

## Frajil X Sendromu: Moleküler ve Klinik Genetik Yönleri

Fragile X Syndrome: Molecular and Clinical Genetics Aspects

Elçin Latife KURTOĞLU<sup>1</sup>, Emine DEMİRAL<sup>2</sup>, İbrahim TEKEDERELİ<sup>3</sup>

### ÖZ

Frajil X Sendromu, kalıtlılabılır zeka geriliğinin en sık sebebidir. Tüm zihinsel gerilik nedenleri arasında da Down Sendromu'ndan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Etyolojisinde, X kromozomunun q27.3 bölgesinde bulunan frajil X mental retardasyon 1 (*FMRI*) geninin 5' ucunda translasyon olmayan bölgedeki CGG üçlü nükleotid tekrar sayısının artışı rol oynamaktadır. Bu tekrar artışı aynı zamanda, sitogenetik çalışmalarla gösterilebilen, Xq27.3 bölgesinde kırılmağa yol açmaktadır. Hastalık fenotipi, kuşaklar arasında ve cinsiyete göre farklılık gösterebilmektedir. Tanısında farklı sitogenetik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada Frajil X sendromunun epidemiyolojisi, klinik özellikleri, tanı yöntemleri ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Frajil X Sendromu, Martin Bell Sendromu, Üçlü Nükleotid Tekrar Artışı

### ABSTRACT

Frajil X Syndrome is the most common cause of inherited mental retardation and the second among all intellectual disability causes after Down Syndrome. The increase in the repeat number of CGG triplet nucleotides in the untranslated region at the 5' end of the fragile X mental retardation 1 (*FMRI*) gene located in the q27.3 region of the X chromosome plays role in the etiology. This repeat increase also leads to fragility in the Xq27.3 region, which can be demonstrated by cytogenetic studies. The disease phenotype may vary between generations and genders. Different cytogenetic and molecular methods are used in the diagnosis. In this study, epidemiology, clinical features, diagnostic methods of Frajil X Syndrome is reviewed.

**Keywords:** Fragile X Syndrome, Martin Bell Syndrome, Trinucleotide Repeat Expansion

<sup>1</sup>Dr. Öğr. Üyesi, Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, ORCID: 0000-0002-8375-8399

<sup>2</sup>Uzm.Dr. Tıbbi Genetik Uzmanı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, ORCID: 0000-0002-7216-662X

<sup>3</sup>Prof. Dr. Tıbbi Genetik Uzmanı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, ORCID: 0000-0002-3300-8020

**İletişim / Corresponding Author:** İbrahim TEKEDERELİ

**Geliş Tarihi / Received:** 26.02.2018

**e-posta/e-mail:** ibrahim.tekedereli@inonu.edu.tr

**Kabul Tarihi/Accepted:** 12.12.2018

## GİRİŞ

Frajl X Sendromu (FXS) ailesel zeka geriliğinin en sık sebebidir. Tüm zihinsel gerilik nedenleri ele alındığında Down Sendromu'ndan sonra ikinci sırada yer almaktadır<sup>1,2</sup>. Down sendromu sıklıkla *de novo* meydana gelirken Frajl X sendromu her zaman taşıyıcı ya da etkilenmiş bireylerden sonraki kuşağa geçmektedir. Bu nedenle FXS, ailevi zihinsel geriliğin olduğu olgularda önemli yer tutmaktadır. Etiyolojide, X kromozomunda yer alan *FMR1* geninin 5' bölgesinde translyasyona uğramayan bölgedeki CGG tekrar sayısı artışı yer almaktadır. Sendromun neden olduğu bazı fenotipik özellikler moleküler temele bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir<sup>2</sup>. FXS ilk kez 1943 yılında Martin ve Bell tarafından 11 zihinsel geriliği olan erkek ve 2 hafif zihinsel geriliği olan dişi olgunun yer aldığı geniş bir ailede tanımlanmıştır<sup>2,3</sup>. Yaklaşık 40 yıl sonra gelişen sitogenetik tekniklerle, bu aile üyelerinin analiz edilmesi sonucu X kromozomundaki kırılğan bölgenin gösterilmesi ile tanı konmuştur<sup>4</sup>.

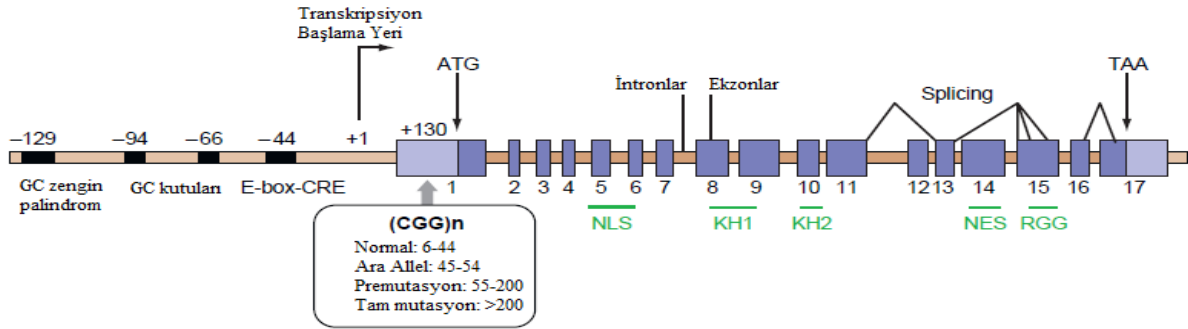
### Epidemiyoloji

FXS'nun dünya üzerinde ortalama görülme sıklığı, erkeklerde yaklaşık 1/3600, kadınlarda ise 1/4000-6000'dir. Premutasyon taşıyıcı sıklığı ise kadınlarda 1:130-200 iken erkeklerde 1:250-450 olarak bildirilmiştir<sup>2,5</sup>. Ancak FXS sıklığı, coğrafi bölgelere ve ırklara göre değişim göstermektedir. Özel eğitim ihtiyacı olan çocuklar arasında yapılan bir çalışmada Avrupa kökenli erkeklerde FXS'nin 1/3717, Afrika kökenli Amerikalı erkekler arasında 1/2545 sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir<sup>5</sup>. Farklı ülkelerde zihinsel yetersizlik nedeni ile tetkik edilen ve FXS saptandığı bildirilen olguların sonuçları şu şekilde özetlenebilir: Avustralya ve Büyük Britanya (%4,3), Brezilya (%2), Şili (%5), Çin (%2,8), Kıbrıs ve Yunanistan (%0,9), Finlandiya (%5,4), Hollanda (%4,2), Endonezya (%2,4), Japonya (%2,1), Meksika (%4,1), Porto Riko (%3) ve Birleşik Devletler (%1,1- %6)<sup>4</sup>. Ülkemizde

premutasyon taşıyıcısı ve etkilenmiş olguların, genel populasyondaki oranları tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu konuda yapılan çalışmalardan Tunçbilek ve arkadaşlarının zihinsel gerilik nedeni ile değerlendirdikleri 179 kişilik olgu grubunda (13 dişi ve 166 erkek olgu) 5 erkek olguda tam mutasyon saptandığı bildirilmiştir<sup>6</sup>. Demirhan ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, zihinsel gerilik, konuşma geriliği, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ve gelişim geriliği tanısı alan 120 olguda yaptıkları kromozom analizi ile olguların 14'ünün (%11,7) FXS olduğu belirlenmiştir<sup>7</sup>. Bilgen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise klinik olarak FXS tanısı ile uyumlu olan 95 erkek ve 2 dişi olgu, moleküler yöntemlerle (uzun PCR ve *southern blot*) analiz edilmiştir. Çalışmaya olguların risk altındaki akrabaları da dahil edilmiş ve sonuç olarak 10 olguda FXS tanısı kesinleştirilmiştir<sup>8</sup>.

### FMR1 (Fragile X Associated Mental Retardation 1) Geni

*FMR1* geni, Xq27.3 bölgesinde yerleşmiş olup, etkilenmiş olgularda sitogenetik olarak gözlenen, folata duyarlı kırılğan bölge olan FRAXA frajl alanına karşılık gelmektedir<sup>9</sup>. *FMR1* geni, insan, fare, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* ve tavuktaki varlığı ile kanıtlandığı üzere dizi ve amino asit seviyesinde oldukça korunmuştur<sup>3</sup>. *FMR1* geni 17 ekzon içermekte ve yaklaşık olarak 38 kb büyüklüğündedir (Şekil 1)<sup>3,9,11</sup>. Alternatif ayıklanma (*splicing*) ile farklı transkriptler üretilmekle birlikte, 80 kDa moleküler büyüklüğünde ve maksimum 632 amino asit uzunluğunda bir proteini şifreleyen 4,4 kb büyüklüğünde bir mRNA kodlamaktadır<sup>10,11</sup>. Translyasyon başlama yeri, genin 1. ekzonu içinde 5' ucunda translyasyona uğramayan bölge (*untranslated region*, UTR) içindeki CGG tekrar bölgesinin 69 bç (baz çifti) aşağısında yer almaktadır<sup>11</sup>.



