer PCR reakcija ni potekla (možna prisotna mutacija); FX3, FX4 = vzorca z normalnim številom ponovitev, enako z FX1; FX5 = kontrola brez genomske DNA).

Figure 2. The results of the PCR-method for the diagnosis of FXS (FX1, FX2, FX3, FX4, FX5 = patient samples; FX1 = control sample with a normal number of repeats (the signal is present - FraXA mutation excluded) FX2 = pattern where the PCR reaction has not proceeded (possible presence of mutation), FX3, FX4 = samples with a normal number of repeats, equal to the FX1; FX5 = the PCR sample without genomic DNA).

razvitosti, zelo izboljšala. Biološke osnove FXS so pojasnili z odkritjem gena FMR1 leta 1991. Takrat so opisali tudi značilnosti tripleta CGG na 5'-koncu gena FMR1 in njegovo intergeneracijsko nestabilnost.

Na osnovi opisanih lastnosti gena FMR1 smo v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor razvili na PCR osnovano tehniko določanja prisotnosti normalnega števila tripletov CGG, ki je uporabna pri preiskovancih moškega spola in pri heterozigotnih ženskah. Uporabljeno metodo PCR sicer lahko uspešno uporabimo le za dokazovanje normalnih različic zaporedja trinukleotidov v eksonu 1 gena FMR1 na lokusu FRAXA. S testom izključimo obstoj FXS pri preiskovani osebi oz. prenašalstvo mutacije, ne moremo pa z uporabljeno metodo PCR zanesljivo dokazati povečanega števila trinukleotida CGG pri polni mutaciji (>200 ponovitev) oz. pri permutaciji (55–200 ponovitev). Takšna tehnologija sicer omogoča le posredno sklepanje o potencialnem obstoju mutacije v genu FMR1, je pa učinkovito vodilo pri odločanju o nadaljnjem testiranju preiskovančevega genetskega materiala z zahtevnejšo, dolgotrajnejšo in dražjo metodo po Southernu.

S tehnologijo PCR smo z namenom validacije opravili retrospektivno študijo na genetskem materialu 104 moških preiskovancev iz severovzhodne Slovenije, ki so bili obravnavani v genetskem laboratoriju v starosti od 5 mesecev do 85 let. Na genetsko testiranje so bili napoteni zaradi nepojasnjene duševne manjrazvitosti in/ali displastičnih znakov ali suma na FXS z avtističnim vedenjem ali brez njega. S klasično citogenetsko analizo in tehnologijo mikromrež (60K, Agilent) pri njih nismo našli genetskega vzroka ali pojasnili njihove diagnoze.

Učinkovitost vpeljane metode PCR je bila 95,2 %: pri 5/104 preiskovancev zaradi slabe kakovosti genetskega materiala tehnika ni bila uspešna. Izmed 99 uspešno opravljenih analiz PCR smo pri 98 preiskovancih (98,99 %) potrdili prisotnost normalnega števila ponovitev tripleta CGG in tako izključili ob-

stoj prave mutacije ali permutacije v eksonu 1 gena FMR1 na lokusu FRAXA. Pri enem preiskovancu (1/99 ali 1,01 %), predšolskem otroku z displastičnimi znaki, smo postavili sum na prisotnost mutacije. S kasnejšo analizo (Southern blot) smo dokazali povečano število tripletnih ponovitev CGG in tako potrdili sindrom FXS. Rezultat analize po Southernu je potrdil negativen rezultat presejalne analize PCR še pri 12 preiskovancih. Možnost lažno negativnega rezultata analize PCR pri ostalih preiskovancih je zanemarljiva. Vsaka analiza je namreč vedno vključevala kontrolni vzorec z vsemi sestavinami za reakcijo PCR, vendar brez genomske DNA, in kontrolni vzorec z DNA z mutacijo gena FMR1. Odsotnost pomnoževanja in signala na gelu smo ugotovili brez izjeme pri vseh kontrolnih vzorcih, kjer ga nismo pričakovali.

Rezultati naše retrospektivne študije so skladni s stopnjo pozitivnih rezultatov, ki so navedeni v literaturi. Čeprav FXS omenjajo kot najpogostejši vzrok dedne oblike duševne manjrazvitosti (1), večina novejših študij navaja nizko stopnjo pozitivnih rezultatov: z molekularnogenetskimi testi so odkrili 0,6–1 % moških preiskovancev s polno mutacijo (10). V kombinirani študiji iz Velike Britanije, ZDA, Avstralije in Nizozemske navajajo, da so v skupini 4670 oseb z DM odkrili 0,6 % bolnikov, nosilcev mutacije v genu FraX (5, 10).

Specifičnost tehnologije odkrivanja bolnikov s FXS sicer lahko izboljšamo s poostreno predhodno izbiro bolnikov glede na značilne klinične znake, a je to v praksi težko, saj je klinična slika pri mlajših bolnikih (pred puberteto) manj značilna. Je pa zgodnje diagnosticiranje FXS izrednega pomena za vso družino, predvsem zaradi prenatalnega svetovanja (5). Molekularnogenetsko diagnosticiranje FXS z analizo PCR tako priporočamo pri osebah z nepojasnjeno duševno manjrazvitostjo, pri razvojnem zaostanku, avtizmu, pri ženskah s prezgodnjo menopavzo in pri sindromu tremor-ataksija ali pri pozitivni družinski anamnezi za omenjena stanja (3). Družine, v katerih smo odkrili bolnika, napotimo na genetsko svetovanje (14).

