

한국인 Fragile-X 증후군 환자의 분자 유전학적 진단

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 소아과학교실
아산생명과학 연구소 분자 유전학과
김 경 모 · 유 한 옥

= Abstract =

Molecular Diagnosis of Korean Patients with Fragile-X Syndrome

Fragile-X syndrome (FXS) is the most common cause of inherited mental retardation. Until recently, the diagnosis of FXS has been made based on the cytogenetic expression of the fragile site at Xq27.3 (FRAXA) in the patients' cultured cells and on the results of linkage analysis with DNA markers surrounding the fragile X locus. The recent cloning of fragile-X gene(FMR-1) made it possible investigate the molecular defects in FMR-1 gene of individuals at risk. Vast majority of molecular defects of FXS has been known to be an abnormally amplified trinucleotide(cytosine guanine guanine) repeat.

This study aims at establishing the molecular genetic diagnosis of FXS as well as correlating genotype-phenotype analyzing the increment of amplified CGG repeat number, clinical findings, and cytogenetic expression rate in two Korean families with FXS patients. The FXS patients are tested cytogenetically & molecular genetically. The fragile site at Xq27.3 was cytogenetically expressed in folate deficient medium by culturing lymphocytes for 4 days. Molecular diagnostic approaches utilize the genomic DNA Southern blot analysis using genomic probe FXA 241 (ONCOR) and radiolabelled PCR-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

Each patient expressed a FRAXA site in folate deficient medium with the expression rate of 38%, 16% respectively. The molecular genetic study showed that each patient had the CGG amplification 1.6kb, 0.7-0.8kb in the FMR-1 gene respectively. In addition, this study clarified the carrier status of each family members.

In conclusion, molecular genetic studies employed in this study can be utilized for a confirmatory diagnostic purpose in FXS patients.

Key words : Fragile X syndrome, FMR-1 gene, Molecular diagnosis

본 연구는 아산생명과학연구소 연구비의 일부 보조로 이루어졌음

서 론

정신 지체 아동은 그 아동이 속한 가정뿐 아니라 사회 경제적으로도 큰 부담이 되고 있지만 그 원인을 상당 부분 알 수 없는 경우가 많다. 그러나 최근 과거에는 원인을 몰랐던 정신 지체의 병인이 세포 유전학, 임상 유전학, 기형학, neuroimaging 기술의 발달에 힘입어 구체적으로 알려지고 있다. Fragile-X 증후군은 유전성 정신 지체의 가장 흔한 원인으로써 남아 1800명당 1명꼴의 발생빈도를 보인다고 하나 우리나라의 정확한 통계는 없는 형편이다. 이 질환은 반성 유전 방식을 취하나 대를 거듭함으로써 비로서 완전히 표현되는 독특한 질환이다. 이 질환의 원인이 되는 결함 유전자가 1991년 클로닝되면서 이 질환의 분자 유전학적 이해의 폭을 넓히게 되었다.

Fragile-X 증후군은 가장 흔한 유전성 정신 지체의 원인으로서 특정 민족에 관계없이 신생아 1000명당 0.5-0.9명의 발병율을 보인다.²⁻³ 유전 양식은 반성 열성 유전 방식을 취하지만 무증상의 남자(normal transmitting male)에서 딸을 거쳐 다음 세대를 거칠수록 임상 증상의 정도가 심해 지는 소위 Sherman paradox 양상을 보이는 독특한 질환이다.⁴ 과거의 이 질환의 진단은 임상적으로 정신지체, 자폐적 행동 양식, 큰 고환 및 귀 등의 이학적 소견과 세포 유전학적 검사에 의존해 왔으나. 무증상의 남자나, 보인자의 진단에는 크게 도움이 되지 못하였다. 최근 fragile-X 증후군의 결함 유전자의 위치가 알려진 이후 여러 RFLP DNA marker를 이용하여 linkage analysis로 진단하려는 분자 유전학적 시도가 있어 왔으나 이 역시 감수 분열시의 이들 RFLP marker의 cross over로 인하여 오류가 있다.⁵⁻⁸ 그러나 1991년 Yu 등⁹에 의해 유전자 (FMR-1)가 clone되고 이 유전자의 5'-쪽 CGG triplet의 불안정한 element가 팽창함이 원인인 것으로 알려지게 되었다. 이러한 현상에 근거하여 보인자 및 환자의 정확한 진단이 가능하게 되었을 뿐더러 phenotype도 genotype에 근거하여 예측하려는 시도가 활발하다.