Şekil 1. *FMRI* Geninin Şematik Görünümü<sup>11</sup>.

*FMRI* promotor bölgesi, CGG tekrar bölgesinin 250 bç yukarısında zengin bir CpG adası içerir ancak doğal bir TATA kutusuna sahip değildir<sup>11,12</sup>. CGG tekrarlarının 134 bç yukarısında tek nokta olmasa bile ağırlıklı olarak kabul edilen bir transkripsiyon başlama alanı tanımlanmıştır<sup>12</sup>. *FMRI* geninin transkripsiyonel olarak inaktif olduğu durumda promotor bölgede bir palindrom, iki GC-box benzeri diziler ve bir üst üste binen E-box-cAMP response element (CRE) alanını içeren dört transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi olduğu gösterilmiştir<sup>11</sup>. *FMRI* ifadesinin pozitif regülasyonunda, *FMRI* promotoru içindeki USF1/USF2 ve  $\alpha$ -Pal/Nrf-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlandığı gösterilmiştir<sup>11,12</sup>.

### ***FMRI* Geni CGG Trinükleotid Artışları**

CGG tekrar dizileri *FMRI* geninin 1. ekzonunda, 5' translyasyona uğramayan bölgesinde yer almaktadır ve trinükleotid tekrar genişleme mutasyonlarının ilk örneğini teşkil etmektedir<sup>13,14</sup>. *FMRI* polimorfik CGG tekrarı, tekrarın boyutuna göre en az dört biçimde kategorize edilebilir<sup>3</sup>. Genel populasyonda 6-44 CGG tekrar ve bir promotor gibi rol oynayan metillenmemiş komşu CpG adaları içeren alleller normal kabul edilir ve sonraki kuşağa aktarımda kararlı kalırlar. Normal aralıktaki allellerin ikinci üst sınıfı 45-54 CGG tekrarı içermektedir. Gri bölge ya da 'intermediate' allel olarak bilinen bu aralık kararlı ya da hafif kararsız olabilmekte ve eğer AGG kesintileri yoksa sonraki

nesillere genişleyerek aktarılma olasılığını taşımaktadırlar. Bir diğer sınıf 55 ila 200 arasındaki uzunlukta CGG tekrarı içeren premutasyon taşıyıcılığıdır. Bu durumda *FMRI* geni transkribe olmakta ve translyasyona uğramaktadır ve CpG adaları metillenmemiştir. Ancak premutasyon taşıyıcıları normal ya da azalmış frajil X mental retardasyon proteinine (FMRP) sahiptirler ve mRNA seviyeleri normal allellere göre 2-8 kat artmış durumdadır. Bu bireyler FXS açısından sıklıkla asemptomatiktirler. Premutasyon taşıyıcıları, CGG tekrar sayılarının stabil olmaması ve her hücre bölünmesiyle artma eğiliminde olması nedeniyle etkilenmiş çocuk sahibi olma riski taşımaktadırlar<sup>15</sup>. Ayrıca premutasyon allel taşıyıcıları frajil X ilişkili prematür ovaryan yetmezlik (*Fragile X-associated premature ovarian insufficiency*, FXPOI), frajil X-ilişkili tremor/ataksi sendromu (*Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*, FXTAS) ve duygusal bozukluklar gibi bazı hastalıkların gelişme riskine sahiptirler<sup>15, 16</sup>. Bunun nedeni ise *FMRI* mRNA seviyelerinde artma ve CGG tekrar aracılı RNA toksisitesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir<sup>16</sup>. CGG sayısı 200'den fazla olduğunda bu tam mutasyon aralığındadır. CpG adası ve tekrarlar metillenir ve bu metilasyon geni kapatır, transkripsiyonu bloke eder ve FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) proteini üretilmez<sup>15</sup>. Tam mutasyona sahip erkek bireyler her zaman FXS'den etkilenirken, X inaktivasyonu (Lyonizasyon veya Lyon hipotezi) nedeniyle tam

mutasyon taşıyıcısı dişilerin yalnızca %30-50'si FXS kliniği gösterir<sup>15,17</sup>. Bazı durumlarda, erkek olgular FMRP ifadesi bakımından mozaik olabilirler. Erkeklerdeki mozaik ise CGG tekrar sayısı ve/veya FMRP ifadesiyle negatif olarak ilişkili olan, *FMR1* promotorunun metilasyon derecesi sonucu ortaya çıkmaktadır<sup>17</sup>. Sonuç olarak, FXS'nin klinik bulguları, bir mozaikliğin varlığına, tam mutasyona uğramış allelin farklı metilasyon seviyelerine veya dokularda farklı FMRP ekspresyonuna yol açan X inaktivasyonuna göre değişebilmektedir<sup>15</sup>.

### ***FMR1* Genindeki Diğer Mutasyonlar**

Trinükleotid tekrarı genişlemesi FXS'nin en yaygın nedeni olmasına karşın, *FMR1* gen ifadesini ya da protein fonksiyonunu bozan diğer mutasyonlar da sendromun ortaya çıkmasına yol açabilmektedir<sup>10,17</sup>. Genin bir bölümünü veya tamamını etkileyen ve 1,6 kb'dan 13 Mb'a kadar değişen 15'ten fazla delesyon belirlenmiştir. Delesyonların yanı sıra fonksiyonel olmayan protein ürünü nedeniyle FXS fenotipine yol açan nokta mutasyonları da tanımlanmıştır<sup>11</sup>. De Boulle ve arkadaşları bir hastanın *FMR1* geninde yanlış anlamlı (missense) mutasyon (I304N) olduğunu saptamışlardır. Bu hasta CGG tekrar uzunluğu ve metilasyon bakımından normaldir fakat FXS fenotipinin birincil nedeni olan fonksiyonel FMRP'nin kaybı nedeniyle FXS fenotipine sahiptir<sup>18</sup>. Bu mutasyon FMRP'nin mRNA bağlama domainine lokalize olmuştur ve translasyonu düzenleme yeteneğini bozmaktadır<sup>17</sup>. Collins ve arkadaşları ise yaptıkları bir çalışmada, *FMR1* geninde CGG tekrarının 220 baz yukarısında FMRP ifadesinin yokluğuna neden olan bir delesyon saptamışlardır<sup>10</sup>.

### ***FMR1* Geninde Epigenetik Değişiklikler**

*FMR1* geninin sessizleştirilmesinde, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi çeşitli epigenetik

