



Korai petefészek-kimerülés (POF/POI) és a FRAXA betegség kapcsolatának vizsgálata az FMR1 gén CGG trinukleotid ismétlődés számának meghatározásával

BEKE ARTÚR DR.¹, PIKÓ HENRIETT DR.², GARAMVÖLGYI ZOLTÁN DR.¹, KARCAGI VERONIKA DR.², NYÍRÓ GÁBOR DR.³, NAGY BÁLINT DR.¹, MOLNÁR MÁRIA JUDIT DR.³, RIGÓ JÁNOS JR. DR.¹

¹Semmelweis Egyetem, I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika (Igazgató: Rigó János dr., egyetemi tanár)

²Országos Környezetegészségügyi Intézet, Molekuláris Genetika és Diagnosztikai Osztály (Vezető: Karcagi Veronika dr.)

³Semmelweis Egyetem, Molekuláris Neurológiai Klinikai és Kutatási Központ (Igazgató: Molnár Mária Judit dr., egyetemi tanár)

Összefoglalás: A korai petefészek-kimerülése (premature ovarian failure - POF), más néven primer petefészek-elégtelenség (primary ovarian insufficiency - POI) a fertilis korú nők reprodukciós esélyeit jelentősen befolyásolhatja.

Cél: Olyan molekuláris genetikai vizsgálati módszer bevezetése a POF/POI betegek rutin diagnosztikájában, amellyel pontos eredmény és megbízható predikció adható a betegség előfordulására. A korai petefészek-kimerülésben szenvedő betegek esetén az FMR1 gén promoter régiójában található (CGG)_n ismétlődések (repeat) szám növekedésének kimutatása, a premutációs állapot igazolása és a trinukleotid ismétlődés számának meghatározása az egyik vizsgálati célpont. További célkitűzésünk egy POF/POI regiszter létrehozása, amely a pontos molekuláris genetikai és a klinikai adatokat is tartalmazza, amellyel meghatározható lesz a hazai POF/POI beteg populációra vonatkozó kockázati tényezői.

Betegek és módszer: A I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika betegek között előforduló korai petefészek-kimerülés gyanúja miatt vizsgált 31 nőnél történt molekuláris genetikai vizsgálat. A korai petefészek-kimerülés kritériumai megfeleltek a nemzetközi protokolloknak: secunder amenorrhoea, a petefészek működés leállása a 40. életévig, FSH szint >40 IU/l két különböző mérés során és alacsony oestrogen szint. A betegeknél első lépésként Southern blot analízissel és azt követő radioaktívan jelzett DNS próbával történő hibridizálással vizsgáltuk az FMR1 promoter régiójában található CGG trinukleotid ismétlődéseket. A vizsgálati módszer alkalmas a premutációs és fullmutációs állapot kimutatására. A POF/POI betegekben az FMR1 gén premutációs állapottal járhat együtt. Minden esetben, amelyben Southern blottal igazoltuk a premutációs állapotot, elvégeztük az ún. Repeat Primed PCR (RP-PCR) módszert is, amellyel meghatároztuk a pontos CGG ismétlődés számot.

Eredmények: A vizsgált 31 beteg közül 3 esetben sikerült igazolni a CGG repeat szám kóros emelkedését, ez az esetek közel 10%-a (9,68%). A betegek átlagéletkora 37,9±7,8 év volt, a menses abbamaradásának átlagos időpontja 31,8±7,9 éves korban volt (min. 15 év, max. 39 év). Az általunk vizsgált betegeknél valamennyi kimutatott pozitív esetben a menses a 30-39 éves életkorban maradt el.

Következtetések: A korai petefészek kimerülés genetikai hátterének vizsgálata fontos a beteg és a családtagjai számára is, hiszen a vizsgálati eredmények nagyban befolyásolhatják a premutációt hordozók reprodukciós lehetőségeit és kihatással lehetnek családtervezésre.