본 연구는 원인이 확실치 않은 정신 지체 남자에서 physical index score에 근거를 두어 증례를 임상

적으로 의심하고 이들에게서 세포 유전학적 진단과 분자 유전학적 진단을 시도하여 임상적 표현형, 세포 유전학적 검사에서의 fragile site의 발현정도, 분자 유전학적 검사에서의 CGG triplets의 증폭정도를 연관 분석하여 분자 유전학적 진단의 확립을 목적으로 한다.

대상 및 방법

(1) 임상적 Fragile-X 증후군의 진단

임상적으로 본 질환이 의심되거나 이미 세포 유전학적으로 진단받은 환자들의 임상상을 객관적으로 평가하기 위해 Korean Wechsler Intelligence Scale for Children 검사로 경도 이상의 정신지체가 있는 환자에서 긴 얼굴, 긴 귀, 튀어 나온 귀, high arched 구개, 편평족, 과신전의 metacarpal phalangeal joint, double jointed thumbs, 심잡음 및 click, Sidney 또는 Simian palmar crease, hand callus 등을 조사했다. 남자의 경우 Prader orchidometer로 고환의 크기를 측정했다.¹⁰ 2 가계의 2명의 환자와 어머니와 여자 형제를 대상으로 하였다. 이들의 임상 양상은 table 1. 과 같다.

Table 1. Clinical features

Features/Patients	#1	#2
Autistic Behavior	+	+
Speech Disturbance	+	+
Broad Nasal Bridge	+	+
Hyperextensibility of Joints	+	+
Prominent Ears	+	
Family Hx of MR	+	
Velvety Skin		
Macroorchidism	+	+
Recurrent Otitis Media		
Seizure		+
Hallucal Crease		+

(2) Fragile-X 증후군의 세포 유전학적 검사

말초혈액 5ml을 heparin으로 처리된 주사기로 채혈하여 1000rpm에서 10분간 원심 분리 후 buffy coat 0.5ml씩을 5ml씩의 두 배지 (medium 199 HEPES buffered 100ml, fetal bovine serum 5ml, penicillin+streptomycin 1ml, L-glutamin 1ml)에

서 각각 PHA(M) 0.2ml로 자극하여 5% CO₂ 존재 하에 37°C에서 4일간 배양한 후 harvest 하기 1시간 전 10ug/ml 농도의 colcemid 용액 0.2ml로 처리하여 유사세포 분열 중기상을 유도했다. 1000rpm에서 10분간 분리하여 침전세포를 10ml phosphate buffered saline용액으로 세척하고 원심분리한 후 5ml의 저장성 용액 (0.075MKCl)에 철저히 재부유시켜 37°C에서 20분간 처리하였다. 그 후 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액을 조심스럽게 점적하여 고정한다. 실온에 20분간 세워둔 후 다시 원심분리하고 고정하는 과정을 최소 3회 이상 침전물이 하얗게 될 때까지 반복했다. 고정이 끝난 후 마지막 침전물을 0.5-1.0ml의 고정액에 재부유시켜 잘 닦인 차가운 slide에 2-3방울 점적하고 공기중에 건조시킨 후 65°C에서 밤새 건조하였다. 그 후 0.025% trypsin용액에서 slide를 25초간 처리하여 0.85% NaCl로 세척하고 공기 건조시킨 후 1000배 배율에서 현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다.¹¹

