

La sindrome di Martin-Bell: indagine molecolare del sito fragile

A. Tonello

*Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Funzionali,
Azienda Ospedaliera, Verona*

Premesse: La diagnosi molecolare della sindrome dell'X fragile ha soppiantato nell'ultimo decennio l'indagine citogenetica; in particolare la tecnica del Southern blot consente sia di determinare l'espansione nel numero delle triplette CGG nel sito fragile, sia lo stato di metilazione del gene FMR1. L'individuazione diretta dei soggetti affetti e delle portatrici tramite Southern non è comunque né rapida, né economica. La prevalenza relativamente bassa della sindrome negli affetti da ritardo mentale rende conveniente l'utilizzo della PCR per l'esclusione della malattia, ma l'amplificazione di sequenze ricche di C e G richiede accorgimenti particolari e rivelazione radioattiva o chemiluminescente.

Metodi: In questo lavoro sono stati analizzati 64 soggetti italiani affetti da ritardo mentale, selezionati dal neurologo, e alcuni loro familiari (130 soggetti in totale). Una prima indagine è stata eseguita amplificando il sito fragile con un enzima di recente introduzione in commercio, la Pt-Pfx polimerasi, e separando gli amplificati mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide denaturante, seguita da colorazione argentea. Successivamente i casi po-

tenzialmente positivi sono stati sottoposti a Southern blot con la sonda StB12.3.

Risultati: Tramite PCR sono stati individuati 10 potenziali affetti, 4 maschi e 6 femmine. Col Southern blot si è confermata la sindrome per i 4 maschi e si è verificata l'assenza di malattia per le 6 femmine, omozigoti per il numero delle triplette CGG. È stato inoltre verificato lo stato di portatrice per 2 madri indagate. La prevalenza della sindrome è risultata del 6.2%. La distribuzione degli alleli (CGG)_n nei soggetti indagati presenta un massimo a 30 ripetizioni e due picchi minori a 20 e 23 triplette, come riportato in altri studi su popolazioni caucasiche. Nella popolazione femminile analizzata (63 soggetti) la frequenza delle omozigoti (CGG)_n è risultata del 29%.

Conclusioni: Un approccio diagnostico alla sindrome dell'X fragile che preveda una selezione dei soggetti con ritardo mentale tramite visita neurologica, successivo screening mediante PCR e verifica dei potenziali positivi con Southern blot, consente la rapida esclusione della sindrome nella gran parte dei casi e permette di contenere la spesa per l'indagine, senza sensibile discapito per la qualità.

Introduzione

La sindrome dell'X-fragile è la causa più comune di ritardo mentale ereditario^{1,2}. La sindrome è associata alla presenza di un sito genomico fragile sensibile ai folati (locus FRAXA) sul cromosoma X, banda Xq27.3, evidenziabile mediante indagine citogenetica³. Il clonaggio del sito fragile nel 1991⁴⁻⁶ ha permesso di individuare una sezione di DNA composta solo dalla tripletta CGG ripetuta numerose volte. La sequenza ripetuta CGG segrega come polimorfismo nella popolazione normale, ma diventa instabile oltre una dimensione critica. Nolin et al⁷ definiscono normali i cromosomi X che presentano da 6 a 50 ripetizioni circa della tripletta CGG e che vengono trasmesse senza variazioni; esiste una "zo-

na grigia" di circa 51-58 ripetizioni, alcune delle quali mostrano instabilità durante la meiosi, mentre gli alleli con premutazione, che contengono approssimativamente 59-200 triplette ripetute, hanno un'alta probabilità di espandersi nella trasmissione da una generazione alla successiva. Altri autori europei⁸ definiscono normali gli alleli contenenti da 6 a 53 ripetizioni e premutati quelli con 54-200 triplette. Gli individui affetti presentano più di 200 copie (fino a 1000): in queste condizioni il DNA vicino e le ripetizioni stesse vengono ipermetilate⁹. L'ipermetilazione coinvolge la regione promoter del gene FMR1 (Fragile Mental Retardation 1)⁵ ed è associata a repressione della trascrizione genica e a riduzione dei livelli di proteina FMR1. L'assenza di proteina causa il fenotipo della sindrome^{10,11}.