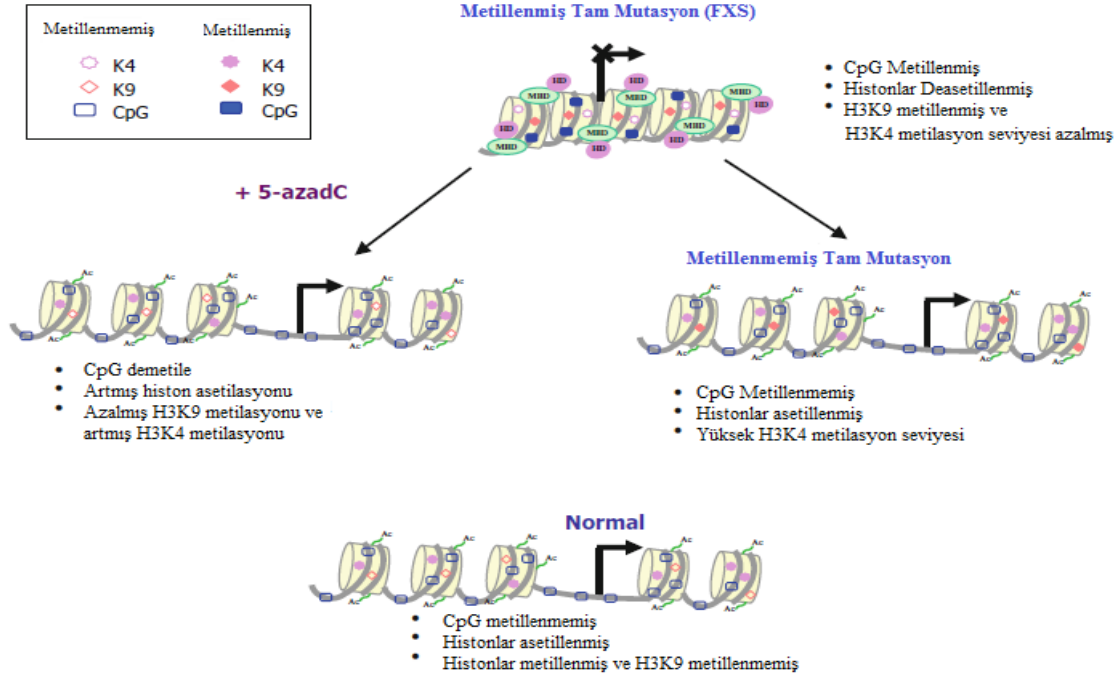
mekanizmaların rol aldığı bilinmektedir. Sessiz tam mutasyon allelleri, transkripsiyonel olarak aktif ve açık bir ökromatik konfigürasyona göre karakterize edilen normal allellerle karşılaştırıldığında, transkripsiyona izin vermeyen bir heterokromatik yapıya sahip olduğu görülmektedir. Genellikle aktif transkripsiyondan transkripsiyonel sessizleşmeye geçiş, CGG tekrar genişlemesinin 200'ün üzerinde olması ve bunun sonucunda meydana gelen epigenetik değişikliklerle ortaya çıkmaktadır<sup>19</sup>. CGG tekrar genişlemesinin 200'ün üzerinde olduğu tam mutasyon allelleri metillenmediği sürece *FMR1* transkripsiyonu devam etmektedir<sup>19</sup>. Transkripsiyonel olarak aktif olan normal alleller histon asetilasyonu, H3K4 metilasyonu ve H3K9 demetilasyonu ile karakterize edilirken, transkripsiyonel olarak inaktif bir heterokromatin yapısına sahip FXS allellerinin epigenetik kodu, histon H3 ve H4 histon deasetilasyonu, lizin 4 (H3K4) metilasyonunun düşük seviyesi ve lizin 9 (H3K9) metilasyonunun yüksek seviyesi gibi histon modifikasyonlarını içermektedir<sup>19,20</sup>. FXS allellerinin epigenetik modifikasyonları,  $\alpha$ -PAL gibi transkripsiyonel faktörlerin bağlanmasını önleyerek *FMR1* geninin sessizleşmesine neden olmaktadır. *FMR1* genindeki epigenetik değişimler geri çevrilebilir olduğundan, FXS hücre hatlarının demetilasyon ajanı 5-aza-deoksisisitidin (5-AzadC) ile muamele edilmesi transkripsiyonun ve translasyonun yeniden kurulmasıyla sonuçlanır. Histon deasetilaz inhibitörleri (TSA, bütirat ve 4-fenilbütirat) ile tedavinin 5-azadC'nin etkisini güçlendirdiği belirlenmiştir (Şekil 2)<sup>20</sup>.

### **Frajl X Mental Retardasyon Proteini (FMRP)**

Frajl X Mental Retardasyon Proteini (FMR proteini, FMRP), *FMR1* geni tarafından kodlanan ve spesifik hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonunu engelleyen bir proteindir<sup>15,17,21</sup>. FMRP, omurgalılar arasında yaygın olarak bulunur

ve evrimsel olarak korunmuştur<sup>21</sup>. Gelişimin erken dönemlerinde gerekli olmakla birlikte postnatal yaşam boyunca beyinde nöronların sitoplazmasında ve spermatogoniumda oldukça yüksek seviyede ifade edilmektedir<sup>15,17</sup>. Ayrıca,

yumurtalıklarda, özefagus epitelinde, timusta, gözde ve dalaktaki ifadesiyle hem insan hem de fare embriyolarında geniş ölçüde ifade edildiği belirlenmiştir<sup>3,21</sup>. FMRP büyük ölçüde sitoplazmada bulunmaktadır<sup>15</sup>.



Şekil 2. Normal, Metillenmiş ve Metillenmemiş Tam Mutasyon Allellerindeki Epigenetik Değişikliklerin Şematik Gösterimi. MBD: Metil Bağlayan Domain, HD: Histon Deasetilazlar<sup>20</sup>.

FMRP, RNA interferansı da (RNAi) içeren mRNA metabolizmasında yer alan çeşitli sitoplazmik ve nükleer proteinlerle etkileşime girebilir ve homodimerler oluşturabilir<sup>19</sup>. *In vitro* deneylerde fetal insan beyindeki FMRP'nin, tüm mRNA'nın yaklaşık olarak %4'üne bağlandığı ve bu hedeflerin protein sentezini baskıladığı gösterilmiştir<sup>11,15,17</sup>. Dendritlerin normal gelişiminde ve sinapslarda temel bir rol oynamaktadır. Sağlıklı nöronlarda FMRP sayısız sinaptik proteinin lokal translasyonunu düzenlemektedir<sup>15</sup>. Nöronlarda FMRP'nin kaybı, aşırı bazal protein translasyonuna ve sonuç olarak zihinsel fonksiyonlarda bozulmaya yol açar<sup>15,17</sup>. Alternatif ayıklanma özellikle genin 3' ucunda 12, 14, 15 ve 17. ekzonda ortaya çıkar ve bu da potansiyel olarak 67-80 kDa arasında 12

farklı protein izoformunun üretilmesine neden olur<sup>11,21</sup>. Farklı dokularda aynı ifade kalıbı gözlenmektedir<sup>11</sup>. FMRP, RNA-bağlanma proteinlerinin karakteristik motifleri olan iki ribonükleoprotein K protein homoloji domaini (KH domainleri) (ekzon 8 ve 10'da) ve bir arjinin ve glisin rezidülerinin (RGG kutuları) kümesini (ekzon 15'de) içerir<sup>3,21</sup>. Ek olarak, FMRP, nükleus ve sitoplazma arasında gidip geldiğini gösteren, protein-protein etkileşiminde yer alan, 1-5. ekzonda bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve bir nükleer eksport sinyali (NES) içermektedir<sup>11,21</sup>.

### Klinik Bulgular

FXS kliniği cinsiyete (X kromozom sayısına), CGG tekrar sayısına ve metilasyon derecesine bağlı olarak üretilen

FMRP miktarına göre değişiklik gösterebilir. FXS'nun uzun yüz, belirgin kulaklar ve belirgin-çukuk çene ile karakterize yüz görünümüne eşlik eden makroorşidizm gibi bulguları puberte döneminde ortaya çıkar ve zamanla belirginleşmektedir. Ancak yenidoğan döneminden itibaren spesifik olmayan klinik bulgular saptanabileceği göz önüne alınmalıdır.

### **Tam Mutasyona Sahip Erkek Olgular**

Fenotipik bulgular ve bulguların şiddeti puberte dönemine göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle olguların değerlendirilmesinde yaş ve pubertal evrenin göz önüne alınması gerekmektedir.

### **Fizik Muayene Bulguları**

Olguların büyüme (boy ve kilo) eğrileri sıklıkla normaldir. Ancak aşırı büyüme (*overgrowth*) sendromlarına benzer şekilde aşırı büyüme ile de karşılaşılabilir<sup>22</sup>. Genellikle baş çevresi ölçümleri 50. persentil üzerinde seyretmeye eğilimlidir ve görelî makrosefaliye neden olmaktadır. Tam mutasyona sahip erişkin erkeklerde uzun yüz görünümü, belirgin alın, strabismus (şaşılık), nadiren yarık dudanın eşlik ettiği yüksek damak, uzun çene (*prognatizm*), büyük ve/veya kepçe kulaklar gibi dismorfik özellikler karakteristiktir. Tipik FXS fenotipine neden olan büyük kulaklar ile belirgin çene özellikleri ve makroorşidizm puberte sonrası belirginleşmektedir. Ayrıca fizik muayene ile saptanabilecek artmış eklem laksitesi ve düz tabanlık yanında görüntüleme yöntemleri ile saptanabilecek mitral kapak prolapsusu (MVP), aort kökü dilatasyonu gibi bağ doku anormallikleri eşlik edebilmektedir<sup>23</sup>. FXS'lu olgularda hipertansiyon riski artmıştır ve olguların muayenesinde mutlaka fizik muayeneye dahil edilmelidir. Bağ doku anormalliklerine bağlı olarak eklem dislokasyonları veya skolyoz eşlik edebilmektedir<sup>22</sup>.

