



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Zanda Daneberga

TRAUSLĀS X HROMOSOMAS
SINDROMS PACIENTIEM AR
GARĪGO ATPALICĪBU LATVIJĀ

Promocijas darba
kopsavilkums

Specialitāte – Medicīniskā ģenētika

Rīga, 2011

Promocijas darbs izstrādāts: VSIA Bērnu klīniskā universitātes slimnīca,
Medicīniskās ģenētikas klīnika

Darba zinātniskā vadītāja: *Dr. med. asoc. prof. Rīta Lugovska*, VSIA Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, Medicīniskās ģenētikas klīnika, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra

Darba zinātniskā konsultante: *Dr. med. Baiba Lāce*, VSIA Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, Medicīniskās ģenētikas klīnika, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Oficiālie recenzenti:

Dr. biol. asoc. prof. Edvīns Miklaševičs, Rīgas Stradiņa universitāte

Dr. habil. biol. prof. Nikolajs Sjakste, Latvijas Universitāte, Medicīnas fakultāte

Dr. med. asoc. prof. Jurate Kasnauskiene, Viļņas Universitāte, Medicīnas fakultāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011. gada 21. decembrī plkst. 14.00 Rīgas Stradiņa universitātes Teorētiskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājaslapā:
www.rsu.lv

Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu



Promocijas padomes sekretāre:

Dr. habil. med. profesore Līga Aberberga-Augškalne

SATURA RĀDĪTĀJS

1.	IEVADS.....	6
1.1.	Darba mērķis.....	8
1.2.	Darba uzdevumi.....	8
1.3.	Pētījuma zinātniskā novitāte.....	9
1.4.	Pētījuma praktiskā novitāte.....	9
1.5.	Autora ieguldījums pētījumā.....	10
1.6.	Darba izstrāde.....	10
1.7.	Darba struktūra un apjoms.....	11
2.	MATERIĀLS UN METODES.....	11
2.1.	Pacienti.....	11
2.1.1.	Trauslās X hromosomas sindroma prevalence.....	11
2.1.2.	CGG trinukleotīdu variācija.....	12
2.1.3.	Gadījumu-kontroles pētījums.....	12
2.1.4.	Genotipa-fenotipa korelācija.....	13
2.2.	Molekulārās metodes.....	13
2.2.1.	DNS izdalīšana.....	13
2.2.2.	Rutīns skrīnings, izmantojot PĶR.....	14
2.2.3.	Fluorescenta PĶR.....	14
2.2.4.	Sauzerna hibridizācija.....	14
2.2.5.	AGG iestarpinājumu struktūras analīze.....	15
2.2.6.	Viena nukleotīda polimorfisma analīze.....	16
2.2.7.	Haplotipu analīze.....	16
2.3.	Datu statistiska apstrāde.....	18
3.	REZULTĀTI.....	19
3.1.	Trauslās X hromosomas sindroma prevalence.....	19
3.2.	CGG trinukleotīdu variācija.....	21

3.3.	ATL1 SNP.....	21
3.4.	Pelēkās zonas alēļu atkārtojumu struktūra.....	23
3.5.	DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2 haplotipi.....	24
3.6.	AMOVA.....	28
3.7.	Genotipa-fenotipa korelācija.....	28
4.	DISKUSIJA.....	31
4.1.	Trauslās X hromosomas sindroma prevalence.....	31
4.2.	CGG trinukleotīdu variācija.....	32
4.3.	ATL1 SNP.....	33
4.4.	Pelēkās zonas alēļu atkārtojumu struktūra	33
4.5.	DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2 haplotipi.....	34
4.6.	Genotipa-fenotipa korelācija.....	37
5.	SECINĀJUMI.....	39
6.	PUBLIKĀCIJAS.....	40
7.	PATEICĪBAS.....	42
8.	LITERATŪRAS SARAKSTS.....	44

SAĪSINĀJUMI

AMOVA – molekulārās variācijas analīze

ARVI – akūta respiratora vīrusa infekcija

bp – bāzu pāris

CGG – citozīns-guanīns-guanīns

CNS – centrālā nervu sistēma

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

EDTA – etilēndiamintetraetiķskābe

FXS – trauslās X hromosomas sindroms

GA – garīga atpālicība

IQ – inteliģences koeficients

PKR – polimerāzes ķēdes reakcija

PWS – Prādera-Villija sindroms

RF – relatīvais sastopamības biežums

SNP – viena nukleotīda polimorfisms

STR – īsi tandēmi atkārtojumi

1. IEVADS

Garīgā atpalcība (GA) ir komplekss fenotips, kuram raksturīga centrālās nervu sistēmas (CNS) darbības traucējumi, kas negatīvi ietekmē intelektuālās funkcijas un adaptīvo uzvedību. Garīgā atpalcība skar vidēji 2–3% populācijas. Ceturtajai daļai gadījumu pamatā ir ģenētiska slimība. Garīgā atpalcība ir biežākais iemesls smagai bērna invaliditātei. Tāpēc garīgās atpalcības iemeslu izziņāšana ir nozīmīgs uzdevums pediatrijā.

Trauslās X hromosomas sindroms (FXS; MIM #300624; FRAXA, Xq27.3) ir labi zināms un biežs ar X hromosomu saistīts garīgās atpalcības iemesls. Trauslās X hromosomas sindroma pamatā ir dinamiska CGG atkārtojumu skaita mutācija (pilna mutācija > 200 atkārtojumi) *FMRI* gēna 5' galā. Mutācijas rezultātā notiek gēna CpG salas metilēšana un transkripcijas izslēgšana (Oberle et al, 1991; Poustka et al, 1991; Rousseau et al, 1991).

Kopējā populācijā polimorfi CGG atkārtojumi variē no 6 līdz 50 atkārtojumiem un parasti satur AGG iestarpinājumus pēc katriem 9–10 atkārtojumiem (Eichler et al, 1996; Fu et al, 1991). Premutētas alēles satur mēreni palielinātu atkārtojumu skaitu (no 50 līdz 200 atkārtojumiem), tās ir nemetilētas aktīvajā X hromosomā un neietekmē *FMRI* gēna ekspresiju. CGG atkārtojumu skaita spontāna palielināšanās ir pamatā CpG salas metilēšanai, kas noved pie *FMRI* gēna aktivitātes zuduma (de Vries et al, 1998). Vidējās jeb pelēkās zonas alēles ir definētas neprecīzi. Pelēkās zonas CGG atkārtojumu skaita robežas dažādos pētījumos variē no 34 vai 35 atkārtojumiem zemākajai robežai līdz 58–60 atkārtojumiem augstākai pelēkās zonas robežai (Moutou et al, 1997; Rife et al, 2004; Sherman et al, 2005). Šīs alēles parasti tiek pārmantotas stabili, bet ar iespējamu nestabilitāti atkārtojuma skaita pavairošanai pelēkās zonas robežās.

Dinamiskās mutācijas mehānisms nav pilnībā izprasts un joprojām ir aktuāla zinātnisko diskusiju tēma. Palielināta atkārtojumu skaita nesēja

dzimums (mātes imprintings), atkārtojumu skaits (dinamiska mutācija) un AGG iestarpinājumu trūkums garās, nepārtrauktās CGG atkārtojumu secībās tiek aprakstīti kā trīs galvenie nestabilitāti izraisošie faktori (Dombrowski et al, 2002; Eichler et al, 1996; Rife et al, 2004). Mikrosatelītu marķieri DXS548-FRAXAC1-FRAXAC2 un ATL1 SNP iepriekš aprakstīti kā ar *FMRI* CGG atkārtojumu nestabilitāti saistīti marķieri (Eichler et al, 1996; Gunter et al, 1998; Kunst et al, 1996; Macpherson et al, 1994; Murray et al, 1997; Oudet et al, 1993; Richards et al, 1991).

Ar FXS saistītie haplotipi ir plaši pētīti un aprakstīti Rietumeiropas un Skandināvijas populācijās, tomēr mazāk ir zināms par Ziemeļaustrumeiropas populācijām, tostarp par Baltijas valstu populācijām. Šis ir pirmais ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu pētījums Baltijas valstu reģionā.

FXS pirmās klīniskās pazīmes parasti ir psihomotorās attīstības aizture, kā arī dažādas pakāpes valodas attīstības traucējumi, īpaši ekspresīvās valodas traucējumi (valoda ierobežota trīs četros teikumos). Daudziem FXS pacientiem primāri konstatē autiskā spektra traucējumu pazīmes – izvairīšanos no acu kontakta, kautrīgumu, roku stereotipas kustības, košanu, sišanu (Bardoni et al, 2000; Garber et al, 2008; Hernandez et al, 2009).

Bērniem agrīnā vecumā sindroma fenotipiskās pazīmes ir neizteiktas un attīstās līdz ar gadiem. Pacientiem ar FXS raksturīgās fenotipiskās pazīmes ir: pirkstu locītavu hiperelastīgums, *pectus excavatum*, mitrālā vārstuļa prolaps un strabisms (de Vries et al, 1996; Larbrisseau et al, 1982; Phadke 2005). Klīniskās fenotipiskās pazīmes pieaugušiem vīriešiem ir: garena un šaura seja ar augstu pieri un izteiktu zodu, lielām, atkarenām ausīm, palielināts locītavu kustīgums, kā arī vienpusēji vai abpusēji palielināti sēklinieki. Būtiska pēcpubertātes vecuma pazīme ir makroorhīdisms, kas ir specifiska FXS pazīme, bet nav novērojama visiem vīriešiem ar FXS. Sindromam raksturīgais sejas dismorfisms nav novērojams vidēji 25–30% FXS pacientu. Mazāk nozīmīgas,

bet tomēr novērojamas pazīmes ir: liels augums, maiga un samtaina āda, plati roku pirkstu gali un plakanā pēda (Ridaura-Ruiz et al, 2009).

Ir ļoti būtiski agrīni diagnosticēt trauzlās X hromosomas sindromu, lai informētu citus ģimenes locekļus par iespējamo slima pēcnācēja risku. Šī iemesla dēļ FXS DNS diagnostisko testu ir ieteicams veikt plašai pacientu grupai, lai gan iespējams zems diagnosticēto pacientu skaits.

FXS molekulārās diagnostikas desmit gadu pieredze Latvijā un nelielais diagnosticēto pacientu skaits šajā laika posmā atklāj zemu sindroma noteikšanas līmeni un norāda uz nepietiekamu klīnisko simptomu atpazīstamību.

1.1. Darba mērķis

Noskaidrot trauzlās X hromosomas sindroma sastopamības biežumu Latvijā, raksturot FRAXA lokusa *FMRI* gēna ģenētisko un klīnisko daudzveidību pacientiem ar neskaidras etioloģijas garīgo atpalicību.

1.2. Darba uzdevumi

1. Noteikt trauzlās X hromosomas sindroma sastopamības biežumu Latvijas vīriešu populācijā.
2. Veikt CGG atkārtojumu sadalījuma un struktūras pētījumu X hromosomām ar normālu CGG atkārtojumu skaitu.
3. Raksturot AT11 SNP/CGG atkārtojumu skaita korelāciju hromosomām ar normālu CGG atkārtojumu skaitu un hromosomām ar pilnu mutāciju.
4. Veikt gadījumu-kontroles pētījumu ar *FMRI* gēnu saistītiem haplotipiem, balstītiem uz STR un SNP marķieriem, lai noteiktu specifiskus haplotipus Latvijas FXS pacientiem un kontroles grupas pacientiem ar garīgo atpalicību un normālu CGG atkārtojumu skaitu attiecībā pret alēļu nestabilitāti.