Prima del 1991 la sindrome dell'X fragile veniva diagnosticata tramite analisi citogenetica, e studi di screening riportavano un'incidenza nei maschi compresa tra 1 su 1000 e 1 su 2600^{2,12}. Dopo la clonazione del gene FMR1, l'analisi tramite Southern blot ha permesso di ottenere i dati critici relativi alla dimensione e allo stato di metilazione della mutazione. Inoltre la diagnosi può venire rapidamente esclusa utilizzando la PCR per determinare il numero delle ripetizioni CGG nei maschi e la presenza di due alleli a diverso numero di ripetizioni nelle femmine. L'utilizzo della PCR come primo approccio diagnostico è relativamente economico e rapido se paragonato all'analisi col Southern blot, ma non privo di difficoltà. I tentativi iniziali di analisi della mutazione con la PCR non ebbero successo a causa dell'alta stabilità delle doppie eliche ad alto contenuto di CG. Accorgimenti tecnici per facilitare l'amplificazione di questi tratti di DNA sono l'uso di dimetilsolfossido (DMSO) e di 7-deaza-deossiguanosina trifosfato (c7GdTP), che destabilizza la doppia elica del DNA e facilita la separazione delle catene antisense. L'uso di c7GdTP riduce notevolmente l'efficacia della colorazione con etidio bromuro, sono stati perciò introdotti metodi di rivelazione indiretti, con marcatori radioattivi^{13,14} o chemiluminescenti¹⁵, incorporati durante l'amplificazione o utilizzati come sonde dopo trasferimento su supporto solido^{16,17}. La rivelazione con etidio bromuro è divenuta possibile con l'introduzione dell'enzima *Pfu polimerasi*¹⁸, che gode di elevata termostabilità ed efficienza.

In questo lavoro si è affrontata la diagnosi di sindrome dell'X fragile in soggetti affetti da ritardo mentale preselezionati con visita neurologica o neuropsichiatrica. La sindrome è stata esclusa in maniera rapida e relativamente economica tramite PCR, seguita da elettroforesi in gel di poliacrilammide denaturante e colorazione argentea. Questo tipo di rivelazione è ottenibile con l'uso della Pt-Pfx polimerasi, un enzima di recente introduzione in commercio. La PCR ha permesso di analizzare anche la distribuzione degli alleli a diverso numero di triplette ripetute nei soggetti indagati e in alcuni dei loro familiari. Tutti i casi risultati potenzialmente positivi alla PCR sono stati infine sottoposti a Southern blot.

Soggetti, materiali e metodi

Sono stati esaminati 64 soggetti (48 maschi, 16 femmine) affetti da ritardo mentale, i cui campioni di sangue sono pervenuti al nostro laboratorio tra il 1989 e il 1999. I propositi provengono da Verona e provincia ed è stato loro consigliato di sottoporsi a indagine per la sindrome dell'X fragile in seguito a visita neurologica o neuropsichiatrica. Di alcuni sono stati indagati anche le madri e/o altri componenti della famiglia. In totale i soggetti indagati sono stati 130 (67 maschi, 63 femmine). I 64 probandi sono stati sottoposti anche ad indagine citogenetica del cariotipo, che ha escluso la presenza di altre anomalie cromosomiche.

Estrazione del DNA. Il DNA genomico è stato isolato da sangue periferico intero raccolto in provetta

contenente EDTA-K₃. Alcuni campioni (1989-1992) sono stati trattati con cloruro di guanidina, per altri è stato utilizzato il metodo "salting out" di Miller et al¹⁹ (Puregene DNA Isolation Kit, Genra Systems, Minneapolis, MI, USA).

PCR. L'amplificazione delle ripetizioni CGG nel locus FRAXA è stata eseguita con i primer c e f¹³:

c: 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3'

f: 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'

Il volume totale di reazione è di 25 µL, si utilizzano Pfx Amplification Buffer in concentrazione 1x, PCRx Enhancer Solution 4x, deossinucleosidi trifosfato (dNTP) 0.25 mM ciascuno, MgSO₄ 1 mM, 0.6 mM di ciascun primer e 1.25 U di Pt-Pfx polimerasi (GibcoBRL Life Technologies IT, Milano). Il programma di amplificazione (Thermal Cycler PTC-200 MJ Research) è costituito da una iniziale denaturazione a 96 °C per 5', seguita da 30 cicli con denaturazione a 96 °C per 45", "annealing" a 60 °C per 20" ed estensione a 68 °C per 5'. L'estensione finale è protratta per ulteriori 10'. Le dimensioni dell'amplificato dipendono dal numero delle triplette; l'allele più frequente con 30 ripetizioni dà un amplificato di 311 paia di basi (bp).