### **Nörolojik ve Psikiyatrik Bulgular**

Daha önce tartışıldığı üzere FMR proteini nöronal gelişimde, sinaptik iletim ve elastisitede önemli görevler üstlenmektedir. Bu nedenle FMR proteininin hiç üretilmediği ya da miktarının önemli derecede azaldığı durumlarda nöronal etkilenme kaçınılmazdır<sup>2</sup>. Tam mutasyonlu olgularda yenidoğan döneminde hipotoni, motor beceri kazanımında gecikme (oturma ve yürümede gecikme) ve dil gelişiminde gerilik saptanabilmektedir. FXS'li erkeklerde ortalama desteksiz oturma yaşı 10 ay (normali=5-9 ay), yürüme 20,6 ay (normali=9-17 ay) ve ilk anlamlı-anlaşılır kelime söyleme yaşı 20 ay (normali=12-18 ay) olarak bildirilmiştir<sup>23,24</sup>. Okul çağında öğrenme güçlüğü ve ifade edici dil alanında gerilik, öfke nöbetleri, hiperaktivite, yineleyici vücut hareketleri (el çırpma, parmak ısırma gibi), tekrarlayıcı konuşma (ekolali) ve uygunsuz konuşma (kaprolali) gibi nöropsikiyatrik bulgular görülebilmekte ve ilerleyen yaşlarda şiddetlenebilmektedir. Azalmış göz kontağı, utangaçlık, dürtü kontrol bozukluğu, dikkat süresinde azalma gibi bulgular ise özellikle puberte sonrasında ortaya çıkmakta ve diğer bulgular gibi zamanla ilerlemektedir. Saplantı bozukluğu (obsesif-kompulsif bozukluk), ve anksiyete bozukluğu sık görülen bulgulardandır<sup>23,25</sup>. FXS'li erkeklerde otizm sıklığı genel popülasyondan oldukça yüksektir ve olguların yaklaşık %25'ini etkilemektedir. FXS'da insidansı artan bir diğer nörolojik bozuklukta epilepsidir ve FXS'li erkeklerin yaklaşık %10-20'sini etkilemektedir<sup>26</sup>. Unutulmaması gereken önemli bir nokta, FXS'lu olguların bir kısmında zekâ testi puanının (IQ) normal sınırlarda olabileceğidir<sup>23</sup>.

### **Ek Bulgular**

Tam mutasyonlu erkek olgularda karakteristik dismorfik ve zihinsel fenotipik bulgular yanında ek anomaliler görülebilmektedir. Kıırma kusurları, astigmatizm, yenidoğan döneminde

gastroözefagal reflü hastalığı sık kusmalara ve beslenme problemine neden olmakla birlikte sıklıkla ilerleyen yaşlarda düzelme eğilimi göstermektedir. Bebeklik döneminde, sık tekrarlayan otitler ve buna bağlı kalıcı işitme kaybı görülebilmektedir<sup>22</sup>. Nadiren yarık damak ve bağ doku anormallikleri saptanabilmektedir. Bağ doku bozukluğu olduğunda, kalça ve/veya patella dislokasyonu (diz kapağı kemiği çıkığı) ve skolyoz (omurga eğriliği) görülebilmektedir. İnguinal herni (kasık fıtığı) gelişimi sıklıkla<sup>22</sup>. Olgularda tuvalet alışkanlığı kazanma yaşı genel popülasyondan daha geçtir ve ilişkili olarak gece uykuda altını ıslatma sık görülmektedir<sup>22</sup>.

Frajil X sendromlu bazı olgularda hiperfaji, obezite, hipogonadizm, gecikmiş puberte görülebilir ve öncelikle Prader-Willi sendromunu düşündürebilir. Tüm olguların yaklaşık %5'ini oluşturan bu olgular Prader-Willi fenotipi olarak isimlendirilmektedir<sup>22</sup>.

### **Heterozigot Tam Mutasyonlu Dişi Olgular**

Bu olgularda Lyon hipotezi olarak bilinen fenomen ile dokularda X kromozomlarından sadece birinin aktif olması, diğer X kromozomunun (kromozomlarının) ise inaktive edilmesi nedeni ile tam mutasyona sahip erkek olgulardan daha hafif fenotip izlenmektedir<sup>2,25</sup>.

### **Fizik Muayene Bulguları**

Uzun yüz, belirgin kulaklar ve belirgin çene ile karakterize yüz bulguları tam mutasyona sahip dişi olguların yaklaşık %50'sinde gözlenir ancak olguların yarısı fenotipik olarak normaldir.

### **Nörolojik ve Psikiyatrik Bulgular**

Tam mutasyonlu dişi cinsiyetli bireylerde, zihinsel etkilenme olgular arasında farklılık göstermekle birlikte hemen her zaman etkilenmiş erkeklerden daha hafif zihinsel gerilik

göstermektedirler. Etkilenmiş dişilerin bir kısmında öğrenme güçlüğü, hafif-orta zihinsel gerilik saptanırken olguların %50'sinde normal zekâ işlevi saptanmaktadır<sup>23</sup>. Tam mutasyonlu dişilerde, erkeklere benzer şekilde sosyal kaygı, seçici mutizm, utangaçlık, azalmış göz teması, hiperaktivite ve dürtü kontrol bozukluğu gibi psikiyatrik problemler izlenebilmektedir<sup>25</sup>. Tam mutasyon taşıyan dişi olgularda da epileptik nöbet insidansı artmıştır ve yaklaşık oran %5 civarındadır (tam mutant erkeklerde %10-20)<sup>26</sup>.

### **Ek Bulgular**

Tam mutasyonlu dişi olgularda puberte prekoks (erken ergenlik) görülebilmekte ayrıca erkek olgularda olduğu gibi bağ doku anormallikleri ve görme problemleri eşlik edebilmektedir.

### **Premutasyon Taşıyıcısı Erkek ve Dişiler**

Çoğunlukla normal zekâyâ sahiptir ve dış görünüşleri normaldir. Ancak premutasyon taşıyıcısı olduğu halde klasik FXS bulgularından bazılarını gösteren erkek ve dişi olgular da –nadiren-bildirilmiştir Premutasyon taşıyıcılarının bir kısmının hafif zihinsel gerilik ve davranış problemleri gösterdiği bilinmektedir. Bu bulgular premutasyon taşıyıcılarında sıklıkla normal yaşamı etkilemez, kişilerin normal sosyal yaşam sürmelerine ve aile hayatı yaşamalarına engel olmaz<sup>23</sup>. Ancak premutasyon taşıyıcısı bireylerde *FMR1* ilişkili diğer klinik durumlar gözlenebilir. *FMR1* ilişkili diğer hastalıklar FXPOI (Frajil X ile ilişkili primer ovaryan yetmezlik, *Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency*) ve FXTAS (Frajil X ilişkili tremor/ataksi sendromu, *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*)'dur.

### **FXPOI (Frajil X İle İlişkili Primer Over Yetmezlik)**

Tek allelde 55-200 CGG tekrar sayısı taşıyan (premutasyon) dişilerde menstrüasyonun 40 yaşından önce kesilmesi olarak tanımlanmaktadır<sup>2</sup>. FXPOI bulgusunun 11 yaşında bile gözlenebildiği

bildirilmiştir<sup>23</sup>. Premutasyon taşıyıcısı kadınların yaklaşık %21'i (%15-27) FXPOI geliştirmektedir. CGG tekrar sayısı ile POI gelişme riski arasında kesin korelasyon kurulamamıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Premutasyon Büyüklüğüne Göre FXPOI İçin Olasılık Oranları<sup>23</sup>

CGG Tekrar Sayısı	POI İçin Oransal Risk
59-79	6,9
80-99	25,1
>100	16,4

Sherman'ın derlemesinde; 1980 sonlarında ve 1990 başlarında yapılan çalışmalarda CGG tekrarının normal değerlerin üstüne çıkmasıyla POI riskinin arttığı ancak bu tarihlerden sonra yapılan çalışmaların bunu desteklemediği belirtilmiştir<sup>27</sup>. Hatta bazı çalışmalarda CGG tekrar sayısının 80'in üzerinde olduğu olgularda, POI riskinin daha düşük olduğu saptanmıştır<sup>23</sup>. Hunter ve arkadaşlarının 360 kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada intermediate allel ile yüksek-normal CGG tekrarına sahip kişiler arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu nedenle yazarlar CGG tekrar sayısı yanında ek nedenlerin POI yaşını etkilemiş olabileceği yorumunu yapmışlardır<sup>28</sup>. Tam mutasyona sahip dişilerin FXPOI için artmış risk taşımadıkları da bilinmektedir<sup>27</sup>. Özellikle, premutasyon taşıyıcısı dişilerin FXPOI tanısı olsa bile gebelik şanslarının devam ettiğinin bilinmesi gerekmektedir. FXPOI tanısı alan olgularda gebelik oranı %5-10 olarak tahmin edilmektedir. Bu olgularda düzensiz menstrual sikluslar, premenapozal sendromlar ve azalmış fertilité söz konusudur<sup>28,29</sup>.