Kulcsszavak: korai petefészek-kimerülés, elsődleges petefészek-elégtelenség, Fragilis X premutáció, genetikai vizsgálatok

BEKE A, PIKÓ H, GARAMVÖLGYI Z, KARCAGI V, NYÍRÓ G, NAGY B, MOLNÁR MJ, RIGÓ J JR:
**CGG Trinucleotid Repeat Number of FMR1 Gene and Correlation with
Premature Ovarian Failure (POF/POI) and FRAXA disease**

Summary: The premature ovarian failure (POF), also called primary ovarian insufficiency (POI) in women in fertile age can significantly influence the reproductive chances. **Objective:** Introduction of a molecular genetic test method in the routine diagnostics of the POF/POI patients by which accurate and reliable results can be predicted concerned about the disease. The main research targets in patients of premature ovarian failure are the detection of the increase in the number of (CGG)_n repeats in the FMR1 gene promoter region, confirmation of the premutation status and determination of the trinucleotide repeat number. Further objective was to create a POF/POI register, also containing the precise molecular genetic and clinical data, which could be used to determine the risk factors of the domestic POF/POI patient population. **Patients and methods:** There was molecular genetic testing in 31 patients of the 1st Department of Obstetrics and Gynecology among the patients examined with suspected POF. Early ovarian depletion criteria were consistent with international protocols: secondary amenorrhea, ovarian failure up to the age of 40 years, levels of FSH > 40 IU/L in two different measurements, and low estrogen levels. As a first step the patients were tested by Southern blot analysis and we subsequently investigated the CGG trinucleotide repeats in the FMR1 promoter region by hybridization with radiolabeled DNA probes. The test method is suitable for the detection of pre-mutation and full mutation status. The FMR1 gene may be associated with pre-mutation status in POF/POI patients. In all cases, which confirmed the pre-mutation status by the Southern blot, we completed the so-called Repeat Prime PCR (RP-PCR) method used to determine the exact number of CGG repeats. **Results:** In 3 cases out of 31 patients we could verify the increase of the CGG repeat number, it is nearly 10% of the cases (9.68%). The median age of the patients was 37.9 ± 7.8 years, the average date of the menopause was at the age of 31.8 ± 7.9 (min. 15 years, max. 39 years). In all cases of our patients with positive detection the menstruation terminated at the age of 30-39 years. **Conclusions:** The genetic examination of the premature ovarian failure is very important for the patient and her family also, because the genetic results have serious influence on the reproductive possibilities and family planning of the premutation carriers.

Keywords: *premature ovarian failure, primary ovarian failure, Fragile X pre-mutation, genetic testing*

Napjainkban a nők családtervezési szándékai későbbre halasztódnak, és gyakori, hogy csak később teremtnének meg azok a feltételek, hogy a nő gyermeket vállalhasson. Szerencsére az esetek többségében ilyenkor is vállalható terhesség - a fokozottabb genetikai kockázat figyelembevételével. Azonban ez a későbbi gyermekvállalás lehetetlenné válhat, ha a petefészkek korai kimerülésével szembesülünk. Ilyenkor a nő petefészke korán kimerül, és már sem spontán, sem asszisztált reprodukciós eljárással nem képes teherbe esni. A korai petefészkek-kimerülés (premature ovarian failure - POF), újabban más néven primer petefészkek-elégtelenség (primary ovarian insufficiency - POI), egy olyan állapot, melyet amenorrhoea, alacsony ösztrogénszint, emelkedett gonadotropinszint jellemez és mindez a 40. életév előtt következik be.

A POF/POI betegség igen heterogén betegséggel, a pathomechanizmusa hátterében állhatnak chromosoma-rendellenességek, immunológiai, metabolikus, fertőzéses és iatrogén faktorok, valamint monogén öröklődésű rendellenességek is [1-2]. Jelenleg, a POF/POI betegség hátterében 25%-ban a iatrogen faktorok állnak, és több mint 50 %-ban még mindig nem ismert a pontos pathomechanizmus. Számos gén érintettséget írtak le a POF/POI betegséggel asszociálva (DIAP gén transzlokációja; BMP15 gén variáns; PGRMC1 gén variáns; komplex betegségek mint pl. a galaktozémia, marhan szindróma; ataxia-teleangiectasia; valamint más látszólagos betegségek mint pl. a FSH/LH rezisztencia, GH variáns), amelyek közül az FMR1 gén premutáció (CGG ismétlődés számának a növekedése) a legnagyobb gyakorisággal fordul elő (3-15%) [3].