In caso di mancata amplificazione delle ripetizioni CGG viene eseguita un'amplificazione di controllo per verificare la qualità del DNA estratto. Si amplifica una regione ricca di CG nel tratto codificante il recettore degli androgeni con i seguenti primer⁽¹³⁾:

AR-a: 5'-ACC AGG TAG CCT GTG GGG CCT CTA CGA TGG GC-3'

AR-b: 5'-CCA GAG CGT GCG CGA AGT GAT CCA GAA CCC G-3'

La miscela di reazione ha un volume totale di 25 µL e contiene tampone Pfu 1x (20 mM Tris-HCl pH 8.75, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% TritonX-100, 100 mg/mL BSA), concentrazione 0.3 mM di ciascun primer, 0.2 mM di deossadenosina trifosfato (dATP), deossicitidina trifosfato (dCTP) e deossitimidina trifosfato (dTTP), concentrazione 0.15 mM di deossiguanosina trifosfato (dGTP), 50 mM di c7GdTP, 100 ng di DNA genomico, DMSO al 10% e 1.25 U di exo(-)Pfu polimerasi (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Il programma di amplificazione è costituito da 30 cicli che comprendono: denaturazione a 99 °C per 1', "annealing" a 63 °C per 1'30", estensione a 75 °C per 2'. L'estensione finale viene protratta per 10'. L'amplificato è di 306 bp.

L'analisi degli amplificati viene eseguita in gel (20x20 cm) di poliacrilammide denaturante al 6%, urea 8.3 M, tampone Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x. A 3 µL di amplificato sono aggiunti 6 µL di tampone di carica denaturante (formammide 95%, xilene cianolo 0.05%, blu di bromofenolo 0.05%, EDTA 20 mM) e i campioni sono posti a 95 °C per 10' prima della semina. Anche il gel viene preriscaldato con una precorsa di 15' a 600 V. Dopo la semina dei campioni il voltaggio è posto a 300 V per 10', poi a 600 V per 3 ore.

Le bande sono evidenziate tramite colorazione argentea, che fornisce una sensibilità circa 20 volte supe-

riore all'etidio bromuro per il DNA in doppia elica²⁰ e consente di rilevare anche i filamenti singoli di DNA. Il numero delle ripetizioni CGG viene determinato per confronto con bande di peso molecolare noto.

Southern blot. Viene utilizzata la sonda StB12.3⁴, gentilmente fornitaci dal dr. JL Mandel e collaboratori (Strasburgo, Francia). Per ogni campione da analizzare circa 7 µg di DNA genomico sono digeriti overnight a 37 °C con 50 U di enzima HindIII (Roche Diagnostics SpA, Milano)²¹ e 150 U di EagI (New England Biolabs GmbH, Francoforte, Germania) nel tampone di EagI NE3 1x (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM ditiotretolo, pH 7.9 a 25 °C). I frammenti di DNA vengono separati per elettroforesi in gel d'agarosio "high strength" (GibcoBRL Life Technologies IT) allo 0.8%, in tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x, a 30 V per 24 ore. Il DNA è trasferito su membrana di nylon carica positivamente HybondTM-N+ (Amersham International plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), tramite trasferimento alcalino con sodio citrato salino (SSC) 10x e NaOH 0.1 N overnight e fissato per esposizione della membrana ai raggi UV su transilluminatore per 4'.

Prima dell'ibridazione la sonda StB12.3 viene marcata con fluoresceina 11-deossipuridina trifosfato (FdUTP), secondo le istruzioni del kit "Gene Images random prime labelling module" (Amersham).

La membrana viene preibridata a 60 °C per 2 ore con SSC 5x, sodio dodecil solfato (SDS) 0.1% (w/v), destran solfato 5% (w/v), liquid block (Amersham) diluito 1 a 20, DNA di aringa 100 µg/mL. Trascorse le 2 ore una quantità opportuna di sonda marcata con FdUTP è aggiunta direttamente alla miscela di preibridazione dopo essere stata denaturata per 5' a 100 °C e raffreddata rapidamente in ghiaccio. L'ibridazione viene protratta overnight a 60 °C.