5. Noteikt pelēkās zonas alēļu struktūras un ar *FMRI* saistīto haplotipu savstarpējo saistību.
6. Izvērtēt genotipa-fenotipa korelāciju pacientiem ar pilnu mutāciju un/vai atkārtojumu skaita/metilēšanas mozaïcismu.

1.3. Pētījuma zinātniskā novitāte

Šis pētījums ir pirmais ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu pētījums Baltijas valstu reģionā. Pētījumā noskaidrotie un raksturotie Latvijas trauzlās X hromosomas sindroma pacientu haplotipi atšķiras no Rietumeiropas izcelsmes populāciju publicētajiem datiem. Mūsu pētījuma rezultāti atklāj pierādījumus atšķirīgam CGG atkārtojumu skaita mutācijas ceļam Ziemeļaustrumeiropas reģionā.

Noteiktā trauzlās X hromosomas sindroma prevalence Latvijas vīriešu populācijā veicina šā sindroma izplatības noskaidrošanu mūsu ģeogrāfiskajā reģionā.

1.4. Pētījuma praktiskā novitāte

Noteiktā trauzlās X hromosomas sindroma prevalence Latvijas vīriešu populācijā būtiski neatšķiras no sindroma prevalences vairākās citās Eiropas populācijās. Zemais diagnosticēto pacientu skaits ar trauzlās X hromosomas sindromu desmit gadu laikā norāda uz zemo pacientu atpazīšanas līmeni un atlasī diagnostikai pediatrijā, bērnu psihiatrijā un bērnu neiroloģijas praksē.

Noteiktie ar CGG atkārtojumu skaita nestabilitāti saistītie haplotipi, kas raksturīgi Latvijas FXS vīriešu populācijā, ir ļoti nozīmīgi praktiskajā ģimenes kaskādes testēšanā un riska ģimeņu konsultēšanā.

Balstoties uz literatūras apskatu, sagatavotā klīnisko simptomu aptaujas lapa palīdzēs palielināt atlasīto pacientu skaitu ar aizdomām par trauzlās X hromosomas sindromu pediatrijā, bērnu psihiatrijā un bērnu neiroloģijas praksē.

1.5. Autora ieguldījums pētījumā

Šis doktora studiju pētījums tika sākts 2005. gadā, balstoties uz zinātniskām iestrādņēm LZP Sadarbības projektā “Latvijas populācijas genofonda pētījumi un to izmantošana cilvēka patoloģijas diagnostikā un profilaksē”.

Īstenojot pētījumu, darba autore veikusi DNS izdalīšanu (daļēji); rutīnu skrīningu ar PĶR metodi; fluorescentu PĶR ar sekojošu fragmentu garuma analīzi; Sauzerna hibridizāciju (daļēji); ATL1 SNP analīze; AGG iestarpinājumu struktūras analīzi; mikrosatelītu fluorescentu PĶR ar sekojošu fragmentu garuma analīzi. Darba autore veikusi retrospektīvu datu apkopošanu un analīzi prevalences pētījumam. Visa datu statistiskā apstrāde un AMOVA ir darba autores veikums.

Pacientu klīnisko atlasu un klīnisko novērtējumu veikuši klīniskie ģenētiķi un bērnu psihiatri.

1.6. Darba izstrāde

Pētījums izstrādāts Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas (BKUS) Medicīniskās ģenētikas klīnikā sadarbībā ar BKUS Bērnu psihiatrijas klīniku Rīgā, Latvijā.

Diagnozes apstiprināšana ar Sauzerna hibridizācijas metodi veikta Ulevolas (*Ullevål*) universitātes slimnīcas Medicīniskās ģenētikas nodaļas DNS laboratorijā Oslo, Norvēģijā un Neimegenas Universitātes medicīnas centra DNS laboratorijā Neimegenā, Nīderlandē.

Latvijas Centrālā medicīnas ētikas komiteja un Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas ētikas komiteja apstiprinājusi šo pētījumu.

1.7. Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts uz 124 lappusēm angļu valodā pēc klasiskas darba struktūras. Darbs strukturēts desmit nodaļās: Ievads; Literatūras apskats; Materiāls un metodes; Rezultāti; Diskusija; Secinājumi; Publikācijas; Pateicības; Literatūras saraksts un Pielikumi. Promocijas darba teksts papildināts ar 19 tabulām, 19 attēliem un 14 pielikumiem. Literatūras saraksts sastāv no 131 literatūras avota.

2. MATERIĀLS UN METODEDES

2.1. Pacienti

2.1.1. Trauslās X hromosomas sindroma prevalence

Prevalences noteikšanai izmantoti retrospektīvi dati par pacientu genotipiem, analizētiem BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnikā laika posmā no 1998. gada līdz 2007. gadam.

Visi pacienti saņēmuši klīniskā ģenētiķa vai bērnu psihiatra konsultāciju BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnikā, BKUS Bērnu psihiatrijas klīnikā vai Bērnu aprūpes centrā Rīgā, Latvijā un nosūtīti trauslās X hromosomas sindroma diagnozes izslēgšanai/apstiprināšanai.

Tika izvēlēti šādi iekļaušanas kritēriji:

- pacienti ar dažādas pakāpes garīgo atpalicību ar vai bez dismorfiskām iezīmēm;
- GA pacienti ar autismu, autiska spektra iezīmēm un jebkura veida uzvedības traucējumiem;
- genotipa dati ar precīzi zināmu CGG atkārtojumu skaitu.

Izslēgšanas kritēriji pacientu atlasei bija šādi:

- pacienta dzimums (sieviete);
- asinsradniecība;

- monogēnās, hromosomālās un metabolās slimības.

Pacientu klīniskos simptomus novērtēja un anamnēzi vāca klīniskie ģenētiķi. Pacientu tautība šajā pētījumā netika ņemta vērā.

Balstoties uz ieslēgšanas/izslēgšanas kritērijiem, prevalences pētījumam tika atlasīti 374 anonīmu, neradniecīgu vīriešu dzimuma pacientu dati. Pacientu vecums molekulārās diagnostikas brīdī variēja no diviem līdz septiņpadsmit gadiem.

2.1.2. CGG trinukleotīdu variācija

Normāla CGG atkārtojumu skaita alēļu sadalījuma noteikšanai izmantoti retrospektīvi dati par pacientu genotipiem, analizētiem BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnikā laika posmā no 1998. gada līdz 2007. gadam. Balstoties uz ieslēgšanas/izslēgšanas kritērijiem, prevalences pētījumam tika atlasīti 374 anonīmu, neradniecīgu vīriešu dzimuma pacientu dati. Mūsaprāt, dati ir savstarpēji salīdzināmi, jo visiem 374 paraugiem veikts gan rutīns skrīnings ar PĶR, gan fluorescēta PĶR precīzai atkārtojuma skaita noteikšanai pēc *Applied Biosystems* protokola.

2.1.3. Gadījumu-kontroles pētījums

Vadoties pēc ieslēgšanas/izslēgšanas kritērijiem, ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu gadījumu-kontroles pētījuma kontroles grupai tika atlasīti 122 neradniecīgi vīriešu dzimuma pacienti ar normālu CGG atkārtojumu skaitu.

Tika izvēlēti šādi iekļaušanas kritēriji:

- vecāki vai pacienta likumīgie pārstāvji parakstījuši piekrišanu daļībai pētījumā saskaņā ar Ētikas komitejas atļauju;
- genotipa dati – CGG atkārtojumu skaits normas robežās;
- pacienti ar dažādas pakāpes garīgo atpalicību ar vai bez dismorfiskām iezīmēm;

- GA pacienti ar autismu, autiska spektra iezīmēm un jebkura veida uzvedības traucējumiem.

Izslēgšanas kritēriji kontroles grupas atlasei bija šādi:

- pacienta dzimums (sieviete);
- asinsradniecība;
- monogēnās, hromosomālās un metabolās slimības.

Gadījuma grupu veidoja 11 neradniecīgi pacienti ar apstiprinātu traušlās X hromosomas sindroma diagnozi (pilna mutācija). Vecāki vai pacienta likumīgie pārstāvji parakstījuši piekrišanu dalībai pētījumā saskaņā ar Ētikas komitejas atļauju.

2.1.4. Genotipa-fenotipa korelācija

Genotipa-fenotipa korelācija izvērtēta 12 vīriešu dzimuma pacientiem, kuriem traušlās X hromosomas sindroms diagnosticēts laika periodā no 1998. līdz 2010. gadam. Šajā pētījuma grupā tika iekļauti arī radniecīgi pacienti. Pacientu vecums diagnozes brīdī variēja no diviem līdz sešpadsmit gadiem (vidēji = $7,33 \pm 4,46$). Klīniskā informācija iegūta, klīniskajiem ģenētiķiem un bērnu psihietriem izvērtējot pacientu slimības vēstures. Antropometriskie mērījumi veikti, vadoties pēc “*Smith recognizable patterns*” un Krūmiņas, Kokares un Biķa (2007) aprakstītās metodoloģijas. Autiska spektra traucējumi izvērtēti, vadoties pēc ADOS (*Autism Diagnostic Observation Schedule*).

2.2. Molekulārās metodes

2.2.1. DNS izdalīšana

Pieci mililitri perifēro asiņu savākti stobriņā ar EDTA konservantu. Pirms DNS izdalīšanas asinis sasaldētas un uzglabātas -20 °C. DNS izdalīts, izmantojot “*Genomic DNA Purification Kit*” (*Fermentas, Lietuva*), vadoties pēc ražotāja protokola.

2.2.2. Rutīns skrīnings, izmantojot PĶR

CGG atkārtojumu pavairošanai *FMRI* gēnā izmantoti praimerī ar secībām atbilstoši 212–241 un 599–571 pozīcijai plazmīdas Ep5.1 1kb *PstI* fragmentā, kas satur CpG salas CGG atkārtojumu rajonu. PĶR reakcija veikta, vadoties pēc *Chong et al* (1994) publicētā protokola.

2.2.3. Fluorescenta PĶR

Precīzai CGG atkārtojuma skaita noteikšanai izmantota fluorescenta PĶR, vadoties pēc *Applied Biosystems* (ASV) protokola. Reakcija veikta, izmantojot uz vietas sagatavotus reakcijas maisījumus. Reakcijai izmantots vidēji 100 diploīdu genoma DNS kopiju atšķaidījums uz mikrolitru (0,67 ng). Reakcija veikta, izmantojot *Hot start* tehniku ar *Aml Wax* (*Applied Biosystems*, ASV).

PĶR produkti elektroforētiski sadalīti, izmantojot kapilāro elektroforēzi ar *ABI Prism*[®] 310 ģenētisko analizatoru, pēc diviem atšķirīgiem elektroforēzes parametriem.

Iegūto fragmentu garumi analizēti ar *GeneScan*[™] programmu (*Applied Biosystems*, ASV). Atbilstošo smaiļu garums aprēķināts pēc *Fragile X size Standard* (50 bp–2500 bp) kalibrācijas līknes. Apolipoproteīna E (*ApoE*) gēna CG bagāts reģions izmantots kā reakcijas kontrole. *ApoE* fragmenta klātbūtne reakcijas produktā liecina par veiksmīgu reakcijas norisi un DNS kvalitāti.

2.2.4. Sauzerna hibridizācija

FXS diagnoze apstiprināta veicot atkārtojumu skaita noteikšanu ar Sauzerna hibridizācijas metodi, izmantojot šķelšanu ar metilēšanas jutīgiem šķelšanas enzīmiem, vadoties pēc iepriekš aprakstītā protokola (*Dracopoli and Haines*, 1994).