### **FXTAS (Frajil X İlişkili Tremor/Ataksi Sendromu)**

*FMRI* geni premutasyon taşıyıcısı erkek ve dişilerde gözlenen geç başlangıçlı, ilerleyici, serebellar ataksi ve intansiyonel tremor ile karakterize nörodejeneratif tablodur. Ayrıca zihinsel ve yürütücü

işlevlerde gerilik, yakın bellekte kayıp, demans eşlik edebilir. Periferik nöropati, otonomik disfonksiyon, parkinsonizm bulguları saptanabilmektedir. İlk bulgu, ortalama 60 yaş civarında ortaya çıkan tremordur. Yaklaşık 2 yıl sonra sık düşme ile kendini gösteren ve yürümeye yardımcı alet gereksinimi doğuran ataksi başlamaktadır. Ortalama yaşam süresi ilk bulgunun ortaya çıkmasından sonra 5-25 yıldır<sup>23</sup>. Erkek premutasyon taşıyıcılarında yaş arttıkça FXTAS riski belirgin olarak artar ancak ortalama olarak tüm erkek premutasyon taşıyıcılarının %40'ında FXTAS gelişmektedir. FXPOI aksine FXTAS'da CGG tekrar sayısı klinik durumun ortaya çıkışı üzerinde etkilidir. Artan tekrar sayıları FXTAS riskini artırmaktadır<sup>30</sup>. Serebellar volümde azalma, beyaz madde yoğunluğunda artış gibi görüntüleme bulgularının da CGG tekrar sayısı ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir<sup>31</sup>. Premutasyon taşıyıcılarına FXTAS ortaya çıkma riski cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. FXTAS için penetrans, 50 yaş altı dişilerde, erkeklere oranla belirgin olarak düşüktür (dişi premutasyon taşıyıcılarda %16,5 ve erkek premutasyon taşıyıcılarda %45,5)<sup>32</sup>.

### **Tanı Yöntemleri**

#### **Klinik Tanı**

FXS, X'e bağlı zihinsel gerilik olgularının en sık nedenidir ve olguların %30'undan sorumludur<sup>22</sup>. FXPOI, FXTAS gibi olası sonuçlara yol açabileceğinden ve genetik danışmanlığın tam olarak verilebilmesi için taşıyıcıların saptanması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle hangi olgularda ön tanıda *FMRI* ilişkili hastalıkların düşünüleceği ve moleküler testlerin kimlere uygulanacağı, olguların-ailelerin yönetimi klinik yaklaşımda önemlidir (Tablo 2). Frajil X sendromu, zihinsel gerilik nedeni ile değerlendirilen, eşlik eden konjenital malformasyonu olmayan olgularda mutlaka ön tanılar arasında düşünülmelidir. Klinik bulguların (örneğin tipik yüz görünümü, makroorşidizm, davranış kalıbı) yaş ve



cinsiyete göre değişebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

**Tablo 2.** Moleküler ve Klinik Korelasyon<sup>23</sup>

Varyant Tipi	CGG Tekrar Sayısı	FMR1 Geni Metilasyon Durumu	Klinik Durum	
			Erkek	Dişi
Premutasyon	~ 55-200	Metillenmemiş	FXTAS için artmış risk	FXTAS ve POI için artmış risk
Tam Mutasyon	>200	Tamamen metillenmiş	% 100 zihinsel gerilik	Olguların % 50'sinde zihinsel gerilik, % 50'sinde normal zekâ düzeyi saptanır
Tekrar Sayısı Mozaizizm	Premutasyon ve tam mutasyona sahip farklı hücre hatları	Premutasyon hücre hattında metillenmemiş, tam mutasyon hücre hattında metillenmiş	Olguların hemen hepsinde (~% 100) zihinsel gerilik vardır. Ancak tam mutasyon taşıyan erkeklere göre yüksek fonksiyonlu olabilirler	Geniş bir klinik yelpaze görülebilir. Olgular tamamen normal zekâ ile tam etkilenme arasında yer alabilir
Metilasyon Mozaizmi	>200	Metillenmiş ve metillenmemiş hücre karışımı	Olguların hemen hepsinde (~% 100) zihinsel gerilik vardır. Ancak sıklıkla düşük-normal zekâ ile yüksek fonksiyonlu zihinsel gerilik arasındadır	
Metillenmemiş Tam Mutasyon	>200	Metillenmemiş	Olguların hemen hepsinde (~% 100) zihinsel gerilik vardır. Ancak sıklıkla düşük-normal zekâ ile yüksek fonksiyonlu zihinsel gerilik arasındadır	

Ayrıca FXS karmaşık genetik etyolojisi (tekrar sayısı, hipermetilasyon) nedeni ile tam mutasyona sahip olgularda klasik zihinsel gerilik sınıflamasına uymayan (IQ>70) tabloyla karşılaşılabileceği bilinmelidir. Daha önce tartışıldığı üzere FXS'lu olgularda otizm spektrum bozukluğu riskinin belirgin yüksek olması nedeni ile otizmlili her olgunun kromozom analizi ve *FMR1* gen analizi ile değerlendirilmesi önerilmektedir<sup>33</sup>. FXTAS kesin tanısı ise geç başlangıçlı intansiyonel tremor ve/veya ataksi varlığında kraniyal görüntüleme (MR) orta serebellar pedinküllerde ve/veya beyin sapında beyaz madde lezyonlarının görülmesi ve *FMR1* geninde premutasyon saptanması ile konmaktadır. Belirlenen majör ve minör bulguların varlığına göre olası FXTAS

olgular da saptanabilmektedir (Tablo 3). Tam mutasyona sahip olgular saptandığında ailedeki erkek ve dişi bireylerin premutasyon taşıyıcılığı açısından araştırılması ve olası FXTAS açısından risklerinin belirlenmesi gerekmektedir<sup>34</sup>. POI'li olgularda *FMR1* premutasyon taşıyıcılığının %3-15 oranında olduğu saptanmıştır<sup>35</sup>. Bu nedenle 40 yaşında önce menapoz bulguları gösteren her dişide FXPOI ayırıcı tanıda düşünülmelidir. POI'li her olgunun kromozom analizi ve CGG tekrar sayısı ile değerlendirilmesi önerilmektedir<sup>34</sup>. Ayrıca FXS ya da FXS ilişkili hastalık tanısı konulan her olgunun dişi akrabalarının (anne, kız kardeş, teyze,) FXPOI açısından risk taşıdıkları anlatılmalı ve genetik danışmanlık verilmelidir<sup>23</sup>.

**Tablo 3.** FXTAS'da Major ve Minör Kriterler<sup>23</sup>

Kriterler	Laboratuvar Bulgusu	Klinik Bulgu
Major	<i>FMRI</i> geninde premütasyon saptanması MR ile orta serebellar pediküllerde ve/veya beyin sapında beyaz madde lezyonları saptanması	İntansiyonel tremor Yürüyüş ataksisi
Minör	MR ile serebral beyaz maddede lezyon saptanması Orta- jeneralize atrofi	Parkinsonizm Orta-ağır şiddette hafıza problemleri, yürütücü zihinsel fonksiyonlarda kayıp