Vengono eseguiti due lavaggi della membrana a 60 °C con SSC 1x e SDS 0.1% per 15', poi altri due lavaggi a maggior stringenza con SSC 0.5x e SDS 0.1% per 15' a 60 °C. La rivelazione della sonda ibridata viene eseguita secondo le istruzioni del kit "Gene Image CDP-Star detection module" (Amersham) e la membrana viene esposta su lastra Hyperfilm ECL (Amersham) per 2 ore in cassetta autoradiografica.

Risultati

L'elettroforesi degli amplificati in gel di poliacrilammide denaturante permette di separare anche gli alleli che differiscono per una sola tripletta. Ogni allele amplificato con l'enzima Pt-Pfx polimerasi dà origine nel gel a due bande, una per ciascun "single strand" e non compaiono bande ombra, come invece accade sia con Taq sia con Pfu polimerasi. Con Pt-Pfx è quindi più semplice riconoscere le eterozigosi¹⁶. L'uso di Pt-Pfx consente inoltre di ottenere alte rese di amplificazione senza ricorrere all'uso di c7GdTP. Si evita così l'alterazione della mobilità elettroforetica delle bande, che può comportare errori nell'assegnazione del peso molecolare^{13,22,23}.

Tramite PCR ed elettroforesi sono state riconosciute eterozigoti 10 delle 16 probande, mentre non si è ottenuta amplificazione per 4 dei 48 probandi. In tutti e 4 i casi si è ottenuto l'amplificato di controllo e l'analisi in gel d'agarosio all'1% ha confermato l'integrità del DNA estratto. La PCR non ha perciò permesso di escludere la sindrome per 4 maschi e per 6 femmine, per mancata amplificazione nel caso dei maschi e per omozigosi nel caso delle femmine. Questi 10 soggetti sono stati sottoposti successivamente a indagine Southern, che ha permesso di escludere la sindrome per tutte e sei le femmine, mentre ha confermato la sindrome dell'X fragile per i 4 maschi. In figura 1 è riportato il risultato dell'analisi Southern per 3 dei 4 affetti e per 2 madri indagate. Nelle posizioni 1 e 10 vi sono due marker di pesi molecolari, nelle posizioni 8 e 9 i controlli negativi, rispettivamente maschio e femmina, mentre nelle posizioni 2, 4 e 6 sono stati caricati i campioni di 3 dei 4 probandi che non hanno dato prodotto PCR. È evidente la presenza di una banda sfumata ad alto peso molecolare in tutti e tre i casi, indice di un'ampia espansione (CGG)_n metilata, mentre è del tutto assente la banda di 2.8 kb, individuata dalla sonda in caso di cromosoma X sano non metilato. Nelle posizioni 3 e 5 sono analizzate le madri dei probandi in 2 e 4. Sono evidenti in entrambi i casi le bande sfumate ad alto peso molecolare del cromosoma X malato e le bande a 2.8 e 5.2 kb, che derivano dal cromosoma X sano. In particolare la banda a 5.2 kb indica la presenza di una certa percentuale di allele normale inattivo. Risultati analoghi sono riportati da altri autori^{24,25}. Mingroni-Netto et al²⁵ riscontrano in 25 su 30 eterozigoti la presenza di al-

Figura 1. Analisi Southern blot con la sonda StB12.3 di DNA digerito con HindIII e EagI. Nelle posizioni 1 e 10 sono stati caricati i marker di peso molecolare MWM II e MWM III; nelle posizioni 8 e 9 vi sono i controlli negativi, rispettivamente maschio e femmina. Nelle posizioni 2, 4 e 6 sono analizzati 3 probandi che non hanno dato prodotto PCR. Nelle posizioni 3 e 5 sono analizzate le madri dei probandi in 2 e 4. In posizione 7 è analizzata una probanda omozigote alla PCR, che risulta sana.