Az FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) gén mutációi három különböző betegség kialakulásában játszanak szerepet: a fragilis X(A) szindróma, a korai petefészek-kimerülés (POF) és a fragilis X betegséghez társuló tremor/ataxia szindróma (FXTAS). A mentális retardációval járó fragilis X(A) betegség az FMR1 gén promoter régiójában található (CGG)_n ismétlődések expanziója ($n > 200$) ill. ezt követő hipermetilációja miatt alakul ki. A normál populációban 6-55 CGG triplet található, leggyakrabban 30. A fragilis X családfák vizsgálata során a CGG tripletek száma szempontjából két másik alléltípus került meghatározásra: a klasszikus fragilis X tüneteket nem okozó, ún. premutációs allél, ahol a CGG tripletek száma 55-200 közötti (premutációs állapot), illetve a klinikai tüneteket okozó, ún. teljes mutációs (fullmutáció) állapotú allélok, ahol a CGG tripletek száma >200 [4-5]. A premutációt hordozó POF/POI betegek vizsgálatával igazolták, hogy emelkedik a POF/POI kockázata, ha CGG repeat szám meghaladja a 40-et ill. ha az ún. szürke zóna tartományba (45-55) esik. Felvetődhet a kérdés, hogy hogyan játszhat szerepet az FMR1 génben található CGG ismétlődések megnövekedése a POF/POI betegség kialakulásában. A pontos pathomechanizmus még nem tisztázott teljesen, de számos hipotézis született. Ahhoz, hogy megérthessük az összefüggéseket, ismernünk kell az FMR1 gén által kódolt fehérje szerepét. Az FMR1 gén által kódolt fehérje (FMRP) nagy mennyiségben expresszálódik a ne-

uronokban, a magzati és felnőtt agyszövetben és a here szöveiben [6]. A FMRP fehérje szerepe a sejtben a következő: első lépésként a sejtmagba transzportálódik, ahol különböző fehérje és RNS molekulákkal kapcsolódva az ún. mRNS-protein komplexet alkotja, amely ezután a citoplazmába exportálódik. A citoplazmában az FMRP-mRNS fehérje komplex riboszómákhoz kapcsolódva befolyásolja az adott mRNS molekulák transzlációját, ezzel az adott gének kifejeződését is [7-8]. Kísérletekkel igazolták, hogy a premutációt hordozó FMR1 génről átíródott pre-mRNS nagy mennyiségben képződik és egy része sejtmagban marad (inklúziós testként azonosítható), ennek egyik következménye az FMRP fehérje mennyiségének csökkenése.

A fenti összefoglalóból egyértelműen kiderült, hogy mennyire fontos a POF/POI betegek CGG triplet expanzió irányában történő molekuláris genetikai vizsgálata. Ezért munkacsoportunk célul tűzte ki, hogy magyarországi POF/POI betegek mintáiban megvizsgáljuk az FMR1 gén CGG tripletjeinek számát, premutációs allélokot keresve, valamint hogy fenotípus és genotípus összehasonlítást tegyünk a CGG repeat szám és a POF/POI tünetek súlyossága között. Tervezett vizsgálataink Magyarországon hozzájárulnának ahhoz a nemzetközi kezdeményezéshez, amely célja a POF/POI kockázat meghatározása a CGG repeat szám alapján a különböző populációkban.

Betegek és módszer

A Semmelweis Egyetem I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika beteganyagában előforduló korai petefészek-kimerülés gyanúja miatt vizsgált betegeket vontuk be a tanulmányba, előzetes felvilágosítás és beleegyezés után. A vizsgálatba bevonás kritériumai a következők voltak: secunder amenorrhoea, a petefészek működésének leállása a 40. életévig, FSH-szint >40 IU/l két különböző mérés során és alacsony ösztrogénszint. Kizárás kritériumai voltak, ha a betegnél korábban mindkét petefészek állományát jelentősen érintő műtét történt, a petefészek működést károsító gyógyszeres kezelést alkalmaztak (cytostaticus kezelés).

A POF/POI betegek molekuláris genetikai vizsgálatát két módszerrel végeztük: hagyományos Southern blot analízis, amelyet radioaktívan jelölt DNS próbával (Stb12.3) történő hibridizálás követ, valamint a CGG ismétlődések pontos számának meghatározására az ún. CGG RP-PCR módszert alkalmaztuk (Amplidex, Asuragene).