Analīzei izmantoti 4–6 µg genoma DNS. Lai noskaidrotu atkārtojumu skaitu, veiktas divas šķelšanas reakcijas ar atšķirīgiem enzīmiem – EagI/EcoRI (metilēšanas specifisks) un PstI. Produkti sadalīti 0,8% agarozes gelā (pie ~ 0,35 V/cm, uz nakti) un pēc kapilārās pārnese principa pārnesti uz pozitīvi lādētu neilona membrānu. DNS fragmentu noteikšanai izmantota iezīmēta [³²P] StB12.3 hibridizācijas prove. Neiezīmēta StB12.3 prove iegūta no prof. *J. L. Mandel*, Strasbūra. Proves radioaktīva iezīmēšana veikta pēc jau aprakstītā protokola (Sambrook and Russell, 2001). Izmeklējumi veikti Ulevolas universitātes slimnīcas Medicīniskās ģenētikas nodaļas DNS laboratorijā Oslo, Norvēģijā.

Diagnozes apstiprināšana pacientiem un viņu ģimenes locekļiem ar Sauzerna hibridizācijas metodi un pAO365 provi veikta Neimegenas Universitātes medicīnas centra DNS laboratorijā, Neimegenā, Nīderlandē.

2.2.5. AGG iestarpinājumu struktūras analīze

Divdesmit sešām pelēkās zonas alēlēm (35–50 CGG atkārtojumi) analizēta CGG atkārtojumu struktūra. AGG iestarpinājumi noteikti, veicot CGG secību tiešo sekvenēšanu. CGG atkārtojumi un apkārt esošās DNS secības pavairotas, izmantojot genoma DNS un *Pfu* polimerāzi (*Fermentas*, Lietuva), pēc iepriekš aprakstīta PĶR protokola (Chong et al, 1994). PĶR produkts sadalīts 2,5% agarozes gelā pie 5,5 V/cm 60 min, lai pārlicinātos par viena fragmenta klātbūtni. Pēc tam produkts koncentrēts un attīrīts ar *Montage PCR* centrālās filtru (*Millipore*, ASV) izmantošanai sekvenēšanas reakcijai.

Sekvenēšanas reakcija veikta, izmantojot *BigDye[®] Terminator v3.1 kit* (*Applied Biosystems*, ASV), vadoties pēc ražotāja protokola.

Visi sekvenēšanas reakcijas produkti analizēti ar *ABI Prism[®] 310* ģenētisko analizatoru, izmantojot 61 cm x 50 µm (50 cm *well-to-read*) kapilāru ar POP-6™ polimēru. Izejas dati analizēti ar *ABI DNA™* programmu.

CGG atkārtojumu secības struktūra nolasīta no pirmā eksona 5' netranslējamā rajona. DNS secība noteikta, vizuāli interpretējot elektroferogrammu. Nukleotīdi noteikti, balstoties uz augstāko fluorescences signālu katrā pozīcijā, pieņemot, ka nukleotīda smaile pārsniedz fona līmeni. Lai aprakstītu *FMR1* gēna struktūru, CGG atkārtojumi apzīmēti ar atbilstošu skaitli, bet AGG iestarpinājumi apzīmēti kā “+”.

2.2.6. Viena nukleotīda polimorfisma analīze

ATL1 polimorfisms (alēles A/G, lokalizētas 5613bp aiz CGG atkārtojumiem) analizēts, izmantojot alēles-specifisku oligonukleotīdu PĶR pēc *Dombrowski et al* (2002) aprakstīta protokola. PĶR produkti vizualizēti 1% agarozes gelā, krāsotā ar etīdija bromīdu. 385 bp gara PĶR produkta klātbūtne tika interpretēta kā pozitīvs rezultāts specifiskai alēlei. PĶR produkta trūkums tika interpretēts kā negatīvs rezultāts specifiskai alēlei. ATL1 polimorfismi identificēti pēc divām alēles specifiskām reakcijām katrai hromosomai.

2.2.7. Haplotipu analīze

Normālo un mutanto hromosomu haplotipu analīzei izmantoti DXS548, FRAXAC1 un FRAXAC2 mikrosatelītu marķieri. Genoma DNS DXS548 mikrosatelīts lokalizēts 189895bp aiz CGG atkārtojumiem. FRAXAC1 mikrosatelīts atrodas 7221bp aiz CGG atkārtojumiem, un FRAXC2 mikrosatelīts atrodas 12418bp pirms CGG atkārtojumiem.

Vienā reakcijas maisījumā ar fluorescentu PĶR metodi pavairoti DXS548 un FRAXAC2 marķieri, balstoties uz *Chiurazzi et al* (1999) aprakstītā protokola. FRAXA1 pavairots atsevišķā reakcijas maisījumā, izmantojot tādus pašus reakcijas apstākļus. Sintētisko oligonukleotīdu secības izmantotas pēc *Chiurazzi et al* (1999) aprakstītā protokola.

produkti analizēti ar *ABI Prism*[®] 310 ģenētisko analizatoru, izmantojot 61 cm x 50 μm (50 cm *well-to-read*) kapilāru ar POP-6TM polimēru. Izejas dati analizēti ar *ABI DNA*TM programmu.

Sekvenēšanas rezultāti atklāja genotipēšanā iegūto fragmentu garumu atšķirību no *Macpherson et al* (1994) aprakstītās nomenklatūras. Tāpēc alēļu nomenklatūra tika piemērota, balstoties uz atkārtojumu skaitu mikrosatelītu marķieru secībā. Atšķirības konstatētas FRAXAC1 un DXS548 lokusiem. FRAXAC2 lokusa alēļu fragmentu garumi atbilda iepriekš aprakstītajiem. DXS548 lokusa fragmenti ar garumu 193 bp un 192 bp apzīmēti kā alēle 6, jo abi fragmenti saturēja 20 CA atkārtojumus. 1bp atšķirības pamatā ir viena papildus nukleotīda G klātbūtne tālākajā fragmenta secībā.

Haplotipi izveidoti, apvienojot katras hromosomas mikrosatelītu marķierus un viena nukleotīda polimorfismu secībā pēc to novietojuma FRAXA lokusā. Haplotipi noformēti šādi: DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2.

2.3.Statistiskā datu apstrāde

AMOVA analīze, visu polimorfismu heterozigozitātes līmenis un fiksācijas indeksa (*Fst*) aprēķini veikti ar *Arlequin 3.5* programmu (Excoffier and Lischer, 2010). Haplotipu analīzes rezultātu nozīmīgums pārbaudīts ar 10 000 permutāciju. *Fst* kritiskās vērtības noteikšanai izmantots interaktīvs statistikas kalkulators *BioKin, Ltd*. Brīvības pakāpju skaitītājs noteikts 1. Saucējs tika noteikts 132.

Divdesmit septiņu haplotipu (iegūtiem no kopējām 133 hromosomām) analīze veikta, sadalot populāciju divās apakšgrupās, balstoties uz normālām/mutantām FRAXA alēlēm.

Gadījumu-kontroles pētījuma datu analīzē izmantots Fišera (*Fisher*) tests 2x2 tabulām un χ^2 tests, izmantojot interaktīvo *GraphPad QuickCalcs* kalkulatoru. Rezultātu statistiskās ticamības izvērtēšanai *p* vērtība 0,05 tika

uzskatīta par divpusējo testu rezultātu statistiskās ticamības sliekšni. Lai mazinātu statistiskās α kļūdas iespējamību, multipliem salīdzinājumiem izmantota Bonferoni (*Bonferroni*) korekcija (Bland and Altman, 1995). Attiecīgi četru marķieru haplotipu gadījumā p vērtība noteikta zemāka nekā 0,0125.

Rezultātu 95% ticamības intervāla aprēķināšanai izmantots interaktīvs *GraphPad QuickCalcs* kalkulators. Proporciju 95% ticamības intervāla aprēķināšanai izmantota modificētā Valda (*Wald*) metode pēc *Agresti* un *Coull* (1998).

Prevalences noteikšana retrospektīvā pētījumā balstīta uz Centrālā statistikas biroja datiem un datiem, kas iegūti šajā pētījumā.

Prevalence uz 100 000 vīriešiem aprēķināta šādi:

$$\text{Prevalence} = \left[\frac{\text{diagnosticētais pacientu skaits laika periodā}}{\text{vidējais vīriešu skaits populācijā laika periodā}} \right] \times 100\,000$$

Prevalence, izteikta kā viens diagnosticēts pacients pret vīriešu skaitu populācijā, aprēķināta šādi:

$$\text{Prevalence} = \frac{\text{vidējais vīriešu skaits populācijā laika periodā}}{\text{diagnosticētais pacientu skaits laika periodā}}$$

3. REZULTĀTI

3.1. Trauslās X hromosomas sindroms

Retrospektīvā pētījumā noteikta trauslās X hromosomas sindroma prevalence vīriešu dzimuma pacientiem ar psihomotorās attīstības aizturi un dažādas pakāpes garīgu atpalcību. Pētījumā iekļauti tikai vīriešu dzimuma

pacienti ar garīgu atpalcību un attīstības aizturi, jo sievietēm ar pilnu mutāciju *FMRI* gēnā nav raksturīgā klīniskā fenotipa. Līdz ar to nav iespējama pacientu atlase, balstoties tikai uz klīniskiem simptomiem.

Grupā, kuru veidoja neradniecīgi vīriešu dzimuma pacienti ar garīgu atpalcību un psihiskās attīstības aizturi ($n = 374$), diagnosticēti 10 (95% CI 4,80–18,39) jauni trauslās X hromosomas sindroma gadījumi ar relatīvo prevalenci 0,0267 (2,67%) desmit gadu periodā. Vadoties pēc Centrālās statistikas pārvaldes datiem, desmit gadu periodā (no 1998. līdz 2007. gadam) valstī pirmreizēji diagnosticēti 10 503 pacienti ar psihiskās attīstības traucējumiem vai uzvedības un emocionāliem traucējumiem (psihiskās attīstības traucējumi; uzvedības un emocionāli traucējumi, kas parasti sākušies bērnībā un pusaudžu vecumā; slimnieki ar pirmoreiz noteiktu diagnozi; bez alkoholisma un narkomānijas). Dzimuma struktūra diagnosticētajiem pacientiem netika norādīta. Ar teorētisko dzimuma struktūras sadalījumu populācijā (1:1) un ar psihiskās attīstības aiztures diagnozi 1,25 vīriešiem pret 1 sievieti (Raymond, 2006) mēs aprēķinājām, ka Latvijas populācijā vajadzētu būt 6295 vīriešu dzimuma pacientiem (95% CI 5690–7430) ar psihiskās attīstības aiztures diagnozi. Vadoties pēc mūsu pētījumā iegūtās sindroma relatīvās prevalences, tika aplēsts, ka šajā pacientu grupā jābūt 168 (95% CI 143–195) pacientiem ar FXS.