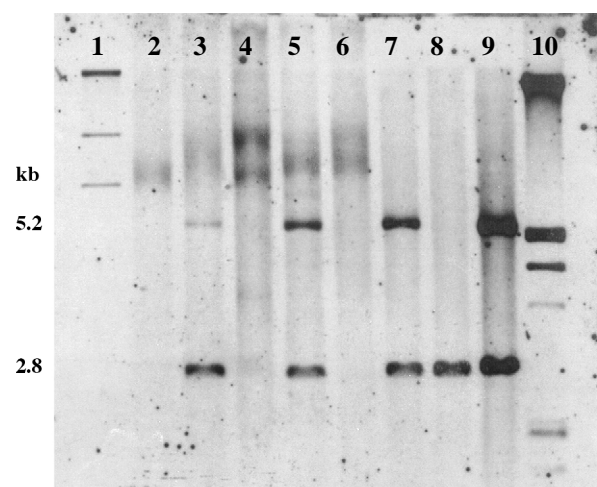


Tabella I: Distribuzione degli alleli a diverso numero di triplette nei 193 cromosomi X indagati in questo lavoro.

CGG	Numero alleli	%
18	1	0.5
20	19	9.8
22	1	0.5
23	12	6.2
24	1	0.5
27	3	1.6
29	36	18.6
30	77	39.9
31	14	7.2
32	11	5.7
36	1	0.5
42	2	1.0
43	3	1.6
44	1	0.5
48	3	1.6
51	2	1.0
>200	6	3.1

leli normali sia attivi che inattivi, senza peraltro trovare una correlazione tra inattivazione dell'allele normale e manifestazione della sindrome. In posizione 7 di figura 1 è analizzata una delle 6 probe, che risulta sana.

La distribuzione delle triplette nella popolazione indagata (193 cromosomi X), alla luce dei risultati della PCR e del Southern, è riportata in tabella I. L'allele prevalente (39.9%) presenta 30 ripetizioni,

ed è seguito dall'allele a 29 triplette (18.6%). Sono inoltre presenti nella distribuzione altri due picchi a 20 (9.8%) e 23 (6.2%) copie.

Tramite PCR sono state riconosciute eterozigoti 43 femmine su 63. Il Southern blot ha poi chiarito lo stato di eterozigosi per le madri di due degli affetti individuati. La frequenza complessiva dell'eterozigosi risulta del 71%. In tabella II è analizzata la distribuzione degli alleli nelle femmine omozigoti ed eterozigoti. Come era prevedibile il genotipo più frequente per le omozigoti è 30/30 e per le eterozigoti è 29/30.

Discussione

Indagini di tipo molecolare danno un'incidenza della sindrome di circa 1 su 4000 maschi^{12,26}. La prevalenza della mutazione piena FRAXA nella popolazione con ritardo mentale è stata studiata da molti gruppi e varia considerevolmente tra gli studi, passando dallo 0.6%¹⁶ al 22%²⁷ (tabella III). Su 64 soggetti affetti da ritardo mentale analizzati in questo lavoro, ne sono stati individuati 4 affetti da sindrome di Martin-Bell, con una prevalenza del 6.2%. In un altro studio italiano eseguito su 453 soggetti con ritardo mentale è riportata una prevalenza del 22%²⁷, ma tra gli altri studi eseguiti in Europa con analisi molecolare la prevalenza massima riportata è del 4.2%²⁸. La prevalenza riscontrata è quindi in linea, se non superiore, alla media europea. È comunque importante sottolineare che la prevalenza della sindrome nella popolazione che si analizza rispecchia la preselezione della popolazione stessa.

Tabella II: Alleli individuati nella popolazione di 63 femmine indagata in questo lavoro.

Alleli CGG	Numero	%
omozigoti		
30/30	12	19.0
29/29	4	6.4
20/20, 31/31	1	1.6
eterozigoti		
29/30	8	12.7
20/30	6	9.5
30/32	4	6.4
23/29, 23/30, 29/31	2	3.2
18/30, 20/23, 20/29, 20/31, 22/30, 23/42, 23/48, 24/32, 27/29, 27/30, 29/42, 29/43, 29/48, 30/31, 30/43, 30/44, 30/51, 31/36, 32/43, 23/>200, 31/>200	1	1.6

Tabella III: Prevalenza della sindrome dell'X fragile in pazienti con ritardo mentale in popolazioni diverse.