(3) Genomic DNA의 추출

대조군으로 사용하기 위해 정상인과 각 환자와, 또한 혈연 관계에 있는 가계구성원의 말초혈액 20ml을 heparin으로 처리된 시험관에 채혈하여 6% dextran in saline으로 상온에서 1-2시간 침전시켜 백혈구층을 분리한 후 phosphate buffered saline으로 2번 세척한 후 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 proteinase-K 용액(조성: 0.1% NaCl, 0.001M Tris-HCl pH=8.0, 0.001M EDTA, 0.5% SDS, 0.2mg/ml proteinase-K) 10ml에서 37°C에서 overnight시키고 동량의 phenol과, chloroform/isoamylalcohol(V/V 24:1) 용액으로 2회 추출했다. 수용성 상청액을 50ml 비이커에 옮겨 담은 후 5M NaCl을 최종 농도가 0.1M 되도록 첨가한 후 2.5배의 찬 100% ethanol을 가하여 DNA를 침전시키고 유리막대를 이용하여 휘 감은 후 15ml의 원추형 시험관에 옮겨 70% ethanol로 세척했다. 진공 건조기에서 건조시킨 후 0.5ml의 0.1X TE에 용해시켜 농도를 측정했다.¹²

(4) Fragile-X 증후군과 정상인에서의 FMR-1 유전자의 분자 유전학적 검사

(가) 중합 효소 연쇄 반응을 이용한 검사

CGG triplet의 증폭 정도를 알아 보기 위해 CGG repeats를 둘러 싸는 sense primer 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3'와 antisense primer 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'를 이용하여 15ul system으로 중합효소 연쇄반응시키는데 (Fig. 1) 반응액은 1.5ul 10X Taq buffer(500mM KCl, 150mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl:PH=9.0), 1.5ul DMSO, 200umol dATP, dCTP, dTTP, 50umol dGTP, 150umol 7-deaza dGTP, 1umol의 sense primer, antisense primer, 4uCi의 32P-dCTP, 1unit의 Taq polymerase로 이루어진다. 95°C에서 10분간 변성시킨 후 95°C에서 1분, 65°C에서 45초, 72°C에서 1분 30초를 한 주기로 25회 증폭시켰다. 15ul의 PCR product에 5ul의 formamide loading buffer를 가한 후 95°C에서 2분간 가열하여 얼음에 냉각시킨 후 4ul를 5% denaturation polyacrylamide gel에 2500 volt에서 3시간 전기 영동한다. 2시간 동안 gel을 건조시킨 후 밤새 자가 방사시켰다.¹³

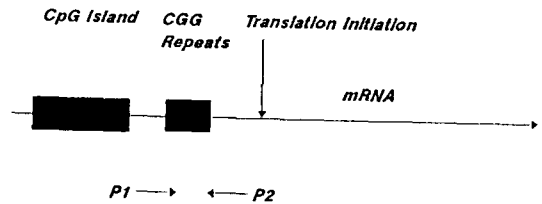


Fig. 1. Structural organization and primers location in the FMR-1 gene mRNA

(나) Genomic DNA의 Southern 분석

10ug의 genomic DNA를 10unit의 EcoR I으로 37°C에서 밤새 제한 효소 처리하여 1.0% agarose gel에서 30volt 로 bromophenol blue가 15cm정도 이동할 때까지 전기 영동 시킨 후 0.4N NaOH용액에서 Zetaprobe(Biorad) membrane에 밤새 Southern transfer하였다. Membrane을 80°C진공건조기에서 2시간 건조시킨 후 45°C에서 1시간 prehybridization 시키는데 용액은 50% formamide, 6X SSC(NaCl 52.59gm, sodium citrate 26.46gm, PH 7.5 in 1L of

H₂O), 10% dextran sulfate, 1% SDS로 이루어진다. Hybridization은 같은 성분의 용액으로 45°C에서 밤새하였는데 소식자는 상표화 되어 있는 ³²P-label된 fragile-X(fxa 241)를 사용한다.(Oncor, MD, USA)(Fig. 2) 이는 genomic DNA probe로서 actual specific activity는 3.76×10⁸dpm/ug이었고 1.5×10⁶dpm/ml of hybridization용액을 사용한다. Hybridization후 실온에서 15분씩 3회, 0.1X SSC, 0.1% SDS에서 세척하여 건조시킨 후 8시간 자가방사 시켰다.^{16,14-17}