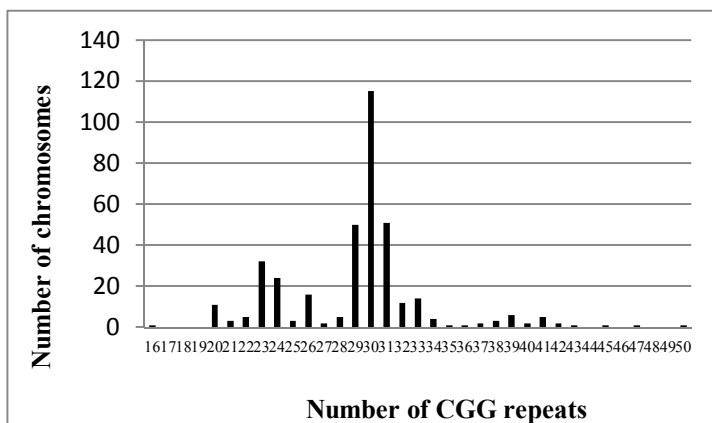
Latvijā ar vidēji 1 079 941 vīriešiem populācijā (balstoties uz Centrālās statistikas pārvaldes datiem par laika posmu no 1998. līdz 2007. gadam) un 168 pacientiem ar FXS aprēķinātā trauslās X hromosomas sindroma prevalences ir 1/6428 vīriešiem (95% CI 5538–7552) vai 15,55/100 000 vīriešu (95% CI 13,24–18,05).

3.2. CGG trinukleotīdu variācija

Kopumā 374 pacienti analizēti ar rutīnu PĶR, un visiem šiem pacientiem noteikts arī precīzs CGG atkārtojumu skaits *FMRI* gēnā. Iegūtais

alēļu sadalījums bija šāds: 90,37% alēles saturēja normālu CGG atkārtojumu skaitu; 6,95% alēļu konstatēts pelēkajā zonā un 2,67% alēļu atklāta pilna CGG atkārtojumu skaita mutācija. Visbiežāk sastopamas hromosomas ar 30 CGG atkārtojumiem (29,95%); 31 atkārtojumu (13,10%) un 29 CGG atkārtojumiem (12,83%).

No 374 pacientu hromosomām, analizētām ar rutīnu PĶR skrīningu, 364 hromosomas konstatētas nepatogēno alēļu robežās (5–50 atkārtojumi). Konstatētas 26 atšķirīgas alēles. Mazākais konstatētais atkārtojumu skaits ir 16. Alēles ar 17; 18; 19; 44; 46; 48 un 49 CGG atkārtojumiem netika konstatētas. CGG atkārtojumu sadalījums nepatogēnā diapazonā atainots 3.1. att.

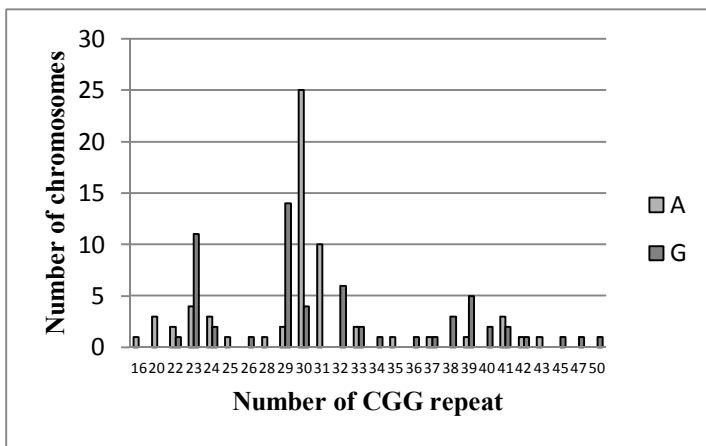


3.1. att. CGG atkārtojumu sadalījums nepatogēnā diapazonā.

3.3. ATL1 viena nukleotīda polimorfisms

Kontroles grupas CGG alēles (n = 122) analizētas attiecībā pret to saistību ar ATL1 polimorfismu. Kopā 62 hromosomām konstatēts ATL1 polimorfisms A ar sastopamības biežumu 56%. Sešdesmit hromosomām konstatēts polimorfisms G (attiecīgi 44%). ATL1 polimorfisma A un G sadalījums starp CGG atkārtojumiem nepatogēnā diapazonā atainots 3.2. att.

Polimorfisms A konstatēts 17 atšķirīgām CGG atkārtojumu skaita alēlēm un polimorfisms G attiecīgi 19 alēlēm. Statistiski ticama saistība CGG atkārtojumu skaitam ar ATL1 viena nukleotīda polimorfismu konstatēta šādām alēlēm: alēlei 29 un G ($p = 0,001$); alēlei ar 30 CGG atkārtojumiem un A ($p < 0,0001$), kā arī alēlei 31 un A ($p = 0,0013$). 23 CGG atkārtojumu saistība ar polimorfismu G netika apstiprināta.



3.2. att. ATL1 polimorfisma A un G sadalījums starp CGG atkārtojumiem nepatogēnā diapazonā.

Lai atklātu ATL1 viena nukleotīda polimorfisma sadalījumu starp stabiliem CGG atkārtojumiem un, iespējams, nestabiliem CGG atkārtojumiem, kontroles grupa tika sadalīta divās apakšgrupās pēc CGG atkārtojumu skaita – normālas alēles un pelēkās zonas alēles (3.1. tabula). Pelēkās zonas apakšgrupā polimorfisms A un G konstatēts attiecīgi ar relatīvo biežumu 0,31 (30,76%) un 0,69 (69,24%). Polimorfisma G biežums ir būtiski atšķirīgs starp stabilajām, normāla CGG atkārtojuma skaita alēlēm un pelēkās zonas alēlēm ($p = 0,0271$).

ATL1 polimorfismu sadalījums starp nepatogēnā diapazona CGG alēlēm.

ATL1	Normālas CGG alēles (16–34 atkārtojumi)			Pelēkās zonas CGG alēles (35–50 atkārtojumi)		
	n	RF	%	n	RF	%
A	54	0,5625	56,25	8	0,3076	30,76
G	42	0,4375	43,75	18*	0,6924	69,24
Kopā	96	1,000	100	26	1,000	100

n – hromosomu skaits; RF – relatīvais biežums; * – $p < 0,05$

Visas gadījuma grupas (FXS) hromosomas konstatētas saistībā ar polimorfismu G, un šī saistība ir statistiski nozīmīga ($p = 0,0008$).

3.4. Pelēkās zonas atkārtojumu struktūra

Lai noteiktu pelēkās zonas CGG atkārtojumu secības AGG iestarpinājumu struktūru, izmantojot tiešo sekvenēšanu, analizētas 26 pelēkās zonas alēles. Divpadsmit hromosomām konstatēta atkārtojumu struktūra ar trīs AGG iestarpinājumiem. Divpadsmit hromosomām CGG secība pārtraukta divreiz, viena hromosoma identificēta ar vienu AGG iestarpinājumu, un viena hromosoma saturēja tīru CGG secību (3.2. tabula). Visām hromosomām AGG iestarpinājumu zudums konstatēts secības 3' galā.

CGG atkārtojumu struktūra analizēta attiecībā pret ATL1 polimorfismu. Būtiska saistība konstatēta polimorfismam A ar atkārtojumu struktūru $10+n$ ($p = 0,001$) un polimorfismam G ar atkārtojumu struktūru $9+n$ ($p = 0,004$).

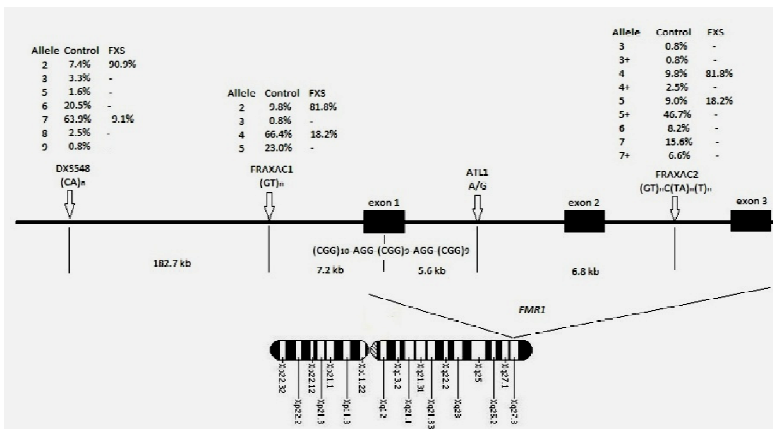
Pelēkās zonas alēļu CGG secības struktūra

AGG iestarpinājumu struktūra	Hromosomu skaits	Relatīvais biežums
Iestarpinājumu nav	1	0,038
9+n	1	0,038
9+9+n	10	0,384
9+9+9+n	4	0,154
9+10+6+n	2	0,077
10+9+n	2	0,077
10+9+9+n	2	0,077
10+9+10+n	2	0,077
10+9+n+n	1	0,038
10+n+n+n	1	0,038

AGG iestarpinājumu struktūra CGG secībā, cipars apzīmē CGG atkārtojumu skaitu, “n” apzīmē nepārtrauktu CGG secību, atkārtotu n reizes, “+” apzīmē AGG iestarpinājuma vietu CGG secībā.

3.5. DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2 haplotipi

Mikrosatelītu marķieri un ATL1 viena nukleotīda polimorfisms analizēti abās, kontroles un FXS pacientu grupās (3.3. att.).



3.3. att. Ar *FMR1* saistīto STR un SNP marķieru atrašanās vieta, nomenklatūra un polimorfismu sastopamības biežums šajā pētījumā.

Katras hromosomas haplotips tika veidots, apvienojot testētos mikrosatelītu marķierus un viena nukleotīda polimorfismu pēc to atrašanās vietas FRAXA lokusā. STR un SNP marķieri apvienoti šādi: DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2. Kopumā konstatēti 27 atšķirīgi haplotipi – 26 kontroles grupā un trīs FXS grupā. Tikai viens haplotips FXS grupā bija unikāls (3.3. tabula).

Starp FXS pacientiem haplotips 2-2-G-4 konstatēts ar relatīvo biežumu 0,818 un ir statistiski ticami saistīts ar pilnas mutācijas alēlēm ($p < 0,0001$). Biežākais haplotips kontroles grupas hromosomām konstatēts 7-4-A-5+ (RF = 0,327; $p = 0,0336$). Tomēr, veicot Bonferoni korekciju, šo haplotipu nevar uzskatīt par statistiski ticami saistītu ar stabilām CGG atkārtojumu alēlēm mūsu populācijā.

Lai noteiktu haplotipu sadalījumu starp stabiliem CGG atkārtojumiem un, iespējams, nestabiliem CGG atkārtojumiem, kontroles grupa tika sadalīta divās apakšgrupās pēc CGG atkārtojumu skaita – alēles ar stabilu atkārtojumu skaitu un pelēkās zonas alēles.

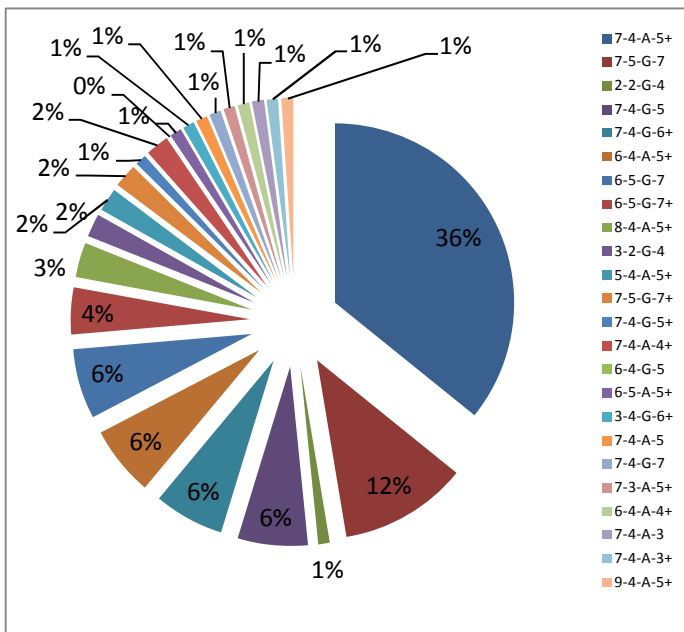
Haplotips 7-4-A-5+ ar relatīvo biežumu 0,354 konstatēts kā biežākais starp alēlēm ar normālu CGG atkārtojumu skaitu (16–34) (3.4. attēls). Salīdzinot ar haplotipu sadalījumu pelēkās zonas alēlēm, šī atrade nav uzskatāma par statistiski nozīmīgu.