A betegektől nyert vérmintából DNS-t izoláltuk, majd a genomiális DNS-t EcoRI és EagI restrikciós endonukleázokkal emésztettük 37°-on. Ezt követően Southern blot analízist végeztünk, a mintákat 0.7 % agaróz gélen 18 órán keresztül 40- V feszültségen futtattuk, amellyel a restrikciós endonukleázokkal emésztett DNS mintánkat méret szerint szétválasztottuk. Majd a minta DNS-t az agaróz gélből kapilláris elv alapján át blottoltuk a nitrocellulóz membránra és radioaktívan jelölt Stb12.3 DNS próbával (FMR1 gént specifikus) hibridizálást alkalmaztunk 65 C°-on. A módszer elve a random priming technikán alapul [9]. A nem kötődött radioaktív próba eltávolítása (65C°-on), növekvő erősségű oldatokkal történt. Packard Instant Imager készülékkel elvégeztük a fragmentumok radioaktív jeleinek gyors mérését; előzetes értékelését, majd a membránra Kodak XOMAT röntgen filmet tettünk és -100°-on 4-5 napig exponáltunk [9]. Az értékelésnél a normális fragment méretek a kontroll egészséges nőknél az aktív X kromoszóma esetében 2.8 kb-nál és az inaktív X kromoszómának megfelelően 5.2 kb-nél detektálhatóak.

Premutációs esetben a fragment hosszát 2.9-3.3 kb és 5.3-5.7 között mértük, amely az FMR1 gén expandált CGG számának a következménye [10]. A Southern blottal premutációt igazolt (pozitív) esetekben Repeat Primed (RP)-PCR technikával határoztuk meg a pontos CGG repeat számot. A genomiális DNS mintát 20 ng/μl koncentrációra hígítottuk, majd a PCR reakcióhoz 2 μl használtunk fel. A PCR reakciót három primerrel végeztük az FMR1 gén specifikus primerekkel (forward és reverse, FAM-mal jelölt) és egy ún. CGG repeat primerrel együttesen. A keletkezett PCR terméket kapilláris elektroforézissel választottuk szét méret

szerint és a fluoreszcens jel intenzitása alapján a termék mennyiségét is meghatároztuk. A módszer alkalmas továbbá a CGG ismétlődések között beékelődő AGG szekvenciák detektálására is, amely stabilizálja a CGG ismétlődést tartalmazó szekvenciákat, azaz minél több az AGG megszakítások száma, annál kisebb valószínűséggel fog növekedni az utód nemzedékben a CGG ismétlődések száma. A vizsgálatokat a TUKEB engedélye alapján végeztük. A statisztikai feldolgozásokat és a kiértékeléseket az FMR1AnalysisMacro version 2.1.1 programmal és Genemapper software-rel végeztük.

Eredmények

Összesen eddig 31 esetben végeztünk korai petefészek-kimerülés gyanúja miatt molekuláris genetikai vizsgálatot FMR1 génben és három esetben igazoltuk a premutációs státuszt, amely a betegek közel 10%-nak felelt meg (9,68%).

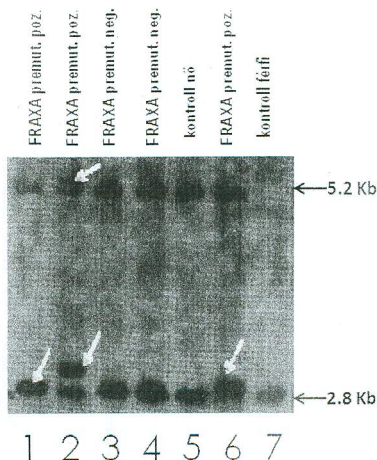
A betegek adatait az I. táblázatban foglaltuk össze. A betegek átlag életkora $37,9 \pm 7,8$ év volt, a menopausa átlagosan $31,8 \pm 7,9$ éves korban következett be (min. 15 év, max. 39 év). A betegek kétharmadának, összesen 21 esetben 30-39 év között maradt el a menstruációja (67,74%), míg 20-29 éves kor közötti és 20 éves korig bekövetkező menopausával 5-5 esetet vizsgáltunk (16,13%-16,13%).

A vizsgálatban résztvevő betegek adatai (n=31)			
	Átlag	SD	(min/max)
Életkor (év)	37,9	7,8	(18/50)
Testsúly (kg)	66,0	11,7	(52/90)
Testmagasság (cm)	167,0	7,2	(152/182)
BMI (kg/m ²)	23,7	3,9	(19/35)
Menopausa (év)	31,8	7,9	(15/39)