Regione	Numero di pazienti	Prevalenza %	Riferimento
UK	180	2.2	Jacobs et al, 1993 ⁽²²⁾
Italia	453	22.0	Perroni et al, 1994 ⁽²⁷⁾
Paesi Bassi	236	4.2	van den Ouweland et al, 1994 ⁽²⁸⁾
Giappone	425	2.7	Hofstee et al, 1994 ⁽²⁹⁾
Giappone	256	0.8	Nanba et al, 1995 ⁽³⁰⁾
Hong Kong	324	0.6	Pang et al, 1999 ⁽¹⁶⁾
Cipro	866	0.9	Patsalis et al, 1999 ⁽³¹⁾

Oltre alla malattia da espansione delle triplette sono descritti in letteratura casi di sindrome dell'X fragile dovuti a delezioni e/o mutazioni puntiformi³²⁻³⁴, non localizzate in un punto costante della sequenza. Lo studio sistematico di questi casi, che rappresentano circa il 10% del totale, richiede il sequenziamento del gene o indagini di espressione genica^{10,35}, non eseguibile in un laboratorio con dotazioni normali o quando non è disponibile mRNA del probando.

Vari autori hanno studiato la distribuzione delle triplette nella popolazione. In uno studio su 570 cromosomi X non correlati, principalmente di bianchi caucasici, il numero di ripetizioni CGG nel gene FMR1 risulta compreso tra 12 e 52, con l'allele più frequente di 30 ripetizioni in 221 (38.8%) cromosomi¹⁵. La distribuzione appare multimodale con il primo picco tra 29 e 31 e picchi minori a 20 e 23. Distribuzioni simili con l'allele più frequente di 29 ripetizioni sono state osservate in altri studi su soggetti caucasici^{17, 36-38}. Poiché l'allele più frequente nei caucasici è il 30 e non il 29, tale discrepanza è probabilmente dovuta a errori di tipo analitico^{13, 22, 23}. Nella popolazione cinese, Zhong et al³⁹ e Pang et al¹⁶ riportano invece una prevalenza dell'allele con 29 ripetizioni (44.0%), un secondo picco a 36 e nessun picco tra 20 e 22 triplette. La frequenza di eterozigoti tra le femmine varia dall'80%¹⁵ al 65%¹⁶. Nelle popolazioni caucasiche la gran parte delle femmine omozigoti presenta 30 ripetizioni, mentre il genotipo più comune tra le eterozigoti è 29/30.

In figura 2 sono confrontate le frequenze ottenute per gli alleli con meno di 53 ripetizioni con le frequenze riportate da Brown et al¹⁵ e Patsalis et al⁴⁰ su popolazioni bianche non affette da ritardo mentale, rispettivamente su 570 e 3.205 cromosomi X. Circa l'80% dei cromosomi X in questi studi presentano alleli con 20, 23, 29, 30, 31 o 32 triplette, sia nelle popolazioni normali che negli affetti da ritardo mentale.

In questo lavoro l'87% dei cromosomi X presentano gli alleli (CGG)_n più frequenti. Tenuto conto del numero ristretto di cromosomi e della parentela tra i

soggetti indagati, le distribuzioni non si discostano significativamente rispetto agli altri 2 studi citati.

Conclusioni

A tutt'oggi la sindrome dell'X fragile non è curabile, da ciò si evince l'importanza della prevenzione. L'analisi del sito FRAXA, così come proposto in questo lavoro, con studio dei soggetti affetti da ritardo mentale preselezionati tramite consulenza neurologica o neuropsichiatrica, in primis tramite PCR e quindi eventualmente con Southern blot, consente di ottenere dati diagnostici validi e in tempi relativamente rapidi contenendo la spesa. In particolare l'amplificazione del sito FRAXA con Pt-Pfx, accompagnata da rivelazione con impregnazione argentea, permette di ottenere una rapida esclusione della sindrome.

Il costo relativamente ridotto di questo approccio ne può consentire l'impiego per lo screening della popolazione con ritardo mentale, e per indagare la eventuale differente distribuzione delle triplette tra popolazioni normale e affetta da ritardo mentale.