Haplotipu analīze pelēkās zonas alēlēm deva šādus rezultātus (3.5. attēls). Biežākais haplotips šajā apakšgrupā konstatēts 2-2-G-4 ar relatīvo biežumu 0,308 un haplotips 7-4-A-5+ ar relatīvo biežumu 0,231. Visām alēlēm, saistītām ar haplotipu 2-2-G-4, konstatētas garas, nepārtrauktas (> 18 CGG atkārtojumi) secības 3' galā ($p = 0,0022$). Sešām hromosomām no 18, saistītām ar citiem haplotipiem, konstatēta tāda pati nepārtraukta CGG atkārtojumu struktūra.

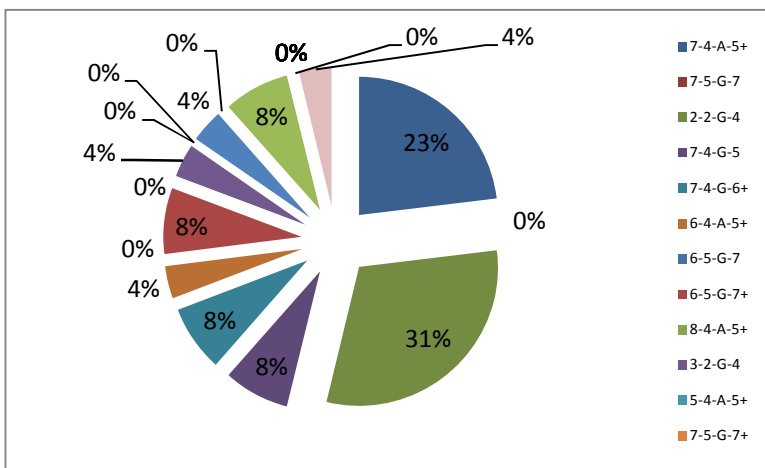
**Noteiktie DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2 haplotipi kontroles un
FXS grupās**

Haplotips	Kontroles grupa			FXS grupa		
	n	RF	SD	n	RF	SD
DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2						
7-4-A-5+	40	0,327	0,043	0	-	-
7-5-G-7	11	0,090	0,026	0	-	-
2-2-G-4	9	0,074	0,024	9	0,818*	0,122
7-4-G-5	8	0,066	0,023	1	0,091	0,091
7-4-G-6+	8	0,066	0,023	0	-	-
6-4-A-5+	7	0,057	0,021	0	-	-
6-5-G-7	6	0,049	0,020	0	-	-
6-5-G-7+	6	0,049	0,020	0	-	-
8-4-A-5+	3	0,025	0,014	0	-	-
3-2-G-4	3	0,025	0,014	0	-	-
5-4-A-5+	2	0,016	0,012	0	-	-
7-5-G-7+	2	0,016	0,012	0	-	-
7-4-G-5+	2	0,016	0,012	0	-	-
7-4-A-4+	2	0,016	0,012	0	-	-
6-4-G-5	2	0,016	0,012	0	-	-
6-5-A-5+	1	0,008	0,008	0	-	-
3-4-G-6+	1	0,008	0,008	0	-	-
7-4-A-5	1	0,008	0,008	0	-	-
7-4-G-7	1	0,008	0,008	0	-	-
7-3-A-5+	1	0,008	0,008	0	-	-
6-4-A-4+	1	0,008	0,008	0	-	-
7-4-A-3	1	0,008	0,008	0	-	-
7-4-A-3+	1	0,008	0,008	0	-	-
9-4-A-5+	1	0,008	0,008	0	-	-
6-5-G-6+	1	0,008	0,008	0	-	-
6-5-A-7	1	0,008	0,008	0	-	-
2-4-G-5	0	-	-	1	0,091	0,091
Kopā	122	1,000	0,374	11	1,000	0,304

n – hromosomu skaits; RF – relatīvais sastopamības biežums; SD – standartnovirze; * – $p < 0,0001$.



3.4. att. *FMRI* saistīto haplotipu sadalījums stabilo CGG alēļu vidū



3.5. att. *FMRI* saistīto haplotipu sadalījums pelēkās zonas alēļu vidū

3.6. AMOVA

Heterozigotitātes līmenis visiem polimorfismiem testēts pēc ierobežotā salas modeļa (*finite island model*). Prognozējamā heterozigotitāte kontroles un FXS grupās aprēķināta, balstoties uz noteikto alēļu biežumu (3.4. tabula).

3.4. tabula
Sagaidāmā un novērotā heterozigotitāte kontroles un FXS grupās

Lokuss	Kontrole H_E	FXS H_E	Vid.	SD	H_T	H_O	X^2	p vērtība
ATL1 SNP	0,504	0,000	0,252	0,356	0,501	0,696	20,332	<0,0001
FRAXAC1	0,501	0,327	0,414	0,123	0,545	0,863	53,654	<0,0001
FRAXAC2	0,734	0,327	0,530	0,288	0,757	1,055	62,591	<0,0001
DXS548	0,546	0,182	0,364	0,258	0,594	1,009	94,310	<0,0001

H_E – sagaidāmā heterozigotitāte; H_T – kopējā heterozigotitāte; H_O – novērotā heterozigotitāte; SD – standartnovirze; X^2 – hi-kvadrāts.

AMOVA rezultātā noskaidrots, ka molekulārā variācija starp grupām ir 27,04%. Molekulārā variācija grupās ir 72,96%. Fiksācijas indekss *Fst* aprēķināts, balstoties uz haplotipu biežumu starp kontroles un gadījumu grupām, un tas ir 0,27042 ($p < 0,001$). Kritiskā *Fst* vērtība, lai apstiprinātu nulles hipotēzi, aprēķināta 0,0683 ($\alpha = 0,01$).

3.7. Genotipa-fenotipa korelācija

Korelācijas noteikšanai analizēti divpadsmit FXS pacientu kliniskie dati, kas iegūti no pacientu slimības vēsturēm. Pacientu vecums diagnozes brīdī variē no divu līdz sešpadsmit gadu vecumam (vidējais vecums = $7,33 \pm 4,46$). Molekulārās diagnostikas rezultāti šiem pacientiem atklāja atšķirīgu CGG atkārtojumu skaita mutācijas struktūru. Pilna atkārtojumu skaita mutācija (> 200 CGG atkārtojumiem) ar pilnīgi metilētu gēna promotera rajonu konstatēta deviņiem pacientiem. Diviem pacientiem atrasts permutācijas/pilnas mutācijas mozaīcisms ar metilēšanas mozaīcismu. Vienam pacientam bija pilna

atkārtojumu skaita mutācija ar metilēšanas mozaïcismu (līdz pat 80% nemetilēts gēna promoters).

Raksturīgie FXS klīniskie fenotipiskie simptomi analizēti divpadsmit pacientiem. Astoņiem pacientiem no divpadsmit noteikts intelekta koeficients (IQ). Iegūtie rezultāti atklāja, ka IQ līmenis pacientiem variē no 34 līdz 74 ar vidējo IQ līmeni 52,75 (\pm 12,75). Psihomotoro simptomu grupā garīgās attīstības aizture, grūtības mācībās, aizkavēta valodas attīstība un uzmanības deficīts/hiperaktivitāte tika konstatēta visiem pacientiem. No pārējām klīnisko simptomu grupām vienīgi muskuļu hipotonija konstatēta visiem pacientiem.

Lai noteiktu, vai pastāv genotipa-fenotipa korelācija starp alēlēm ar pilnu atkārtojumu skaita mutāciju un alēlēm ar CGG atkārtojumu skaita un/vai metilēšanas mozaïcismu, analizēti klīniskie simptomi pacientiem ar pilnu atkārtojumu skaita mutāciju un pacientiem ar CGG atkārtojumu skaita un/vai metilēšanas mozaïcismu. Genotips noteikts genoma DNS, izdalītai no limfocītiem (3.5. tabula).

Lai uzlabotu pacientu atpazīšanu un FXS atlasī starp pacientiem ar dažādas pakāpes garīgu atpalicību, balstoties uz literatūras apskatu, apkopota un iztulkota latviski klīnisko simptomu aptaujas lapa, kas ieteicama ģimenes ārstiem, pediatriem, bērnu neirologiem un bērnu psihiatriem lietošanai praksē.

**Genotipa-fenotipa salīdzinājums starp pacientiem ar pilnu mutāciju
un pacientiem ar mozaïcismu**

Kliniskie simptomi	Pilna mutācija n = 8	Rel. biežums	Mozaïcisms n = 4	Rel. biežums
Psihomotorās attīstības un neiroloģiskie simptomi				
Garīgā atpalcība	8	1,00	4	1,00
Grūtības mācībās	8	1,00	4	1,00
Motorās attīstības aizture	7	0,88	4	1,00
Valodas attīstības aizture/grūtības	8	1,00	4	1,00
Autiskā spektra iezīmes	6	0,75	1	0,25
Uzmanības deficīta un hiperaktivitātes sindroms	8	1,00	4	1,00
Dažāda veida epileptiski krampji	2	0,25	2	0,50
Līdzsvara traucējumi	1	0,13	0	0,00
PW līdzīgs fenotips	3	0,38	0	0,00
Dismorfisms un saistaudi				
Garena seja	7	0,88	4	1,00
Lielas ausis	4	0,50	3	0,75
Augsta, plata piere	6	0,75	4	1,00
Prognātisms	0	0,00	0	0,00
Locītavu hiperelastīgums	6	0,75	4	1,00
Plakanā pēda	4*	0,66	3	0,75
Muskuļu hipotonija	8	1,00	4	1,00
Bieži ARVI/otīti	5	0,63	2	0,50

* = analizēti 6 pacienti

4. DISKUSIJA

4.1. Trauslās X hromosomas sindroma prevalence

Desmit gadu ilgā trauslās X hromosomas sindroma molekulārās diagnostikas pieredze un salīdzinoši zemais diagnosticēto pacientu skaits ar šo sindromu rosināja jautājumu, cik bieži sastopams ir trauslās X hromosomas sindroms Latvijas populācijā? Pētījumu trūkums mūsu ģeogrāfiskajā reģionā bija vēl viens faktors, kas iedvesmoja mūs šim pētījumam.

Tāpat kā citos publicētos pētījumos, mūsu pētījumā mērķa populācija bija pacienti ar garīgo atpalicību un/vai psihomotorās attīstības aizturi, kas ir galvenie FXS simptomi. Ļoti nozīmīgi ir atlasīt un diagnosticēt pacientus ar FXS simptomiem, tai pašā laikā palielinot šā sindroma atklāšanas biežumu.

Šajā pētījumā diagnosticēto pacientu biežums mērķa populācijā veidoja 2,67%. Šis rezultāts būtiski neatšķiras no citu zinātnisko grupu rezultātiem, pētot populāciju ar līdzīgiem simptomiem. Mūsu rezultāts apliecina ar FXS saistītu klīnisko simptomu atpazīšanas nozīmību klīniskajā praksē un nepieciešamību ieteikt klīnisko simptomu aptaujas lapu, kas ļautu vieglāk atpazīt un atlasīt pacientus ar aizdomām par FXS.