## Sitogenetik, Moleküler ve İmmüno kimyasal Tanı

### Sitogenetik Yöntemler

Sitogenetik çalışmalar klinik olarak nedenin belli olmadığı dismorfik görünüme sahip veya sahip olmayan tümmental retardasyon ve gelişim geriliği durumlarında önerilmektedir<sup>36</sup>. Sitogenetik değerlendirme metodu, FXS tanısı için, *FMRI* geninin klonlanmasından önce sıkça kullanılan bir genetik tanı yöntemidir<sup>14,15,37</sup>. Bu yöntemle, fosfat eksikliği bulunan bir ortamda hücreler kültüre edilmekte<sup>14</sup> ve GTG boyama ardından ışık mikroskopu kullanılarak, Xq27.3 bandındaki X kromozomunun uzun kolunun uca yakın kısmındaki daralma olan FRAXA gözlemlenebilmektedir<sup>2</sup>. Ancak, bu yöntem, taşıyıcı tespiti bakımından ve FRAXA yakınlarında lokalize olmuş FRAXE (FRAXA'dan 0,6 Mb uzakta) ve FRAXF (FRAXA'dan uzak 1-2Mb) gibi diğer frajil bölgelerin tanı karışıklığına neden olması bakımından yetersiz kalmıştır<sup>14</sup>. Ayrıca, frajil bölgeler genellikle hücrelerin %10 kadarında görülebilmektedir. Bu durum erkeklerde çok fazla sorun olmazken, kadınlarda mutasyonlar sıklıkla tespit edilememektedir<sup>37</sup>. Sonuç olarak, bu prosedür, zaman alıcı olması, yorumlamada güçlük yaşanması ve spesifik teknik beceriler gerektirmesi bakımından zamanla yerini daha ileri metotlara bırakmıştır<sup>38</sup>. Kimya ve mikroskopi alanındaki gelişmelerle birlikte kullanılmaya başlayan subtelomerik FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

sitogenetik incelemelerin çözünürlüğünü arttırmıştır. Subtelomerik FISH yöntemi floresan işaretli DNA problemlerinin denatüre metafaz kromozomları ya da interfaz nükleusundaki DNA ile hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle 5 Mb'dan daha küçük submikroskopik değişimler tespit edilebilmektedir<sup>39</sup>. Eğer karyotip ve FISH sonuçlarına göre hasta frajil X bakımından negatifse diğer metodlara başvurulur. Bu metodlardan biri de karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH; Comparative Genomic Hybridization)'dur. Bu teknik ile farklı floresan boya ile etiketlenmiş iki genomun normal metafaz kromozomlarına hibridizasyonu ve bunun karşılaştırılması gerçekleştirilmektedir<sup>36</sup>. Ancak son yapılan araştırmalar, sitogenetik testlerden daha duyarlı ve daha spesifik, çoğunlukla *FMRI* genindeki CpG adalarının metilasyon durumunun değerlendirilmesi ve CGG tekrar boyutunun ölçülmesini hedefleyen PCR tabanlı moleküler tekniklerin geliştirilmesine yoğunlaşmıştır<sup>2,15,37</sup>.

### Moleküler Yöntemler

*FMRI* geninin ve FXS'a neden olan sorumlu mutasyonel mekanizmanın tanımlanması ile birlikte, CGG tekrar büyüklüğü ve *FMRI* geninin metilasyon durumunun belirlenmesine odaklanan, güvenilir DNA-temelli tanı testlerinin uygulanmasına başlanmıştır<sup>40</sup>. Southern blot hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; *Polymerase chain reaction*), array temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH; array-

Comparative Genomic Hybridization), FXS tanısında kullanılan moleküler metodlardır<sup>2,40,41,42</sup>. Son yıllarda ise yeni nesil dizileme (NGS; Next Generation Sequencing) teknolojisi ile tüm genom (WGS; Whole Genome Sequencing), ve tüm ekzom dizilenmesinin (whole exome sequencing; WES) yanı sıra hedefe yönelik olarak oluşturulan yeni nesil dizileme panelleri kullanılmaktadır<sup>43</sup>.

### Southern Blot Analizi

FXS'nin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan tanı yöntemidir<sup>40,44</sup>. Southern blot analizi ile tek bir testte, büyük premütasyonlar ve tam mutasyonlar açık bir şekilde belirlenerek ve metilasyon durumları tanımlanabilmektedir<sup>38-40</sup>. Trinükleotid tekrar sayısı ve metilasyon durumunu belirlemek için, *EcoRI* ya da *HindIII* ile kombine edilmiş bir metilasyona duyarlı enzim (*BstZI*, *EagI*, *NruI* veya *BssHII*) ile *FMRI* (CGG)n bölgesinde çift enzim kesimi gerçekleştirilmekte<sup>41,44</sup>, ardından bunu, StB12.3, Ox0.55, Ox1.9 veya Pfx1a probu ile hibridizasyon takip etmektedir<sup>41</sup>. Premütasyon ve tam mutasyonun bir arada olduğu mozaikler ve metilasyon mozaikliklerinin belirlenmesi açısından da yararlı bir metodur<sup>14,44</sup>. Çift enzim kesimi metillenmemiş büyük premütasyonlar ve küçük metillenmiş tam mutasyonları ayırmakta da kullanılmaktadır<sup>14</sup>. Tam mutasyonlu erkeklerde CGG genişlemesi 230 tekrarın üzerinde olduğunda *FMRI* hemen hemen her zaman metillendiğinden, *FMRI* genine karşılık gelen bant boyutunda bir artış vardır. Lyonizasyon sürecinin bir sonucu olarak normal dişilerdeki iki X kromozomundan biri inaktive olur ve *FMRI* geni metillenir. Dişilerde ve erkeklerde normal *FMRI* geninin bulunduğu aktif bir X kromozomu 2,8 kb band gösterirken, normal *FMRI* genine sahip inaktif bir X kromozomu 5,2 kb bant sergilemektedir. Tam mutasyon taşıyıcısı bir dişi, normal metillenmemiş dişi kalıbı (aktif durum-2,8 Kb), metillenmiş (inaktif durum-5,2 kb) ve hipermetilasyon ve *FMRI*

mutasyonunun genişlemesini yansıtan 5,2 kb'dan daha büyük anormal bir bant olmak üzere üç bant sergilemektedir<sup>44</sup>. Southern blot analizi, büyük genişleme mutasyonlarını güvenilir şekilde saptarken<sup>41</sup>, küçük premütasyon ve 45-55 arasında tekrar içeren gri bölge allellerini normal allellerden ayırt edemeyebilmekte<sup>41,44</sup>, yüksek arka plan ve zayıf sinyaller yanlış yorumlamalara neden olabilmektedir<sup>41</sup>. Bununla birlikte, kemiluminesans belirlemeyi takiben radyoaktif olmayan (digoksinin-etiketli) problemlerin kullanımı iyi bir alternatiftir<sup>40</sup>. Southern blot analizi zaman alıcı, oldukça pahalı ve yoğun emek gerektiren bir tekniktir<sup>40,44</sup>.

### PCR

PCR analizi ile normal, gri bölge ve küçük premütasyon allelleri doğru olarak saptanabilmektedir<sup>40,41</sup>. Bu yöntemde, *FMRI* geni için spesifik primerler kullanılarak CGG tekrarını içeren bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir<sup>2</sup>. Ancak konvensiyonel PCR metodolojileri ile yüksek CG içeriği ve denatüre edilemeyen sekonder yapıların oluşma eğiliminden dolayı 100-200 CGG tekrarından fazlasının amplifiye edilmesi ve tam mutasyonların çoğaltılması güvenilir bir şekilde yapılamamaktadır<sup>37,40,44</sup>. Daha uzun allellerin amplifikasyon olasılığını artırmak için çok sayıda değişik PCR protokolü tanımlanmıştır<sup>44</sup>. Örneğin, Nükleotid analogu 7-deaza guanozin trifosfat (Deaza-dGTP), amplifikasyonu engelleyecek ilmeklerin oluşumunu önlemeye yardımcı olarak<sup>41</sup>, GC açısından zengin uzun tekrarların amplifikasyonunu mümkün kılmaktadır<sup>44</sup>. Denatüre edici dimetil sülfoksit ise, ikincil yapıların stabilizasyonunu bozmakta yüksek erime sıcaklıklarını düşürmektedir. Bununla birlikte, ampikonlar, etidyum bromür-agaroz jellerinde görülmez ve radyoaktif ya da floresan etiketleme gerektiren, büyük alleller çoklu bantlar olarak gözlemlenir ve doğru boyutlandırma zorlaşır. DNA izostabilizatörü olan ozmolyt betainin,

amplifikasyon verimini ve özgünlüğünü geliştirdiği bildirilmiştir. Ek olarak, kapiller elektroforezin dahil edilmesi, yaklaşık 300 CGG tekrarlı büyük allellerin karakterizasyonunu mümkün kılmaktadır<sup>41</sup>. Floresan etiketli prekür-sörler, PCR amplifikasyonu sırasında kullanıldığında ve PCR ürününün boyutu, dizi analizi cihazında belirlenebilmektedir<sup>40</sup>. PCR'ın avantajları, küçük bir DNA miktarı (<100 ng) gerektirmesi ve FMR1 genindeki trinükleotid tekrarların doğru boyutlandırılması ve hızlı tanı imkanı sağlamasıdır<sup>44</sup>. Ancak, amplifikasyon farklılıkları nedeniyle premutasyon ve normal alleller için mozaik olan hastaları PCR ile tespit etmek güçtür<sup>41,44</sup>.