Na osnovi lastnih izkušenj zaključujemo, da je tehnologija odkrivanja FXS, osnovana na PCR, uporabna kot preliminarno orodje oz. kot test, ki lahko ovrže sum na prisotnost omenjene mutacije pri testirani osebi. Analiza mutacije na osnovi PCR je namreč hitrejša in cenejša ter zahteva minimalni vzorec DNA. Število ponovitev CGG lahko natančno določimo oz. ocenimo v primeru normalnega števila ponovitev ali v primeru permutacije z nižjim številom ponovitev. Z opisano metodologijo pa kljub temu še ne moremo določiti polne mutacije, saj je daljše ponovitve težje ali celo nemogoče pomnožiti. Tudi v primerih žensk, nosilk homozigotnih alelov gena FMR1, ostaja tehnologija po Southernu najbolj zanesljiva metoda (1, 6).

Tabela 1. Klinični znaki pri moških s FXS (1, 3, 4, 6, 10, 11).

Table 1. Clinical manifestations in males with FXS (1, 3, 4, 6, 10, 11).

KOGNITIVNI ZNAKI	razvojni zaostanek na motoričnem in govornem področju, duševna manjrazvitost
VEDENJSKI ZNAKI	značilnosti ADHD, značilnosti spektroatistične motnje
TELESNI ZNAKI (bolj očitni med puberteto)	dolg in ozek obraz, poudarjena čelo in brada, velika štrleča ušesa, povečana moda (makroorhidizem), hipotonija, hiperlaksni sklepi, škiljenje, prolaps mitralne zaklopke, mehka koža, ploska stopala

LITERATURA

- Jewell JA. Fragile X Syndrome. eMedicine Pediatrics: Genetics and Metabolic Disease Articles (on line) 2011 (citirano 9. november 2011). Dosegljivo na: <http://emedicine.medscape.com/article/943776-overview>
- Chowdhury MR, Kabra M, Sharma D, Singh D, Dabral A, Thelma BK et al. Fragile X screening for FRAXA and FRAXE mutations using PCR based studies: Results of a five year study. Indian J Hum Genet [serial online] 2006; 12: 17-22. Dosegljivo na: <http://www.ijhg.com/text.asp?2006/12/1/17/25297>
- Van Esch H. Clinical features and diagnosis of fragile X syndrome in children and adolescents. UpToDate. (on line) 2011 (citirano 9. november 2011). Dosegljivo na: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-fragile-x-syndrome-in-children-and-adolescents>
- Saul RA, Tarleton JC. FMR1-related disorders. GeneReviews (on line) 2011 (citirano 9. november 2011) Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>
- Macpherson J, Sawyer H. Practice Guidelines for molecular diagnosis of Fragile X Syndrome. Clinical Molecular Genetics Society (on line) 2005 (citirano 9. november 2011). Dosegljivo na: <http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs%20current%20bpgs/Fragile%20X.pdf>
- Wilkins-Haug L. Prenatal screening and diagnosis for fragile X syndrome. UpToDate. (on line) 2011 (citirano 9. november 2011). Dosegljivo na: <http://www.uptodate.com/contents/prenatal-screening-and-diagnosis-for-fragile-x-syndrome>
- Dosegljivo na: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FMR1>
- De Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. J Med Genet 1998; 35: 579-89.
- Loesch DZ, Huggins RM, Hager RJ. Phenotypic Variation and FMRP Levels in Fragile X. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 2004; 10: 31-41. Dosegljivo na: <http://www.uth.tmc.edu/clinical-neuro/institute/2005/RHagerman/Loesch%20Phenotypic%20variation%20in%20FMRP%20levels.pdf>
- Rousseau F, Labelle Y, Bussi eres J, Lindsay C. The Fragile X Mental Retardation Syndrome 20 Years After the FMR1 Gene Discovery: an

- Expanding Universe of Knowledge. Clin Biochem Rev 2011; 32(3): 135–62. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157949/?tool=pubmed>
11. Visootsak J, Warren ST, Anido A, Graham JM Jr. Fragile X Syndrome: An Update and Review for the Primary Pediatrician. Clin Pediatr (Phila) 2005; 44: 371–381. Dosegljivo na: http://www.fragilex.org/pdf/FXSclinical_pediatrics.pdf
 12. Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. European Journal of Human Genetics 2008; 16: 666–72. Dosegljivo na : <http://www.nature.com/ejhg/journal/v16/n6/abs/ejhg200861a.html>
 13. McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A, Abrams L, Bennett RL, Pettersen BJ. Genetic counseling for fragile x syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. J Genet Couns. 2005; 14(4): 249-70. Dosegljivo na: <http://www.springerlink.com/content/r54356r13r0740u7/fulltext.pdf>
 14. Van Esch H. Management of children and adolescents with fragile X syndrome. UpToDate. (on line) 2011 (citirano 3. november 2011); Dosegljivo na: <http://www.uptodate.com/contents/management-of-children-and-adolescents-with-fragile-x-syndrome>

Kontaktna oseba / Contact person:

Alenka Erjavec Škerget, dr. sci, univ. dipl. biol.,
Laboratorij za medicinsko genetiko
Klinika za ginekologijo in perinatologijo
Univerzitetni klinični center Maribor
Ljubljanska 5
SI-2000 Maribor
Slovenija
E-mail: alenka.erjavec@ukc-mb.si

Prispelo / Received: 28. 2. 2012

Sprejeto / Accepted: 22. 3. 2012