Šajā pētījumā, lai noteiktu FXS prevalenci kopējā vīriešu populācijā, attiecinājām mūsu pētījumā iegūto FXS biežumu mērķa populācijā uz kopējo pacientu skaitu, diagnosticētu ar psihiskās attīstības traucējumiem vai uzvedības un emocionāliem traucējumiem Latvijā šajā pašā laika posmā. Dati par diagnosticētajiem pacientiem Latvijā iegūti no Centrālās statistikas pārvaldes publikācijām. Dzimuma struktūra un detalizēts pārskats par iekļautajām diagnozēm nebija pieejams. Tomēr uzskatām, ka kopējais pacientu diagnožu apraksts bija vispiemērotākais salīdzināšanai ar mūsu pētījuma mērķa populāciju. Iepriekš minēto iemeslu dēļ var rasties neprecizitāte prevalences aprēķinos kopējā vīriešu populācijā. To pierāda dažādos pētījumos publicēto prevalences rādītāju korelācija ar izvēlēto klīnisko simptomu spektru.

Mūsu rezultāti saskan ar publicēto sindroma prevalenci Eiropā. Kraufords (*Crawford*) ar kolēģiem savā trauklās X hromosomas sindroma epidemioloģijas pārskatā norāda uz plaša populācijas skrīninga nepieciešamību pilnīgai sindroma prevalences noskaidrošanai. Mēs pilnībā piekrītam šādas nepieciešamības esamībai, un pat vēl nozīmīgāka būtu permutācijas nesēju sieviešu prevalences noskaidrošana dažādās etniskās populācijās.

4.2. CGG trinukleotīdu variācija

Mūsu pētījumā analizēts normālo CGG atkārtojumu alēļu sadalījums neradniecīgiem vīriešu dzimuma pacientiem ar garīgu atpalcību. Biežākā alēle, noteikta šajā pētījumā, sakrīt ar rezultātiem citās Eiropas populācijās un Rietumeiropas izcelsmes populācijās no Amerikas, un tā ir alēle 30. Salīdzinot mūsu iegūtos rezultātus ar Igaunijas kolēģu pētījuma rezultātiem, būtiskas atšķirības nav konstatējamas. Alēle 30 atklāta 29,30% no visām Igaunijas pacientu hromosomām (Puusepp et al, 2008), mūsu pētījumā attiecīgi 29,95%.

Normālo CGG atkārtojumu alēļu sadalījums raksturots dažādās populācijās. Iespējams, ka datiem pastāv nesakrītība viena CGG atkārtojuma robežās, kas var rasties, izmantojot atšķirīgas metodes CGG atkārtojumu skaita noteikšanai un iespējamās genotipēšanas kļūdas dēļ.

CGG atkārtojumu sadalījums Latvijas iedzīvotāju X hromosomās neatklāja būtiskas atšķirības starp mūsu datiem un Eiropas populācijām. Kopējā CGG alēļu heterogenitāte mūsu populācijā sakrīt ar Eiropas populāciju datiem.

4.3. ATL1 SNP

Iepriekš publicētos pētījumos apskatīta CGG atkārtojumu nestabilitātes saistība ar trim galvenajiem faktoriem: ATL1 polimorfisms G; specifiski mikrosatelītu marķieri un CGG atkārtojumu struktūras pārtraukumi ar AGG iestarpinājumiem un to neesamība garās, nepārtrauktās CGG secībās 3` galā

(Arrieta et al, 2003; Crawford et al, 2000; Curlis et al, 2005; Dombrowski et al, 2002; Eichler et al, 1996; Gunter et al, 1998; Zhou et al, 2006).

Interesantā kolēģu pētījumā (Gunter et al, 1998) izvirzīta hipotēze, ka polimorfisms A izcēlies kā mutācija 30 CGG atkārtojumu secībā un ir saistīts ar haplotipu 7-3-4+. Selekcijas ceļā vai arī pamatojoties uz ģenētisko driftu, alēle A kļuvusi par biežāko, ar normālu atkārtojumu skaitu saistīto polimorfismu Rietumeiropas izcelsmes populācijā. Ja salīdzina mūsu pētījumā iegūtos rezultātus, haplotips 7-4-5+ ir visbiežāk saistītais ar 30 CGG atkārtojumiem (51,72%), un visas alēles ar šo haplotipu ir saistītas ar ATL1 polimorfismu A. Šī pētījuma rezultāti atklāja arī būtisku ATL1 polimorfisma G saistību ar pelēkās zonas alēlēm, kas norāda uz polimorfismu G kā atkārtojumu nestabilitātes indikatoru.

4.4. Pelēkās zonas alēļu atkārtojumu struktūra

Viens no uzdevumiem šajā pētījumā bija noteikt CGG atkārtojumu struktūru X hromosomām ar normālu atkārtojumu skaitu. Tā kā CGG atkārtojumi normālā diapazonā (5–34) tiek uzskatīti par stabili pārmantojamiem, mēs nolēmām noteikt CGG atkārtojumu struktūru tikai pelēkās zonas alēlēm (35–50).

Normāli pelēkās zonas alēles ekspresējas un neizraisa FXS fenotipu, tomēr šīs alēles var būt nestabilas, pārmantojot tās nākamajā paaudzē. Šī iemesla dēļ pelēkās zonas alēles ir labs materiāls atkārtojumu nestabilitātes pētījumiem.

Garas, ar AGG iestarpinājumiem nepārtrauktas secības tiek uzskatītas par vienu no galvenajiem ar atkārtojumu nestabilitāti saistītajiem faktoriem (Rife et al, 2004). Pastāv hipotēze, ka CGG atkārtojumu pavairošanās notiek tikai secības 3' galā. Aprakstītas arī dažādas AGG iestarpinājumu struktūras, kuras, iespējams, ir saistītas ar stabilizējošu efektu (Dombrowski et al, 2002).

Mūsu pētījumā konstatētas desmit dažādas CGG secību struktūras alēlēm ar atkārtojumu skaitu no 35 līdz 50. Biežākā atkārtojumu struktūra pelēkās zonas alēlēm bija 9+9+n. CGG secības struktūras saistība ar specifiskiem haplotipiem aplūkota nākamajā nodaļā.

4.5. DXS548-FRAXAC1-ATL1-FRAXAC2 haplotipi

Šajā pētījumā mēs analizējam mikrosatelītu marķierus DXS548, FRAXAC1 un FRAXAC2, ATL1 viena nukleotīda polimorfismu Latvijas pacientiem ar garīgo atpalcību un normālu vai palielinātu CGG atkārtojumu skaitu *FMRI* gēnā. Lai realizētu šo uzdevumu, veikts gadījumu-kontroles pētījums. Iegūtie AMOVA rezultāti, balsīti uz noteikto F_{st} , norāda uz būtisku atšķirību starp analizētajām kontroles un gadījumu grupām, liecina, ka abas vienas populācijas subpopulācijas ir ar atšķirīgu ģenētisko izcelsmi.

Vairākos pētījumos identificēti specifiski haplotipi, kas saistīti ar FXS hromosomām un normālo CGG atkārtojumu alēlēm vairākās Eiropas populācijās (Arrieta et al, 2003; Dokic et al, 2008; Malmgren et al, 1994; Peixoto et al, 1998; Pekarik et al, 1999; Rajkiewicz, 2008). Rietumeiropas izcelsmes populācijā haplotipi 6-4-4; 6-4-5 un 2-1-3 atrasti pozitīvā saistībā ar pilnu atkārtojumu skaita mutāciju (Eichler et al, 1996). Tomēr tikai neliels skaits no šiem pētījumiem attiecas uz Austrumeiropas un Ziemeļaustrumeiropas populācijām.

Dažādos pētījumos analizētie mikrosatelītu marķieri ir atšķirīgi. Tādējādi varētu rasties grūtības salīdzināt mūsu rezultātus ar līdzīgu pētījumu rezultātiem. Ne tikai analizēto mikrosatelītu marķieri, bet arī alēļu nomenklatūra dažādos literatūras avotos ir atšķirīga, tas rada apjukumu, kā arī var novest pie kļūdainas publicēto datu interpretācijas, salīdzinot haplotipu datus dažādās populācijās.

Latvijas populācijā haplotips 7-4-A-5+ konstatēts kā biežākais starp alēlēm ar normālu CGG atkārtojumu skaitu. Tomēr, veicot Bonferoni korekciju, šī atrade nevar tikt uzskatīta par statistiski nozīmīgu. Pēc literatūras datiem, biežākais haplotips Anglijā un Rietumeiropas izcelsmes populācijā ASV ir 7-3-4 un 7-3-4+. Šādi haplotipi mūsu kontroles grupā netika konstatēti. Tomēr, ņemot vērā, ka lielākajā daļā Eiropas populāciju pētījumos analizēti divu mikrosatelītu marķieru haplotipi, mēs varam salīdzināt iegūtos rezultātus ar divu marķieru haplotipiem. Haplotips 7-4, sastādīts no attiecīgi marķieriem DXS548 un FRAXAC1, konstatēts kā biežākais pētījumos Basku ielejā, Čehijā, Horvātijā, Polijā un Portugālē (Arrieta et al, 2003; Dokic et al, 2008; Pekarik et al, 1999; Peixoto et al. 1998; Rajkiewicz, 2008). Mūsu pētījumā DXS548-FRAXAC1 haplotips atrasts 72 no 122 kontroles grupas hromosomām. Šī atrade pierāda šā haplotipa pārsvaru arī mūsu populācijā.

Turklāt haplotips 2-2-G-4 konstatēts pozitīvā saistībā ar pilnas CGG atkārtojumu skaita mutācijas alēlēm Latvijas FXS hromosomām. Pretēji šiem rezultātiem haplotipi 6-4-4; 6-4-5 un 2-1-3 atzīmēti kā pozitīvi saistīti ar FXS hromosomām Rietumeiropas izcelsmes populācijā. Šie haplotipi netika konstatēti mūsu FXS hromosomām, tomēr haplotips 6-4-5 konstatēts divām pelēkās zonas alēlēm (attiecīgi 41 un 42 CGG atkārtojumi). Abas šīs alēles bija saistītas ar ATL1 polimorfismu G un abām alēlēm CGG atkārtojumu struktūra konstatēta 9+9+n. Visās šīs atrades, saistītas ar haplotipu 6-4-5, var norādīt uz iespējamo nestabilitāti šīm alēlēm nākamajās paaudzēs.

Pelēkās zonas alēlēm ar raksturīgu garu (≥ 18 atkārtojumi), nepārtrauktu CGG secību 3' galā konstatēta pozitīva saistība ar haplotipu 2-2-G-4. Šis haplotips atrasts astoņām pelēkās zonas alēlēm. Visām šīm alēlēm CGG secībā pirmais AGG iestarpinājums notiek pēc deviņiem CGG atkārtojumiem (9+ struktūra). Šī atrade saskan ar *Gunter et al.* proponēto haplotipu, kas pozitīvi saistīts ar FXS mutāciju. Haplotips 7-4-A-5+ atrasts

sešās pelēkās zonas alēlēm, un visām šīm alēlēm CGG atkārtojumu secībā pirmais AGG iestarpinājums konstatēts pēc desmit CGG atkārtojumiem (10+ struktūra). Šis haplotips varētu būt “aizsargājamošais” haplotips CGG secības stabilitātei.