### Triplet Tekrarlı Primer PCR (TP-PCR)

TP-PCR, aynı PCR reaksiyonunda, CGG primeri ve CGG tekrar bölgesi dışındaki dizileri hedefleyen iki primer daha kullanır<sup>37</sup> ve trinükleotid tekrar genişlemelerini saptamada en ideal araçtır<sup>45</sup>. PCR döngülerinden sonra, kapiller elektroforez kullanılarak heterojen TP-PCR amplikonları belirlenebilmektedir. Bu yöntemle, AGG kesintileri de saptanabilmektedir<sup>38,45</sup>. TR-PCR, tam mutasyon aralığı boyunca normal allellerden, genişlemiş allellere kadar tüm allelleri belirleyebilmekte, normal ve tam mutasyon allellere sahip dişileri ayırt edilebilmekte ve CGG büyüklüğü hakkında bilgi verebilmektedir<sup>37</sup>.

### Metilasyon Spesifik PCR (MS-PCR)

Bu alternatif PCR yaklaşımı, *FMR1* geninin metilasyon durumunun ve/veya tekrar uzunluğunun eşzamanlı olarak saptamak amacıyla geliştirilmiştir. PCR esaslı prosedürlerle metilasyon durumunun analizi, DNA kalıplarının sodyum bisülfitle muamelesini gerektirmektedir. Böylece metile olmayan sitozinleri (CG dinükleotidleri) urasil haline dönüştürerek metile ve metile olmayan bölgeler arasındaki ayrımı mümkün kılmaktadır. Kapiller elektroforez ve GeneScan® analizi ile kombine edildiğinde, floresan PCR ürünleri, pik büyüklükleri ve elektroforetik

kalıpların bir kombinasyonuna göre belirlenmektedir. Üretilen elektroforeogramlar, hem metilasyon durumu hem de CGG tekrar sayısı hakkında bilgi vermektedir. Kadınlarda X inaktivasyonu ve mozaik paternlerin varlığı sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilmekte ayrıca sitozinin urasile eksik dönüştürülmesi yanlış-pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Çok basamaklı prosedürlerden dolayı kontaminasyon riski oldukça yüksektir. Sodyum bisülfat uygulaması ve DNA'nın deaminasyonunu kapsayan kitlerin kullanımı, bu dezavantajların üstesinden gelmeye yardımcı olmaktadır<sup>41</sup>. Bu yöntem Southern blot analizinden daha hassas olarak metilasyon durumunu belirleyebilmektedir. TP-PCR ve TP-MS-PCR kombinasyonu prenatal ve postnatal tanıda rutin olarak halen kullanılan en iyi metoddur. Bu iki PCR kombinasyonunun duyarlılığı ve özgüllüğü %99'dan fazladır<sup>15</sup>.

### Array Temelli Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH)

Farklı platformlar kullanılarak 1 Mb'den daha küçük submikroskopik DNA kopya sayısı değişikliklerin saptanması mümkündür. aCGH uygulaması ile mental retardasyon olgularında normal karyotip ve subtelomer taraması yapılmış hastaların yaklaşık %20'sinin etiyojisini belirlemek mümkündür. aCGH'nin dezavantajı ise sonradan ortaya çıkan, tanımlanmamış kopya sayısı varyasyonlarının yorumlanmasındaki zorluktur<sup>39</sup>.

### Yeni Nesil Dizileme (NGS)

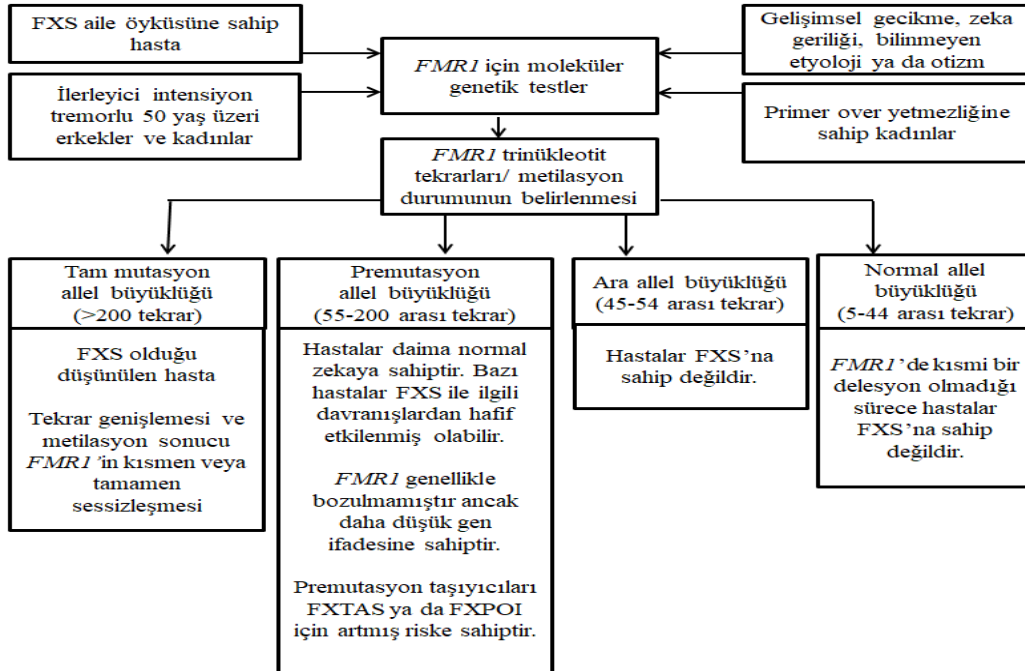
Yeni nesil dizileme (NGS), bir genetik testteki tüm genleri sıralayan DNA dizileme teknolojisidir. NGS ile hastalığa neden olduğu bilinen, genomdaki protein kodlayan genler (WES; whole exome sequencing) ya da genomdaki genlerin tümü (WGS; whole genome sequencing) analiz edilebilmektedir. NGS, genotip-fenotip değişkenliğini incelemek açısından bütünlendirici bir yaklaşım olmasının yanı sıra yüksek tanısal verime sahiptir.

Klinik olarak tanımlanmamış mental retardasyon olgularını ve aCGH ile tanımlanmış olan de novo kopya sayısı varyasyonlarını tanımlamada önemli bir araçtır<sup>39</sup>.

### İmmünitokimyasal Yöntem

Antikor temelli olan bu yöntemde, bir monoklonal antikor ile FMRP'nin doğrudan saptanmasına ve antikor-antijen komplekslerinin alkalın fosfataz enzim aktivitesi ile dolaylı olarak görüntülenmesine dayanan alternatif immünitokimyasal testtir. Bu yöntemde, normal *FMR1*'li ya da premutasyon taşıyıcı etkilenmemiş bireylerin lenfosit hücre sitoplazmalarında FMRP bulunurken, metile olmuş tam mutasyona sahip erkeklerin lenfosit sitoplazmasında FMRP üretimi olmamaktadır<sup>40,44</sup>. Test, etkilenen erkekleri teşhis etmek için kullanılabilir, ancak FMRP, normal X kromozomu tarafından hala üretildiği için, tam mutasyonlu dişileri tanımlamak için kullanılamaz<sup>44</sup>. Buna ek olarak, antikor

testi, işlevsiz proteinleri belirleyemezken, normal ve premutasyon allelleri arasında ayırım yapamaz<sup>14,44</sup>. Bu immünitokimyasal test, tek bir günde yapılabilir, radyoaktivite gerektirmez ve yaygın CGG tekrar amplifikasyonu ve diğer mutasyonlar (delesyonlar ve nokta mutasyonlar) dahil tüm fonksiyon kaybı mutasyonlarını tespit eder. Prenatal ve doğum sonrası uygulamalar, koryonik villus örnekleri (CVS), amniyotik sıvı hücreleri, kan yaymaları ve saç kökleri üzerinden gerçekleştirilebilmektedir. Normal ve FXS olan bir hasta her zaman kontrol olarak kullanılır. Her kan yayması için toplam 100-200 hücre sayılır ve FMRP ekspresyonu, FMRP-pozitif hücrelerin yüzdesine dayanarak değerlendirilir. Dişi bireyler için her zaman tam doğrulukta olmasa da, idiyopatik zekâ geriliği olan erkeklerde FXS'nin taranması için hızlı, kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir<sup>41</sup>.



Şekil 3. FXS ve *FMR1* ilişkili Hastalıklar İçin Test Algoritması<sup>46</sup>.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

FXS, kalıtlıdır zihinsel geriliğin en önde gelen sebebidir. Çeşitli sistem bulguları ve dismorfik bulgular ile birlikte zihinsel gerilik klinik tabloyu

oluşturmaktadır. Klinik bulgular, geniş bir yelpaze içerisinde bulunabilmektedir. *FMR1* geni ile ilişkili olarak FXS ile birlikte FXPOI ve FXTAS hastalıkları da

tanımlanmıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte yüksek doğrulukta tanı koymanın kolaylaştığı bu hastalık grubu tanısı için

sağlık profesyonellerine yönelik hazırlanan test algoritması Şekil 3'te sunulmuştur.