Ringraziamenti

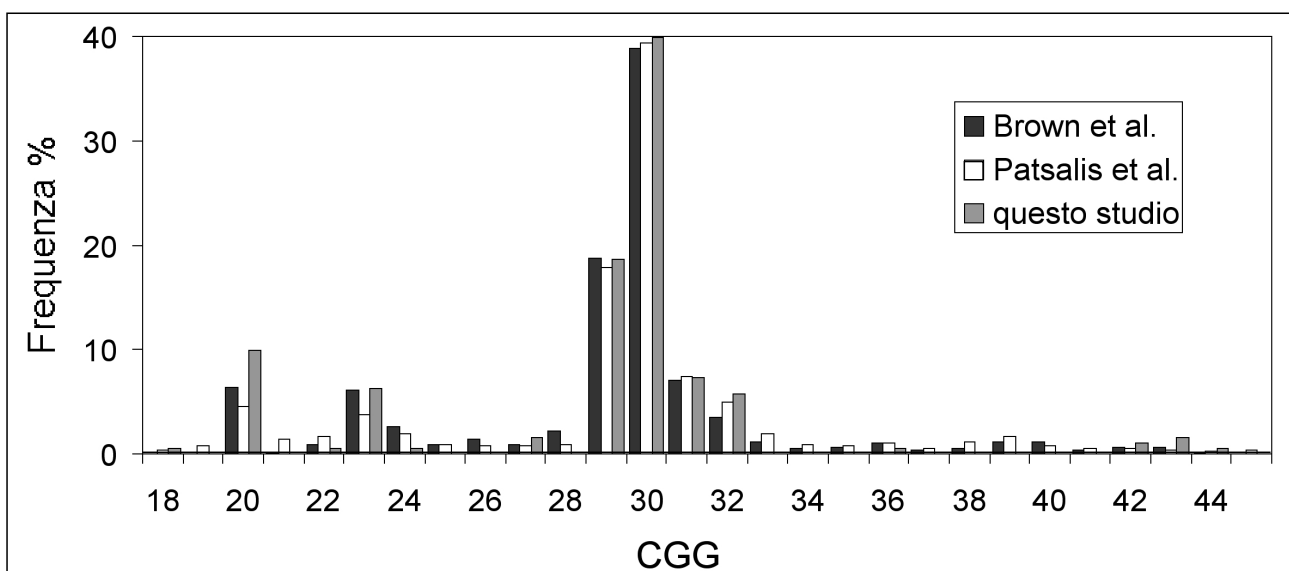
Questo lavoro è stato sostenuto con una borsa di studio dalla "Fondazione Cassa di Risparmio di Verona Vicenza Belluno e Ancona".

Ringrazio il Dott. Jean Louis Mandel e collaboratori (Strasburgo) per la sonda StB12.3.

Bibliografia

1. Turner G, Robinson H, Laing S, Purvis-Smith S. Preventive screening for the fragile X syndrome. *N Engl J Med* 1986; 315:607-9.
2. Webb T, Bunday S, Thake J, Todd A. The frequency of

Figura 2. Distribuzione delle frequenze percentuali degli alleli (CGG)_n, con 18≤n≤45, riportata da Brown et al.¹⁵ su 507 cromosomi X, Patsalis et al.⁴⁰ su 3205 cromosomi X e in questo lavoro su 193 cromosomi X.