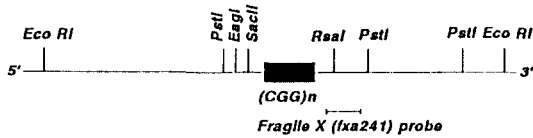


Fig. 2. Fragile-X DNA probe used in Southern analysis

결 과

(1) 세포 유전학검사

증례 1에서는 50개의 세포중기상 중에서 19개가 fragile site인 FRAXA 부위의 발현을 보여 38%, 증례 2에서는 50개의 세포중기상 중에서 8개가 FRAXA 부위의 발현을 보여 16%의 발현율을 보였다. (Fig. 3, Table 2.)

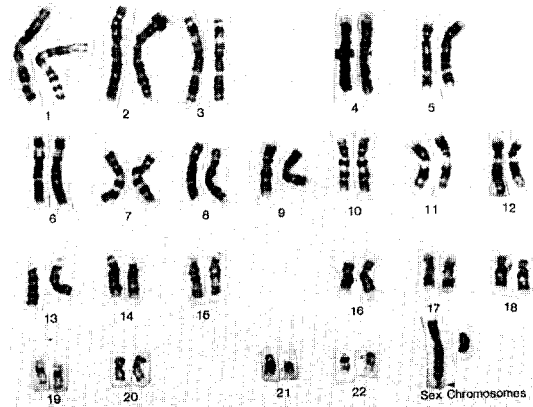


Fig. 3. Fragile-X chromosome indicated by an arrow head expressed in folate deficient medium

Table 2. Cytogenetic and molecular genetic studies on Korean fragile-X syndrome boys

Patients/ Diagnosis	FRAXA Site Expression	Increase in Size Over Normal	Interpretation
#1	19/50(30%)	1.6Kb	Full Mutation
#2	8/50(16%)	0.7-0.8Kb	Full Mutation
Mother of #1		0.3Kb	Premutation
Sister of #1		0.5Kb	Premutation

(2) 분자 유전학 검사

중합효소 연쇄 반응을 이용한 분자 유전학적 검사상 증례 2 환자는 5% denaturation polyacrylamide gel 전기영동 소견에서 1.1kb의 절편을 보였다. FMR-1 유전자의 CpG island와 CGG repeats를 포함하고 있는 Pst I 절편의 염기서열에 근거를 둔 두 primer에 의한 PCR product가 239-383bp(이중 flanking region의 221bp는 보존적인 염기서열임) 이면 CGG triplet repeats가 6-54 정도로 정상범위이다. 따라서 이 환자의 CGG triplet repeats는 300정도로 정상적인 한국인이 24repeats 내외(280-300bp 절편을 보이므로) 인데 비해 증폭되어 있다.(Fig. 4.) 증례

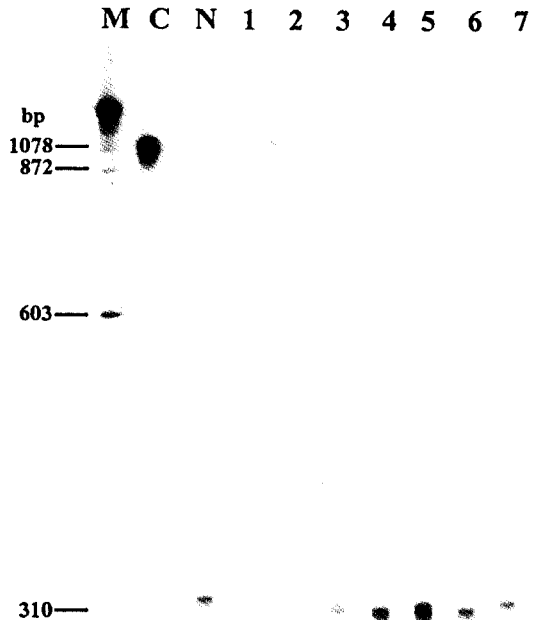


Fig.4. PCR study of CGG repeats in fragile-X syndrome patients(M:marker DNA, C: positive fragile-X syndrome N:normal control 1,2: case #1,2)

1 환자의 경우 전혀 PCR 증폭할 수 없어서 genomic fragile-X probe를 이용한 genomic DNA Southern blot을 이용해 되었는데 *Eco*R I로 제한효소 처리시에 정상적인 남자의 경우 5.2kb 절편을 보였으나 환자의 경우 6.8kb를 보여 1.6kb의 증가, 즉 500triplet repeats 증폭을 시사했다. 환자의 엄마와 누나도 5.6kb 내외의 절편을 보여 100-150 triplet repeats가 존재함을 시사했다.(Fig. 5, Table 2.)