Šie rezultāti netieši norāda, ka mūsu populācijā haplotips 2-2-G-4 ir marķieris CGG secības nestabilitātei. Pelēkās zonas alēlēm ar garām, nepārtrauktām CGG secībām 3` galā pastāv lielāka iespējamība, ka spontāni palielināsies CGG atkārtojumu skaits, izraisot premutācijas vai pat pilnas mutācijas rašanos nākamajās paaudzēs.

Pēc mūsu rīcībā esošajiem datiem, specifiski, ar *FMRI* gēnu saistīti haplotipi Baltijas valstu un Ziemeļaustrumeiropas reģionā līdz šim nav analizēti. Šis pētījums ir pirmais, kas apraksta *FMRI* saistītos haplotipus Latvijas populācijā. Salīdzinot iegūtos datus ar pētījumu rezultātiem no ģeogrāfiski tuvām Eiropas populācijām, iezīmējas atšķirības, īpaši FXS pacientu grupā. Haplotips 2-2-G-4 konstatēts gandrīz visām FXS hromosomām. Mēs secinām, ka ciltstēva efekts nevarētu būt izskaidrojams šai atradei, balstoties uz Latvijas populācijas augsto heterogenitāti, kā arī pētījumu trūkumu šajā ģeogrāfiskajā reģionā. Nelielais FXS hromosomu skaits, kas analizēts šajā pētījumā, izskaidrojams ar zemo sindroma diagnosticēšanas biežumu mūsu populācijā. Šis fakts tomēr var būt avots nepilnīgiem datiem par FXS hromosomām Latvijas populācijā. Plašs, ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu pētījums Austrumeiropas un Ziemeļaustrumeiropas reģionā varētu sniegt precīzākus rezultātus. Neskatoties uz šo faktu, mēs tomēr uzskatām, ka mūsu pētījuma rezultāti sniedz pierādījumus atšķirīgam mutācijas ceļam nestabilām CGG alēlēm mūsu ģeogrāfiskajā reģionā.

4.6. Genotipa-fenotipa korelācija

Klīniskiem simptomiem ir izšķiroša loma pacientu ar trauslās X hromosomas sindromu atklāšanai pacientu ar garīgu atpalcību vidū. Šo simptomu atpazīšana ir pirmais solis pretim veiksmīgai FXS diagnozei un secīgi sekojošai ģimenes locekļu kaskādes testēšanai. Genotipa-fenotipa korelācijas novērtēšana var palīdzēt noteikt FXS pacientu prognozi un ļauj atklāt simptomu dažādību.

Mūsu pētījumā atklāti trīs pacienti ar atkārojumu skaita/metilēšanas mozaicismu. Novērotais nemetilēto atkārojumu skaits variēja no 78 atkārojumiem līdz 150 CGG atkārojumiem. Pacientu ar atkārojumu skaita/metilēšanas mozaicismu fenotips būtiski neatšķīrās no tiem pacientiem, kuriem bija pilna mutācija. Vienīgā vērā ņemamā atšķirība bija autiska spektra traucējumu neesamība pacientiem ar atkārojumu skaita/metilēšanas mozaicismu. Tajā pašā laikā jāatzīmē, ka vienam pacientam ar pilnu mutāciju arī šīs pazīmes netika novērotas. Nevienam no pacientiem, kam diagnosticēts atkārojumu skaita/metilēšanas mozaicisms, neatklājās mazāk izteikts vai vieglāks fenotips kā tiem, kuriem diagnosticēta pilna mutācija un metilēšana. Tas, iespējams, ir izskaidrojams ar atkārojumu mitotisko nestabilitāti dažādos audos. Balstoties uz šiem novērojumiem, mēs neiesakām prognozēt pacienta fenotipu, balstoties tikai uz genotipu, kurš iegūts, analizējot genoma DNS, izdalītu no limfocītiem.

Literatūrā aprakstīti astoņi FXS pacienti ar “Prādera-Villija sindromam (PWS) līdzīgu” fenotipu (de Vries et al, 1993). Pacientiem bija pazīmes, kas līdzīgas Prādera-Villija sindroma fenotipam, tādas kā aptaukošanās, hipogēnitalisms, mazas plaukstas un pēdas. Trīs pacientiem no mūsu pētījuma FXS grupas konstatēts “PWS līdzīgais” fenotips. Trīs pacienti no divpadsmit analizētajiem ir vērā ņemams skaits. Pēc mūsu domām, visiem pacientiem ar

PWS fenotipu, garīgu atpalcību un/vai autiska spektra traucējumiem būtu jāveic traušlās X hromosomas sindroma tests.

Zemais pacientu skaits, kam mūsu pētījumā diagnosticēts traušlās X hromosomas sindroms, ļāva secināt, ka traušlās X hromosomas sindroms parasti ir klīniski neatpazīts. Lai palīdzētu atlasīt FXS pacientus no garīgi atpalikušu vīriešu populācijas, balstoties uz literatūras apkopojumu, mēs izveidojām un pārtulkojām latviski klīnisko simptomu aptaujas lapu.

Pēc mūsu domām, zemā diagnosticēto pacientu skaita iemesls nav tikai klīniski neatpazīts FXS, bet arī sabiedrības attieksme pret cilvēkiem ar garīgās attīstības traucējumiem un viņu ģimenēm. Mūsu pieredze rāda, ģimenes ar diagnosticētu FXS pacientu neinformē savus radniekus, kas varētu būt riska grupā, līdz ar to novēršot ģimenes ģenētisko konsultēšanu. No klīnisko speciālistu viedokļa specifiskas terapijas trūkums nostāda šo diagnozi vienā grupā ar citām psihiatriskām diagnozēm, kurām pieejama tikai simptomātiska ārstēšana.

5. SECINĀJUMI

1. Trauslās X hromosomas sindroma prevalence Latvijas vīriešu populācijā noteikta $1/6428$ (95% CI 5538-7552) vai $15,55/100\ 000$ vīriešu (95% CI 13,24–18,05). Trauslās X hromosomas sindroma sastopamības biežums pacientiem ar garīgo atpalcību noteikts 2,67%.
2. Kā biežākās alēles starp hromosomām ar normālu CGG atkārtojumu skaitu konstatētas alēle 30 (29,95%), alēle 31 (13,10%) un alēle 29 (12,83%).
3. Starp alēlēm ar normālu CGG atkārtojumu skaitu un ATL1 SNP statistiski nozīmīga saistība konstatēta alēlei 29 un G ($p = 0,001$); alēlei 30 un A ($p < 0,0001$), kā arī alēlei 31 ar A ($p = 0,0013$). ATL1 polimorfismam G konstatēta ticama saistība ar pelēkās zonas alēlēm ($p = 0,0271$), kā arī visas alēles ar pilnu mutāciju gadījumu grupā saistītas tikai ar šo polimorfismu.
4. Gadījumu-kontroles pētījumā haplotips 7-4-A-5+ ir biežākais kontroles grupā, tomēr pēc Bonferoni korekcijas nav uzskatāms par statistiski nozīmīgu saistībā ar normālu CGG atkārtojumu skaitu. Pētījuma rezultāti liecina, ka haplotips 2-2-G-4 ir marķieris alēļu nestabilitātei Latvijas populācijā. AMOVA rezultāti norāda uz atšķirīgu FXS hromosomu ģenētisko izcelsmi.
5. Pelēkās zonas alēļu struktūras analīze atklāja desmit dažādas CGG atkārtojumu struktūras. Biežākā konstatētā struktūra ir 9+9+n. Ar haplotipu 2-2-G-4 saistītā struktūra 9+n konstatēta pozitīvā asociācijā ar CGG atkārtojumu nestabilitāti. Haplotips 7-4-A-5+ saistīts ar atkārtojumu struktūru 10+n un atpazīts kā “aizsargājošais” haplotips CGG atkārtojumu skaita stabilitātei.
6. Genotipa-fenotipa analīzes rezultāti neatklāja būtisku korelāciju starp trauslās X hromosomas sindroma pacientu klīniskajiem simptomiem un atšķirīgo CGG atkārtojumu skaita mutācijas veidu.

6. PUBLIKĀCIJAS

Publikācijas

- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Rita Lugovska. Fragilās X hromosomas sindroms pacientiem ar neskaidras etioloģijas garīgo atpalicību Latvijā. *RSU Zinātniskie raksti 2007*. RSU, 2008: 224-227.
- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Natālija Proņina, Rita Lugovska. Fragile X syndrome in mentally retarded patients from Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Science, Section B*, 2009 (63):70-72.
- Zanda Daneberga, Natalija Pronina, Baiba Lace, and Rita Lugovska. *FMRI* Linked Haplotype Analysis in a Mentally Retarded Male Population *Central European Journal of Medicine*. 2011, 6(6):750-757.
- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Natālija Proņina, Rita Lugovska. The Fragile X Syndrome: 13 Years of Experience. *Proceedings of the Latvian Academy of Science, Section B*, 2011. *In press*.

Tēzes

- Daneberga Z., Lace B., Pronina N., Lugovska R. *FMRI* haplotype analysis in mentally retarded male population. *European Journal of Human Genetics*, Vol 19 Supp. 2, 2011, pp. 334.
- Bauze D., Ķevere L., Kronberga Z., Riževs A., Jeļisejevs S., Daneberga Z., Dzalbs A., Ločmele Dz., Krūmiņa Z., Andrēziņa R., Lāce B. Autisma un autiskā spektra traucējumu fenotipisko pazīmju, antropometrisko mērījumu un bioķīmisko rādītāju salīdzinājums un analīze. RSU zinātniskā konference, Tēzes, 2011, 239.
- Daneberga Z., Lāce B., Proņina N., Lugovska R. Ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu analīze. RSU zinātniskā konference, Tēzes, 2011, 266.

- Daiga Bauze, Zanda Daneberga, Arnis Riževs, Raisa Andrēziņa, Rita Lugovska, Baiba Lāce. Fragilās X hromosomas sindroma (FXS) genotipa un fenotipa salīdzinājums bērniem ar psihiskās attīstības traucējumiem. RSU zinātniskā konference, Tēzes, 2010, 113.
- Daneberga Z., Krumina Z., Lace B., Bauze D., Pronina N., Lugovska R. Prevalence of Fragile X syndrome in mentally retarded patients from Latvia. *European Journal of Human Genetics*, Vol 17 Supp. 2, 2009, pp. 134.
- Daneberga Z., Krumina Z., Lace B., Bauze D., Pronina N., Lugovska R. Molecular diagnostic of XLMR in mentally retarded males from Latvia. *European Journal of Human Genetics*, Vol 16 Supp. 2, 2008, pp. 62.
- Daneberga Z., Krumina Z., Lace B., Bauze D., Pronina N., Lugovska R. FRAXA locus investigation of mentally retarded patients. *European Journal of Human Genetics*, Vol 15 Supp. 1, 2007, pp.198.
- Daneberga Z., Krumina Z., Lace B., Pronina N., Lugovska R. Molecular diagnosis of fragile X syndrome in mentally retarded patients in Latvia. *Laboratorine Medicina*, 1(29), 2006, pp.20.
- Daneberga Z., Krumina Z., Lace B., Pronina N., Lugovska R. Molecular diagnosis of fragile X syndrome in mentally retarded patients in Latvia. *European Journal of Human Genetics*, Vol 14 Supp. 1, 2006, pp.251.