I. táblázat

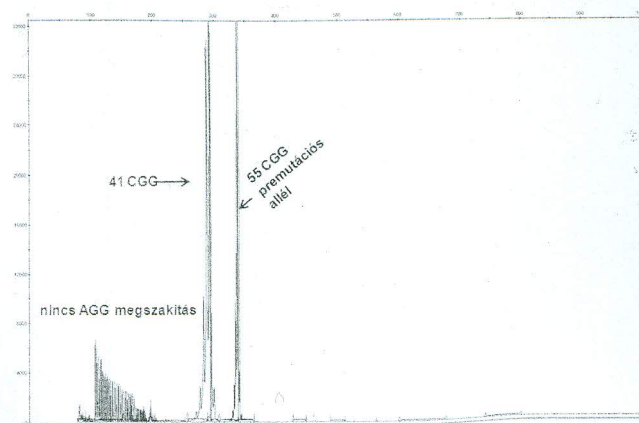
Vizsgáltuk a betegek testsúlyát, testmagasságát, a testtömeg indexe (BMI) átlagosan $23,7 \pm 3,9$ kg/m² volt. Normál tartományban volt a testsúly 23 betegnél (BMI: 18,5-24,99). Túlsúlyos volt (BMI 25-29,99) 5 beteg (16,13%), és elsőfokú elhízást (BMI: 30-34,99) találtunk 3 esetben (9,68%).

A molekuláris genetikai vizsgálatok során 3 esetben mutattunk ki premutációt, ez a betegek 9,68%-át jelenti. Az analíziseket két vizsgálati módszerrel végeztük. Első lépésben Southern blot technikával az FMR1 génre specifikus Stb12.3 radioaktívan jelölt DNS próbával történő hibridizálást végeztük el, amely módszerrel jól detektálható a premutációs és fullmutációs állapot (1. ábra).



1. ábra. Southern blot analízis képe Stb12.3 DNS próbával történő hibridizálás után. A piros nyilak a premutációs expandált CGG allélokot jelölik. A normális női mintában az aktív X kromoszómát 2.8 kb méretnél, míg az inaktív X kromoszómát 5.2 kb méretnél detektáljuk. A Southern blot képen az 1-es 2-es és 6-os mintánál premutációs állapotot igazoltunk, amely a POF/POI fenotípussal társult.

FRAXA PREMUTÁCIÓ POZ.



2. ábra. Repeat Primed PCR (RP-PCR) reakció. Az egyik FRAXA premutációra pozitív minta analízise látható, amelynél a premutációs állapotot igazoltunk Southern blot analízissel. A két nagy csúcs a 41 és 55 CGG (premutációs allél) ismétlődést tartalmazó allélokot jelöli. Az analízis során nem detektáltunk AGG megszakítást, így ebben az esetben a genetikai tanácsadáson fel kell hívni a figyelmet, hogy a következő nemzedékben növekedhet a CGG ismétlődések száma.

A pozitív esetekben a pontos CGG ismétlődés szám meghatározására került bevezetésre a Repeat Primed PCR (RP-PCR) technika, amely alkalmas repeat szám meghatározására a normális és premutációs állapotokban, valamint detektálja a fullmutációs állapotot (2. ábra).

Megbeszélés

Az alkalmazott és az újonnan bevezetett molekuláris genetikai módszerekkel lehetőségünk van pontos, megbízható eredményt adni a CGG trinukleotid számra vonatkozóan. Southern blot analízissel jól detektálható a pre- és fullmutációs esetek, míg az RP-PCR analízissel a pontos CGG ismétlődés határozható meg normál és premutációs állapotban. A POF/POI betegeknél kiemelkedő diagnosztikai szereppel bír a normális CGG szám meghatározása, mivel az ún. szürke zóna tartomány (44-55 CGG) jelenléte növeli a POF/POI betegség kockázatát [11-12].

Kiemelkedő szereppel bír továbbá az AGG megszakítások számának meghatározása a CGG ismétlődésen belül. Ha az AGG megszakítások száma 1 vagy 0, akkor számolni kell az utódokban bekövetkező CGG ismétlődés szám növekedésével, amely egy szürke zónát hordozó (44-55 CGG ismétlődés szám) édesanyánál mindenképpen növeli a FRAXA premutáció vagy fullmutáció kockázatát. Így azt mondhatjuk, hogy családtervezésnél a klinikai genetikusnak mindig figyelembe kell venni a pontos CGG ismétlődés számot, valamint az AGG megszakítások számát is ahhoz, hogy megbízható eredményt adjon a személyre szabott kockázatbecslésre vonatkozóan. Az RP-PCR technika alkalmazásával ezek a megszakítások is kimutathatóak és számszerűsíthetők, amellyel predikció adható az esetleges további nemzedékekben bekövetkező a CGG expanzió kockázatára. Ezért az emelkedett CGG repeat számot hordozó premutációs esetekben mindenképpen indokolt prenatálisan a CGG repeat szám meghatározás az esetleges fullmutációs, tünetekkel járó fragilis X szindróma diagnosztizálása céljából.