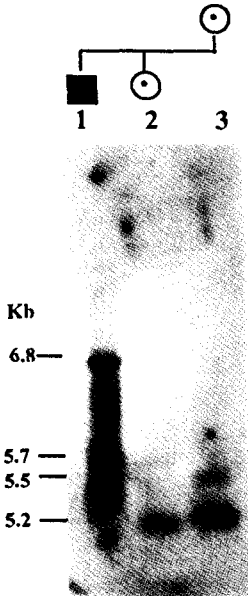


Fig.5. Detection of fragile-X mutations of DNA by Southern blot using *fxa* 241 genomic probe(1: case #1, 2: sister of case #1, 3: mother of case #1)

고 찰

Fragile-X 증후군은 1969년 Lubs¹⁸가 X염색체에서 fragile site를 처음 관찰한 이래 명명되어 왔는데 실은 1938년 Penrose¹⁹가 정신 지체 남자가 여자보다 25% 흔하다는 사실을 관찰하고 이에 반성 유전이 관여하리라는 시사를 했다. 1943년 Martin과 Bell²⁰이 반성 열성 유전 방식으로 유전되는 정신 지체의 큰 가계를 보고한 이래 이 질환이 또한 Martin-Bell 증후군이라고도 불리운다. 1977년 Suther-

land²¹가 fragile site의 발현이 folate dependent하여서 folate deficient 배지에서 X-염색체 장완의 끝, 정확히 Xq27-28 부위가 끊어져 보임을 밝힘으로 fragile-X 증후군이 X-linked 유전방식으로 유전됨을 확인 할 수 있었다. 그러나 전형적 성염색체 열성 유전 방식을 따르지 않아서 유전 상담에 장애가 많았으며 무증상의 남자 (Normal Transmitting Male; NTM)에서 유래하여 보인자인 딸을 거쳐 대를 거칠수록 표현형이 심해지고 확실해지는 양상을 띤다. 이를 Sherman paradox⁴라 하며 이런 현상을 현재는 분자 수준에서 설명할 수 있게 되었는데 이는 1991년 Yu와 Verker^{9,22}에 의해 fragile-X 증후군의 유전자를 클로닝함으로 가능케 되었다. 이 유전자는 FMR-1이라 불리고 genomic DNA는 475kb YAC clone의 형태로 클로닝되었고 크기는 cDNA가 2.4kb 정도이다

이 질환의 특징적 임상 양상을 보면 사춘기 이전은 주로 정신 지체 및 발달 장애와 아울러 자폐적 행동 양식 또는 과도한 행동등을 보여 소아 정신과의사에 노출되는 경우가 흔하며 이학적 소견상 긴 얼굴에 튀어 나온 큰 귀가 특징적이고 사춘기 이후에는 큰 고환이 특징적이다.²³⁻²⁴ 발병율은 민족에 따른 큰 차이가 없으며 보고에 따라 1000명의 남자 신생아당 0.5-0.9명 으로 알려져 있고 여자 보인자율은 2배 정도 흔하다.²⁻³ 국내에서의 인구에 근거를 둔 발병율은 조사된바 없으나 문등²⁵이 정신지체 한국 남아에서 fragile-X 증후군의 빈도를 6% 정도로 보고한 바 있다. 본 연구자에 의한 조사에 따르면 특수 교육시설에 등록된 정신지체 남아 중 1.3%가 fragile-X 증후군이었다.²⁶ 국외의 다른 보고들에 의하면 자폐증 남아의 5-15%, 정신 지체 남아의 6.3-13.6%에서 세포 유전학적 검사에 근거해서 fragile-X 증후군을 진단할 수 있다 했다.²⁷⁻²⁸