Aprobācija

- RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras, LĀB Latvijas Medicīniskās ģenētikas asociācijas un Latvijas Cilvēka ģenētikas asociācijas apvienotā sēde. 1. jūlijs, 2011., RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Rīga, Latvija.
- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Natālija Proņina, Rita Lugovska. Fragile X syndrome in Latvia: clinical, molecular and

population genetic aspects. 11th Conference of Baltic Child Neurology Association. 16.–18. jūnijs, 2011, Rīga, Latvija.

- Zanda Daneberga, Baiba Lāce, Natālija Proņina, Rita Lugovska. Ar *FMRI* gēnu saistīto haplotipu analīze. RSU zinātniskā konference, 14.–15. aprīlis, 2011. Rīga, Latvija.
- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Natālija Proņina, Rita Lugovska. Molecular diagnostic of X-linked mental retardation. 9th Baltic Congress of Laboratory Medicine, 18.–20. septembris, 2008. Jūrmala, Latvija.
- Zanda Daneberga, Zita Krūmiņa, Baiba Lāce, Daiga Bauze, Natālija Proņina, Rita Lugovska. Fragile X syndrome in mentally retarded patients from Latvia. IV Baltic Genetical Congress, 9.–12. oktobris, 2007. Daugavpils, Latvija.

7. PATEICĪBAS

Daudz cilvēku ieguldījuši savu laiku un zināšanas šā darba tapšanā, un man ir tas gods izteikt viņiem savu pateicību.

Vēlos pateikties darba zinātniskajai vadītājai asoc. prof. Ritai Lugovskai par doto iespēju izstrādāt šo promocijas darbu, kā arī augt un pilnveidoties gan profesionālajā, gan zinātnes jomā Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas Medicīniskās ģenētikas klīnikā.

Vēlos izteikt visdziļāko pateicību darba zinātniskajai konsultantei Baibai Lācei par ieguldīto laiku un pūlēm, izskaidrojot statistikas metodes un lasot disertāciju, par viņas pašreizējā ieguldījumu šā darba uzlabošanā.

Izsaku sirsnīgu pateicību un manas cieņas apliecinājumus Kristīnei Eiklīdai (*Kristin Eiklid*, Ulevolas universitātes slimnīca, Oslo, Norvēģija) par atvērto attieksmi, laipni piedāvāto tehnisko palīdzību diagnozes apstiprināšanai un viesmīlīgo manis uzņemšanu savā laboratorijā.

Man ir liels gods izteikt pateicību prof. R. A. Weversam (*R. A. Wevers*) un H. Intemai (*H. Yntema*, Radboda (*Radboud*) universitāte, Neimegenas

medicīnas centrs, Neimegena, Nīderlande) par tehnisko palīdzību diagnozes apstiprināšanai un doto iedvesmu šim darbam.

Esmu pateicīga Medicīniskās ģenētikas klīnikas klīnicistiem par ieguldījumu paraugu vākšanā, pacientu klīnisko simptomu izvērtēšanā un dotajiem norādījumiem klīnisko datu analīzē un interpretācijā. Īpaši vēlos pateikties Zītai Krūmiņai, Daigai Bauzei un Dzintrai Ločmelei.

Mana pateicība Irēnai Rogovskai un Liānai Plisai par palīdzību un padomiem datu statistiskā apstrādē.

Izsaku pateicību DNS laboratorijas laborantei Kristīnai Morozovai par paraugu sagatavošanu un tehnisku palīdzību paraugu apstrādē, par viņas pacietību un paš aizliedzīgo ieguldījumu darba tapšanā.

Esmu pateicīga daudziem maniem kolēģiem Ģenētiskās bioķīmijas laboratorijā un DNS laboratorijā par atbalstu, sapratni, padomiem un pacietību. Īpaši vēlos pateikties Pārslai Vēverei un Natālijai Proņinai.

Izsaku pateicību pacientiem un viņu ģimenēm par dalību šajā pētījumā, viņu sadarbība ir augsti novērtēta.

Visbeidzot, vēlos izteikt īpašu pateicību manai ģimenei, manam partnerim un maniem draugiem par ticību man, sapratni un pacietību laikā, kad garas stundas pavadīju laboratorijā un pie datora.

8. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Agresti A. and Coull B. A. Approximate is better than "Exact" for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 1998; 52:119-126.
2. Arrieta, I., O. Penagarikano, M. Telez et al. The FMR1 CGG repeat and linked microsatellite markers in two Basque valleys. *Heredity*, 2003; 90:206-211.
3. Bardoni B., Mandel J-L. and Fish G. S. FMR1 gene and fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 97:153-163.
4. Bland J.M., Altman D.G. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet*, 1995; 346: 1085-1087.
5. Chiurazzi, P. DNA panel to interlaboratory standardization of haplotype studies on the fragile X syndrome and proposal for a new allele nomenclature. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 83:347-349.
6. Chong S. S., Eichler E. E., Nelson D. L. et al. Robust amplification and ethidium – visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am. J. Med. Genet.* 1994; 51:522-526.
7. Crawford D. C., Acuna J. M. and Sherman S. L. FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine* 2001; 3(5):359-371.
8. Crawford, D. C., Shwartz C. E., Meadows K. L. et al. Survey of the Fragile X Syndrome CGG Repeat and the Short-Tandem-Repeat and Single-Nucleotide-Polymorphism Haplotypes in an African American Population. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 66:480-493.
9. Curlis Y., Zhang C., Holden J. J. A., Kirkby K., Loesch D., Mitchell R. J. Haplotype study of intermediate-length alleles at the fragile X (FMR1) gene: ATL1, FMRb, and microsatellite haplotypes differ from those found in common-size FMR1 alleles. *Hum. Biol.* 2005; 77(1):137-151.
10. de Vries B. B. A., Fryns J-P., Butler M. G., Canziani F., Wesby-van Swaay E., van Hemel J. O., Oostra B. A., Halley D. D. J, Niermeijer M. F. Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype. *J Med Genet* 1993; 30: 761-766.
11. de Vries B. B. A., Jansen C. C. A. M., Duits A. A., Verheij C., Willemsen R., van Hemel J. O., van den Ouweland A. M. W., Niermeijer M. F., Oostra B. A., Halley D. D. J. Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet* 1996; 33:1007-1010.
12. de Vries, B. B. A., Halley D. J. J., Oostra B. A. et al. The fragile X syndrome. *J. Med. Genet.* 1998; 35:579-589.

13. Dokic, H., Barišić I., Čulic V., Lozic B., Hecimovic S. Haplotype and AGG interspersions analysis of FMR1 alleles in a Croatian population: no founder effect detected in patients with fragile X syndrome. *Hum. Biol.* 2008; 80:581-587.
14. Dombrowski, C., Levesque S., Morel M. L., Rouillard P., Morgan K., Rousseau F. Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10 572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11:371-378. Dracopoli and Haines, 1994.
15. Eichler, E. E., Macpherson J. N., Murray A., Jacobs P. A., Chakravarti A., Nelson D. L. Haplotype and interspersions analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5:319-330.
16. Excoffier, L. and Lischer H. E. L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 2010; 10:564-567.
17. Fu, Y. H., Kuhl D. P. A., Pizzuti A., Pieretti N., Sutcliffe J. S., Verkerk A. J. M. H., et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991; 67:1047-1058.
18. Garber K. B., Visootsak J., Warren S. T. Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16:666-672.
19. Gunter C., Paradee W., Crawford D. C., Meadows K. A., Newman J., Kunst C. B., et al. Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7:1935-1946.
20. Hernandez R. N., Feinberg R. L., Vaurio R., Passanante N. M., Thompson R. E., Kaufmann W. E. Autism Spectrum Disorder in Fragile X Syndrome: A Longitudinal Evaluation. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(6):1125-1137.
21. Krūmiņa Dž., Kokare I., Biķis E. Latvijas bērnu fiziskās attīstības novērtēšana. SIA Medicīnas apgāds, 2007, Rīga.
22. Kunst, C. B., Zerylnick C., Karickhoff L. et al. FMR1 in Global Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 58:513-522.
23. Larbrisseau A., Jean P., Messier B., Richer C-L. Fragile X chromosome and X-linked mental retardation. *CMA Journal* 1982; 127:123-126.
24. Macpherson, J. N., Bullman H., Youngs S. A. et al. Insert size and flanking haplotype in fragile X and normal population: possible multiple origins for the fragile X mutations. *Hum. Mol. Genet* 1994; 3:399-405.

25. Malmgren, H., K. H. Gustavson, C. Oudet et al. Strong founder effect for the fragile X syndrome in Sweden. *Eur. J. Hum. Genet.* 1994; 2:103-109.
26. Moutou C., Vincent M. C., Biancalana V., Mandel J-L.. Transition from premutation to full mutation in fragile X syndrome is likely to be prezygotic. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 3:971-979.
27. Murray A., Macpherson J. N., Pound M. C., Sharrock A., Youngs S. A., Dennis N. R., et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6:173-184.
28. 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; 252:1097-1102.
29. Oudet C., Mornet E., Serre J. L., Lentes-Zengerling F. T. S., Kretz C., Deluchatt C., Tejada I., Bouet J., Bouet A., Mandel J. L. Linkage Disequilibrium between the Fragile X Mutation and Two Closely Linked CA Repeats Suggests That Fragile X Chromosomes Are Derived from a Small Number of Founder Chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 52:297-304.
30. Peixoto A., dos Santos M. R., Seruca R. Amorim A., Castedo S. Analysis of *FMR1* and flanking microsatellite markers in normal and fragile X chromosomes in Portugal: evidence for a “protector” haplotype. *Eur. J. Hum. Genet.* 1998; 6:518-522.
31. Pekarik V., Blazkova M. and Kozak L. Haplotype analysis of the fragile X syndrome gene *FMR1* in the Czech Republic. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 84:214-21.
32. Phadke S. R. Fragile X syndrome. Orphanet encyclopaedia. 2005; <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Fragile-X.pdf>
33. Poustka A., Dietrich A., Langenstein G., Toniolo D., Warren S. T., Lehrach H. Physical map of human Xq27-qter: Localizing the region of the fragile X mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:8302-8306.
34. Puusepp H., Kahre T., Sibul H., Soo V., Lind I., Raukas R., Õunap K. Prevalence of the Fragile X Syndrome Among Estonian Mentally Retarded and the Entire Children's Population *J. Child. Neurol.* 2008; 23:1400-1405.
35. Rajkiewicz, M. 2008. Molecular analysis of the *FMR1* gene and searching for the premutations in the large group of Polish ataxia patients and group of women with premature ovarian failure. Ph.D. dissertation. Department of Genetics, Institute of Psychiatry and Neurology, Warsaw, Poland.

36. Richards R. I., Shen Y., Holman K., Kozman H., Hyland V. J., Mulley J. C., Sutherland G. R. Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J. Hum. Genet.* 1991; 28:818-823.
37. Ridaura-Ruiz L., Quinteros-Borgarello M., Berini-Aytés L., Gay-Escoda C. Fragile X-syndrome: Literature review and report of two cases. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 2009; 14(9):434-439.
38. Rife M., C. Badenas, L. Quinto et al. Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10:773-779.
39. Rousseau F., Heitz D., Oberle I., Mandel J-L. Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation. *J. Med. Genet.* 1991; 28:830-836.
40. Sambrook J. and Russell D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. Cold Spring Harbor, NY.
41. Sherman S., Plecher B. A. and Driscoll D. A. Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. *Genetics in Medicine* 2005; 7:584-587.
42. Zhou Y., Tang K., Law H. Y., Ng I. S. L., Lee C. G. L., Chong S. S. FMR1 CGG repeat patterns and flanking haplotypes in three Asian populations and their relationship with repeat instability. *Ann. Hum. Genet.* 2006; 70:784-796.