#### KAYNAKLAR

1. Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., et al. (1991). "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome". *Cell*, 65, 905-914.
2. Saldarriaga, W., Tassone, F., Gonzalez-Teshima, L.Y., Forero-Forero, J.V., Ayala-Zapata, S., Hagerman, R. (2014). "Fragile X syndrome". *Colombia medica*, 45, 190-198.
3. Crawford, D.C., Acuna, J.M., Sherman, S.L. (2001). "FMR1 and the fragile X syndrome, human genome epidemiology review". *Genetics in medicine*, 3, 359-371.
4. Mazzocco, M.M. (2000). "Advances in research on the fragile X syndrome". *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 6, 96-106.
5. Coffee, B., Keith, K., Albizua, I., Malone, T., Mowrey, J., Sherman, S.L., et al. (2009). "Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA". *American journal of human genetics*, 85, 503-514.
6. Tuncbilek, E., Alikasifoglu, M., Boduroglu, K., Aktas, D., Anar, B. (1999). "Frequency of fragile X syndrome among Turkish patients with mental retardation of unknown etiology". *American journal of medical genetics*, 84, 202-203.
7. Demirhan, O., Tastemir, D., Diler, R.S., Firat, S., Avci, A. (2003). "A cytogenetic study in 120 Turkish children with intellectual disability and characteristics of fragile X syndrome". *Yonsei medical journal*, 44, 583-592.
8. Bilgen, T., Keser, I., Mihci, E., Haspolat, S., Tacoy, S., Luleci, G. (2005). "Molecular analysis of fragile X syndrome in Antalya Province". *Indian journal of medical sciences*, 59, 150-155.
9. Tabolacci, E., Chiurazzi, P. (2013). "Epigenetics, fragile X syndrome and transcriptional therapy". *American journal of medical genetics Part A*, 161A, 2797-2808.
10. Kim, M., Ceman, S. (2012). "Fragile X mental retardation protein, past, present and future". *Current protein & peptide science*, 13, 358-371.
11. Penagarikano, O., Mulle, J.G., Warren, S.T. (2007). "The pathophysiology of fragile x syndrome". *Annual review of genomics and human genetics*, 8, 109-129.
12. Beilina, A., Tassone, F., Schwartz, P.H., Sahota, P., Hagerman, P.J. (2004). "Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element". *Human molecular genetics*, 13, 543-549.
13. Bagni, C., Oostra, B.A. (2013). "Fragile X syndrome, From protein function to therapy". *American journal of medical genetics Part A*, 161A, 2809-2821.
14. de Vries, B.B., Halley, D.J., Oostra, B.A., Niermeijer, M.F. (1998). "The fragile X syndrome". *Journal of medical genetics*, 35, 579-589.
15. Mila, M., Alvarez-Mora, M.I., Madrigal, I., Rodriguez-Revenga, L. (2017). "Fragile X syndrome, An overview and update of the FMR1 gene". *Clinical genetics*, 93(2), 197-205.
16. Gross, C., Hoffmann, A., Bassell, G.J., Berry-Kravis, E.M. (2015). "Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back". *Neurotherapeutics*, 12, 584-608.
17. Wijetunge, L.S., Chattarji, S., Wylie, D.J., Kind, P.C. (2013). "Fragile X syndrome: from targets to treatments". *Neuropharmacology*, 68, 83-96.
18. De Boulle, K., Verkerk, A.J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., et al. (1993). "A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation". *Nature genetics*, 3, 31-35.
19. Tabolacci, E., Palumbo, F., Nobile, V., Neri, G. (2016). "Transcriptional Reactivation of the FMR1 Gene. A Possible Approach to the Treatment of the Fragile X Syndrome". *Genes (Basel)*, 7, E49.
20. Tabolacci, E., Neri, G. (2013). "Epigenetic modifications of the FMR1 gene". *Methods in molecular biology*, 1010, 141-153.
21. D'Hulst, C., Kooy, R.F. (2009). "Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy". *Journal of medical genetics*, 46, 577-584.
22. Cassidy, S.B., McCandless, S.E. (2005). "Management of Genetic Syndromes". *Management of Genetic Syndromes*, C. S.B and M. S.E, eds. (Hoboken), pp 397-412.
23. Saul, R.A., Tarleton, J.C. (1993). "FMR1-Related Disorders. In *GeneReviews(R)*," M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, et al., eds. (Seattle (WA)).
24. Çarman, K.B. (2016). "Normal neuromotor development of children". *Osmangazi Journal of Medicine*, 38, 17-19.
25. McConkie-Rosell, A., Finucane, B., Cronister, A., Abrams, L., Bennett, R.L., Pettersen, B.J. (2005). "Genetic counseling for fragile x syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors". *Journal of genetic counseling*, 14, 249-270.
26. Berry-Kravis, E. (2002). "Epilepsy in fragile X syndrome". *Developmental medicine and child neurology*, 44, 724-728.
27. Sherman, S.L. (2000). "Premature ovarian failure in the fragile X syndrome". *American journal of medical genetics*, 97, 189-194.
28. Hunter, J.E., Epstein, M.P., Tinker, S.W., Charen, K.H., Sherman, S.L. (2008). "Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity". *Genetic epidemiology*, 32, 553-559.
29. Nelson, L.M., Covington, S.N., Rebar, R.W. (2005). "An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause". *Fertility and sterility*, 83, 1327-1332.
30. Tassone, F., Adams, J., Berry-Kravis, E.M., Cohen, S.S., Brusco, A., Leehey, M.A., et al. (2007). "CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)". *American journal of medical genetics Part B*, 144B, 566-569.
31. Cohen, S., Masyn, K., Adams, J., Hessler, D., Rivera, S., Tassone, F., et al. (2006). "Molecular and imaging correlates of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome". *Neurology*, 67, 1426-1431.
32. Rodriguez-Revenga, L., Madrigal, I., Pagonabarraga, J., Xuncla, M., Badenas, C., Kulisevsky, J., et al. (2009). "Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families". *European journal of human genetics*, 17, 1359-1362.

33. Johnson, C.P., Myers, S.M., American Academy of Pediatrics Council on Children With, D. (2007). "Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders". *Pediatrics*, 120,1183-1215.
34. Biancalana, V., Glaeser, D., McQuaid, S., Steinbach, P. (2015). "EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders". *European journal of human genetics*, 23,417-425.
35. Pastore, L.M., Johnson, J. (2014). "The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review". *Frontiers in genetics*, 5,195.
36. Shaffer LG; American Collage of Medical Genetics Professional Practice and Guidelines Committee (2005). American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in Medicine*, 7(9), 650-654.
37. Tassone, F. (2015). "Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome" Expert review of molecular diagnostics, 15,1465-1473.
38. Ciaccio, C., Fontana, L., Milani, D., Tabano, S., Miozzo, M., Esposito, S. (2017). "Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses". *Italian journal of pediatrics*, 43(1),39.
39. Tomac V, Pušeljić S, Škrlec I, Andelić M, Kos M, Wagner J. (2017). Etiology and the Genetic Basis of Intellectual Disability in the Pediatric Population. *SEEMEDJ*, 1 (1), 144-53.
40. Oostra, B.A., Willemsen, R. (2001). "Diagnostic tests for fragile X syndrome". Expert review of molecular diagnostics, 1, 226-232.
41. Sofocleous, C., Kolialexi, A., Mavrou, A. (2009). "Molecular diagnosis of Fragile X syndrome". Expert review of molecular diagnostics, 9, 23-30.
42. Chiurazzi P, Pirozzi F. (2016). Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F100 Faculty rev-* 599.
43. Doğan M, Eröz R, Yüce H, Özmerdivenli R. (2017). Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler. *Duzce Tıp Fak Dergisi*, 19 (1), 27-30.
44. Pandey, U.B., Phadke, S.R., Mittal, B. (2004). "Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation". *Neurology India*, 52, 36-42.
45. Rajan-Babu, I.S., Chong, S.S. (2016). "Molecular Correlates and Recent Advancements in the Diagnosis and Screening of FMR1-Related Disorders". *Genes*, 7, E87.
46. Hersh, J.H., Saul, R.A., Committee on, G. (2011). "Health supervision for children with fragile X syndrome". *Pediatrics*, 127, 994-1006.