전통적인 진단은, 임상적으로 의심되는 환자에서의 세포 유전학적 진단 방법이 주종을 이루어 왔는데 배지에 methotrexate/thymidine, 또는 methotrexate/bromodeoxyuridine을 첨가하거나 저염산 농도의 배지를 사용하여 Xq27.3 fragile site의 발현을 관찰한다.²⁹⁻³⁰ 이 방법은 증상을 보이는 남자 환자에서 감수성은 99% 정도로 매우 높으나 증상 없는 보인자나 normal transmitting male의 진단에는 감수성

이 매우 떨어져 한계가 있었다. 한편 특이성도 떨어져 5% 이상의 fragile site의 발현이 있을때 진단할 수 있다.³¹⁻³² 본 연구에서는 각각 16%, 38%의 FRAXA 부위의 발현율을 보였다. 1980년대 초에서 1990년도까지 Xq27.3 부위 근처의 여러 polymorphic DNA marker를 발견하여 linkage 분석을 통하여 fragile-X 증후군의 분자 유전학적 진단을 시도해 왔다.⁵⁻⁸ 이러한 extragenic RFLP DNA marker를 이용한 진단은 다른 질환에서와 마찬가지로 여러 가족 구성원을 필요로 하여 DNA marker에 대해 informative해야 하고 감수 분열시 cross over의 가능성 때문에 진단적 정확도의 오차를 인정해야만 한다.

그러나 1991년 Verkerk 등과 Yu등의 두 그룹에서 fragile-X 증후군의 유전자 FMR-1을 클로닝했다.^{9,18} 이어 같은 해 Fu등이¹³ FMR-1 유전자 5'-end쪽 (CpG island로 부터 250base pairs distal)의 CGG trinucleotide repeat의 copy수가 비정상적으로 증폭됨으로써 이 질환이 초래됨을 보고하고 정상인은 copy 수가 6-50정도에서 정규분포를 이루고 premutation으로 임상 증상이 없는 경우 50-200 repeats이며, 임상 증상이 있는 full mutation의 경우 200 repeats 이상임을 보고했다. 그러나 정상 한국인에서의 CGG repeat의 분포는 보고된바 없다. 일단 CGG triplets 수가 50을 넘으면 CGG triplets가 불안정하게 되어 대를 거칠수록 팽창하여 임상 증상이 명확한 full mutation으로 진행케 된다. 그러나 최근 CGG triplet의 증폭없이도 FMR-1 유전자의 결실 또는 점 돌연변이에 의해서도 이 질환이 유발됨이 보고되고 있다.³³⁻³⁵ 이들의 경우에는 세포 유전학적 검사에서 Xq27.3 fragile site의 발현이 없는 경우가 대부분이다.

왜 FMR-1 유전자의 5' end CGG repeat의 증폭이 이 질환을 초래하는지 여러 가설이 있으나 아마도 CGG triplet의 증폭은 CpG island의 methylation을 조장하여 FMR-1 유전자를 down regulate 하는 것으로 생각한다.³⁶⁻³⁸ FMR-1 유전자는 조직에 비교적 특이적으로 발현하는데 뇌, 고환, 심장, 림프구 등에 주로 발현한다.³⁹ Fragile-X 증후군 환자에서는 FMR-1 mRNA가 발현되지 않는 것으로 알려져 있으나 국내에서의 보고는 없다. 아직 FMR-1 유