- the fragile X chromosome among school children in Coventry. *J Med Genet* 1986; 23:396-99.
3. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 1977; 197:265-66.
 4. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252:1097-102.
 5. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, 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; 65:905-14.
 6. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252:1179-81.
 7. Nolin SL, Lewis FAI, Ye LL, Houck GEJ, Glicksman AE, Limprasert P, et al. Familial transmission of the FMR1 GCC repeat. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1252-61.
 8. Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 57:1006-18.
 9. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, et al. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 1991; 64:861-6.
 10. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66:817-22.
 11. Oostra BA. Functions of the fragile X protein. *Trends Mol Med* 2002; 8:102-3.
 12. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64:196-7.
 13. Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67:1047-58.
 14. Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT. Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 1992; 339:271-2.
 15. Brown WT, Houck GEJ, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding XH, Dobkin C, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *J Am Med Assoc* 1993; 270:1569-75.
 16. Pang CP, Poon PM, Chen QL, Lai KY, Yin CH, Zhao Z, et al. Trinucleotide CGG repeat in the FMR1 gene in Chinese mentally retarded patients. *Am J Med Genet* 1999; 84:179-83.
 17. Patsalis PC, Sismani C, Stylianou S, Ioannou P, Joseph G, Manoli P, et al. Genetic variation and intergenerational FMR1 CGG-repeat stability in 100 unrelated three-generation families from the normal population. *Am J Med Genet* 1999; 84:217-20.
 18. Chong SS, Eichler EE, Nelson DL, Hughes MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet* 1994; 51:522-6.
 19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
 20. Boulidakis T, Hancock R. A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Methods* 1981; 5:219-28.
 21. Storm K, Handig I, Reyniers E, Oostra BA, Kooy RF, Willems PJ. Incomplete EcoRI digestion may lead to false diagnosis of fragile X syndrome. *Hum Genet* 1998; 102:54-6.
 22. Jacobs PA, Bullman H, MacPherson J, Youings S, Rooney V, Watson A, et al. Population studies of the fragile X: a molecular approach. *J Med Genet* 1993; 30:454-9.
 23. Mila M, Kruyer H, Glover G, Sanchez A, Carbonell P, Castellvi-Bel S, et al. Molecular analysis of the (CGG)_n expansion in the FMR-1 gene in 59 Spanish fragile X syndrome families. *Hum Genet* 1994; 94:395-400.
 24. Grasso M, Faravelli F, Nigro CL, Chiurazzi P, Sperandio MP, Argusti A, et al. Mosaicism for the full mutation and a microdeletion involving the CGG repeat and flanking sequences in the FMR1 gene in eight fragile X patients. *Am J Med Genet* 1999; 85:311-6.
 25. Mingroni-Netto RC, Fernandes JG, Vianna-Morgante AM. Relationship of expansion of CGG repeats and X-inactivation with expression of fra(X)(q27.3) in heterozygotes. *Am J Med Genet* 1994; 51:443-6.
 26. Morton JE, Bunday S, Webb TP, MacDonald F, Rindl PM, Bullock S. Fragile X syndrome is less common than previously estimated. *J Med Genet* 1997; 34:1-5.
 27. Perroni L, Grasso M, Argusti A, Lo Nigro C, Croci GF, Zelante L, et al. Molecular and cytogenetic analysis of the fragile X syndrome in a series of 453 mentally retarded subjects: a study of 87 families. *Am J Med Genet* 1996; 64:176-80.
 28. van den Ouweland AM, de Vries BB, Bakker PL, Deelen WH, de Graaff E, van Hemel JO, et al. DNA diagnosis of the fragile X syndrome in a series of 236 mentally retarded subjects and evidence for a reversal of mutation in the FMR-1 gene. *Am J Med Genet* 1994; 51:482-5.
 29. Hofstee Y, Arinami T, Hamaguchi H. Comparison between the cytogenetic test for fragile X and the molecular analysis of the FMR-1 gene in Japanese mentally retarded individuals. *Am J Med Genet* 1994; 51:466-70.
 30. Nanba E, Kohno Y, Matsuda A, Yano M, Sato C, Hashimoto K, et al. Non-radioactive DNA diagnosis for the fragile X syndrome in mentally retarded Japanese males. *Brain Devel* 1995; 17:317-21.
 31. Patsalis PC, Sismani C, Hettlinger JA, Boumba I, Georgiou I, Stylianidou G, et al. Molecular screening of fragile X (FRAXA) and FRAXE mental retardation syndromes in the Hellenic population of Greece and Cyprus: incidence, genetic variation, and stability. *Am J Med Genet* 1999; 84:184-90.
 32. De Boule K, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet* 1993; 3:31-5.
 33. Meijer H, de Graaff E, Merckx DML, Jongbloed RJE, de Die-Smulders CEM, Engelen JJM, et al. A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum Molec Genet* 1994; 3:615-20.
 34. Chiurazzi P, de Graaff E, Ng J, Verkerk AJ, Wolfson S, Fisch GS, et al. No apparent involvement of the FMR1 gene in five patients with phenotypic manifestations of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1994; 51:309-14.
 35. Feng Y, Lakkis L, Devys D, Warren ST. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am J Hum Genet* 1995; 56:106-13.
 36. Hirst MC, Grewal PK, Davies KE. Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1553-60.
 37. Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994; 77:853-61.
 38. Zhong N, Kajanoja E, Smits B, Pietrofesa J, Curley D, Wang D, et al. Fragile X founder effects and new mutations in Finland. *Am J Med Genet* 1996; 64:226-33.
 39. Zhong N, Liu X, Gou S, Houck GE, Jr., Li S, Dobkin C, et al. Distribution of FMR-1 and associated microsatellite alleles in a normal Chinese population. *Am J Med Genet* 1994; 51:417-22.
 40. Patsalis PC, Sismani C, Hettlinger JA, Holden JJA, Lawson JS, Chalifoux M, et al. Frequencies of "grey-zone" and premutation-size FMR1 CGG-repeat alleles in patient with developmental disability in Cyprus and Canada. *Am J Med Genet* 1999; 84:195-7.