A továbbiakban a 4P medicina elvének figyelembe vételével (Personalized, Predictive, Preventive, Participatory) elsődleges célunk olyan diagnosztikai panel kialakítása, amely gyors, megbízható és költséghatékony módon ad **predikciót** a korai petefészek-kimerülés szindrómára már fiatal felnőtt korban. A korai felismerés fontos, mert a **személyre szabott** terápia csak akkor hatékony, ha a tünetek megjelenése előtt már **preventíve** elkezdődik (családtervezés,

Az általunk vizsgált betegeknél valamennyi kimutatott pozitív esetben a menses a 30-39 éves életkorban maradt el. A talált pozitív esetek valamennyien a normál testtömeg indexű betegek közé tartoztak.

adott esetben IFV, petesejt fagyasztás, petesejt donatio, később a korai menopauza tüneteinek kezelése). A molekuláris genetikai analízisekkel (pontos CGG ismétlődés szám és AGG megszakítás meghatározás) a személyre szabott kockázatbecslés is megvalósítható. A család vizsgálatával, a **személyes részvétellel** lehetővé válik az esetleges fullmutációs formák (FRAXA) felismerése a prenatális diagnosztika során, illetve a premutációs formákban a megfelelő neurológiai kivizsgálás és kezelés elindítása a betegséghez bizonyos esetekben társuló tremor/ataxia szindróma (FXTAS) irányában.

A korai petefészek kimerülés genetikai hátterének vizsgálata fontos a beteg és a családtagjai számára is, hiszen a vizsgálati eredmények nagyban befolyásolhatják a premutációt hordozók reprodukciós lehetőségeit és kihatással lehetnek családtervezésre. Ezért olyan új módszereket vezettünk be és alkalmaztunk, amellyel a POF/POI betegségek kockázatának molekuláris diagnózisa gyors és megbízható, valamint költségkímélő módon valósult meg. A transzlációs medicina lehetővé teszi továbbá, hogy a betegek pontos mutációjának ismeretében a munkacsoportunk hozzájárulhat a fenti betegek egészségügyi ellátási színvonalának javításához, a jövőbeni gyógyítás területén is, európai irányelvek megvalósításával. Jövőbeni terveink közé tartozik a POF/POI beteg regiszter létrehozása, továbbá egy nemzeti POF/POI centrum kialakítása, amellyel a regisztrált POF és FRAXA premutációs betegek számára tájékoztatást adunk az egészségügyi gondozás lehetőségeiről, valamint a legújabb kutatási eredményekről. Továbbá a megelőzés céljából új szűrőprogramok bevezetését tervezzük, amellyel a megfelelő terápiás lehetőségek hatékonysága is növelhető.

Köszönetnyilvánítás: Szeretnénk megköszöni nemrég elhunyt kollégánk, Dr. Szendei György segítségét, aki a Semmelweis Egyetem I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Endokrinológiai Ambulanciáját vezette és a betegek kivizsgálásában és vizsgálatra küldésében közreműködött. NYG és MMJ munkáját a TÁMOP 4.2.1B-09/1/KMR-2010-001 pályázat támogatta.

Irodalom

- [1] Laml T, Schultz-Lobmeyr I, Obruca A, Huber C, Hartmann BW. Premature ovarian failure: etiology and prospects. *Gynecol Endocrinol.* 2000;14:292-302.
- [2] Santoro N. Mechanisms of premature ovarian failure. *Ann Endocrinol.* 2003;64:87-92.
- [3] Persani L, Rossetti R, Cacciatori C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol.* 2010; 45:257-279.
- [4] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 1991; 65:905-14.
- [5] O'Donnel TW, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci.* 2002; 25:315-38.
- [6] Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991; 66:817-22.
- [7] Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST. Human and murine FMR-1: alternate splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat. Genet.* 1993; 4:244-51.
- [8] Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991; 67:1047-58.
- [9] Sambrook J, Russel D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. Third Edition. 2001. Cold Spring Harbor, New York.
- [10] Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet.* 1992.29:794-801.
- [11] Hagerman JP, Hagerman JR. The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. *Am J Hum Genet.* 2004; 74:805-816.
- [12] Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;97:189-194.

Levelezés:

Beke Artúr dr.

Semmelweis Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

1088 Budapest, Baross u. 27.

e-mail: beke.artur@noi1.sote.hu