전자의 산물이 어떤 역할을 하는지 잘 모르나 RNA-binding 단백질이 알려졌다.⁴⁰

이와같이 fragile-X 증후군에 대한 분자 유전학적 측면에서의 병인론의 이해가 확대됨에 따라 보인자 및 무증상의 NTM의 진단에 부적합한 세포 유전학적 검사를 분자 유전학적 검사로 대체시키려는 추세이다. 분자 유전학적 검사의 요체는 CGG triplet의 증폭 정도를 정확히 알아내는데 있다. 제일 흔히 사용되는 방법으로는 genomic DNA를 사용한 Southern 분석인데 동위원소를 사용해야 하는 점은 있지만 여러 시료를 동시에 처리할 수 있고 정확도가 뛰어나다는 점을 들겠다. 주로 사용하는 제한효소로는 *EcoR I*, *Pst I*, *Hind III* 등이고 CpG island의 methylation pattern을 보기 위해서는 *Eag I*을 사용하여 genomic probe로 검색한다. 많은 genomic probe가 사용가능하다.^{10,14-17} 다른 분자 유전학적 방법은 CGG repeat를 에워싸는 primer로 radiolabel된 dCTP와 7-deaza dGTP등을 사용하여 PCR 증폭시킨 후 denaturing polyacrylamide gel에 전기영동하여 PCR 산물의 크기를 정한다. 이 방법은 간편하고 시간이 적게 걸리기는 하나 CGG의 증폭이 큰 경우는 PCR 증폭이 어려워 한계가 있다.^{13,41} 분자 유전학적 진단방법이 외국의 경우 보편화되었으나 국내에서의 시도는 본 연구가 fragile-X 증후군을 분자 유전학적, 세포 유전학적으로 동시에 진단한 처음 시도이다.

Fragile site는 정상적으로도 전 염색체에 걸쳐 무수히 많으며 folate-sensitive 부위도 18군데나 된다. 그 중 임상적으로 의미있는 부위가 Xq27.3로 분자 세포 유전학적으로는 이 부위가 다시 5부위로 나뉘어지는데 FRAXA 부위가 바로 fragile-X 증후군의 발현과 관계된다.¹¹

결 론

국내에서도 이 질환에 대한 임상적인 인지도가 높아져야 한다고 생각되고 정확한 case ascertainment을 위해서는 분자 유전학적 진단 방법이 확립되어야만 한다. 그러나 최근 외국의 보고들³³⁻³⁵과 같이 임상적으로 명확한 fragile-X 증후군의 경우에도 드물게 CGG triplet의 증폭이 없는 점돌연변이가 있을

수 있어서 이들의 경우는 FMR-1 유전자 자체를 조사하지 않고는 진단할 방법이 없는 한계가 있기도 하다. 이들의 경우에는 세포 유전학적 검사가 음성이기 때문에 더욱 그렇다. 또한 FMR-1 유전자의 결실이 있는 경우는 Southern 분석이 도움이 되지만 상기한 제한효소, probe등은 바뀌어야만 한다.

참고문헌

1. Caskey CT, Pizzuti A, Fu Y-H, Fenwick RG, Nelson DL(1992). Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 256:784-789
2. Sherman S. Epidemiology. in:Hagerman RJ, Silverman AC, eds.(1991) Fragile-X syndrome :diagnosis, treatment, and research. Baltimore: Johns Hopkins Press, pp69-97
3. Webb T, Bunday SE, Thake AI, Todd J(1986). Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome. *Am J Med Genet* 23:573-580
4. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, et al(1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Human Genet* 69:3289-3299
5. Arveiler B, Oberle I, Vincent A, Hofker MH, et al(1988). Genetic mapping of the Xq27-28 region: new RFLP markers useful for diagnostic applications in fragile X and hemophilia B families. *Am J Hum Genet* 42:380-389
6. Brown WT, Gross A, Chan C et al(1988). Multi-locus analysis of the fragile-X syndrome. *Human Genet* 78:201-205
7. Oostra BA, Hupkes PE, Perdon LF, et al (1990). New polymorphic DNA marker close to the fragile site FRAXA. *Genomics* 6:129-132
8. Suthers GK, Mulley JC, Voelckel MA, et al (1991). Genetic mapping of new DNA probes at Xq27 defines a strategy for DNA studies in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 48:460-467
9. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, et al(1991). Fragile-X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252:1179-1181
10. Staley LW, Hull CE, Mazzocco MMM, Thibodeau SN, et al(1993). Molecular-clinical correlations in children and adults with fragile-X syndrome. *Am J Dis Children* 147:723-726
11. Verma RS, Babu A(1989). Human chromosome. Pergamon press, New York pp117-124
12. Aldridge JL, Kunkel L, Bruns G, Tantravahi V, Lalaide M, et al(1984). A strategy to reveal high frequency RFLP's along the human X chromosome. *Am J Hum Genet* 36:546-564
13. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, et al(1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-1058
14. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, et al(1991). Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile-X syndrome of mental retardation. *NEJM* 325:1673-1681
15. Ramos F, Eunpu DL, Finucane B, Pfendner EG (1993). Direct DNA testing for fragile-X syndrome. *Am J Dis Children* 147:1231-1235
16. Sutherland GR, Gedeon A, Kozman L, Donnelly A, et al(1991). Prenatal diagnosis of fragile-X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *NEJM* 325:1720-1722
17. Mulley JC, Yu S, Gedeon AK, Donnelly A, Turner G, Loesch D, Chapman CJ, Gardner RJM, Richards RI, Sutherland GR(1992). Experience with direct molecular diagnosis of fragile-X. *Clinical Genetics* 59:368-374
18. Lubs HA(1969). A marker X-chromosome. *Am J Hum Genet* 21:231-244
19. Penrose LS (1938). A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. *Medical*

- research council. Special report series no. 229
20. Martin JP, Bell J(1943). A pedigree of mental defect showing sex linkage. *Journal of Neurological Psychiatry*. 6:154-157
 21. Sutherland GR (1977). Fragile site on human chromosomes:demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197:265-266
 22. Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, et al (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile-X syndrome. *Cell* 65:905-914
 23. Davies KE ed.(1989). *The fragile-X syndrome*.Oxford university press. pp1-138
 24. Simko A, Hornstein L, Soukup S, Bagamery N (1989). Fragile-X syndrome: recognition in young children. *Pediatrics* 83:547-552
 25. Moon HR, Moon SY(1993). Fragile site X chromosomes in mentally retarded boys. *J Korean Med Science* 8:192-196
 26. 신선경, 유한옥.(1994) 특수교육기관에 수용중인 정신지체 아동의 원인적 분류. *소아과*, 37:1437-1448
 27. Cohen IL, Sudhalter V, Pfadt A, Jenkins EC, Brown WT, Vietze PM (1991). Why are autism and fragile-X syndrome associated? conceptual and methodological issues. *Am J Hum Genet* 48:195-202
 28. Carpenter NJ, Leichman LG, Say B (1992). Fragile X-linked mental retardation. A study of 65 patients with mental retardation of unknown origin. *Am J Dis Child* 136:392-398
 29. Glover TW (1981) FUdR induction of the X chromosome fragile site:evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am J Hum Genet* 33:234-242
 30. Tommerup N, Poulsen H, Nielsen KB (1981). 5-Fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 18:374-376
 31. Jacobs PA, Glover TW, Mayer M, Fox P, et al(1980). X-linked mental retardation:A study of 7 families. *Am J Med Genet* 7:471-489
 32. Jenkins EC, Kastin BR, Krawczun MS, Lele PK, et al(1986). Fragile-X chromosome frequency is consistent temporally within replicate cultures. *Am J Med Genet* 23:475-482
 33. Boule KD, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, et al(1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genetics* 3:31-35
 34. Gedeon AK, Baker E, Robinson H, et al (1992). Fragile-X syndrome without CGG amplification has an FMR-1 deletion. *Nature Genetics* 1:341-344
 35. Wohrle D, Kotzot D, Hirst MC, et al (1992). A microdeletion of less than 250kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile site, in a male with the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 51:299-306
 36. Vincent A, Heitz D, Petit C, Kretz C, Oberle I, Mandel JL(1991). Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed field gel electrophoresis. *Nature* 349:624-626
 37. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, et al(1991). Physical mapping across the fragile-X: hypermethylation and clinical expression of the fragile-X syndrome. *Cell* 64:861-866
 38. Pieretti M, Zhang F, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL(1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile-X syndrome. *Cell* 66:817-822
 39. Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M(1993). *Nature Genetics* 3:36-43
 40. Siomi H, Siomi M, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74:291-298
 41. Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT(1992). Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 339:271-272