

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav biologie a lékařské genetiky



**Mgr. Alžbeta Vážna**

**Asociačná štúdia s génom *ADA* a detailná  
charakterizácia dvoch chromozomálnych  
prestavieb u autizmu**

*Dizertačná práca*

Praha 2009

# POĎAKOVANIE

Práca bola prevedená v laboratóriách molekulárnej biológie na Ústave biologie a lekárskej genetiky UK 2. LF a FN Motol. Moje poďakovanie patrí predovšetkým môjmu školiteľovi profesorovi Zdeňkovi Sedláčkovi, ktorého si veľmi vážim ako po profesionálnej, tak aj po ľudskej stránke, a to nielen z dôvodu, že sa snaží hľadať na ľuďoch hlavne ich pozitívne stránky a dať im svoju dôveru, čím dokáže ľudí vo svojom okolí nesmierne motivovať a povzbudiť presne vtedy, keď to najviac potrebujú.

Z ďalších spolupracovníkov podieľajúcich sa pri vznikaní tejto práce by som rada poďakovala p. primárke Markéte Havlovicovej za kompletizáciu databázy pacientov a výborné podklady pre prácu, psychiatrovi Michalovi Hrdličkovi za spoluprácu, cytogenetičkám Drahuške Novotnej a Zdeňke Vlčkovej za všetky cytogenetické nálezy, štatistikovi Janu Petráškovi za ochotu skontrolovať naše výsledky, kolegyni Markéte Vlčkovej za pomoc s klinickými otázkami, kolegyni Petre Hedvičákovej za analýzy MLPA a v neposlednom rade Zuzke Mušovej za analýzu FXS.

Ďalej chcem poďakovať ľuďom v mojom pracovnom aj osobnom živote, ktorí mi veľakrát pomohli svojimi skúsenosťami, radami alebo ochotou, a tak ovplyvnili aj moju prácu, menovite Šárke Bendovej, Mirke Hančárovej, Marte Kopečkovej, Dite Olchavovej, Kamile Procházkovej, Ive Redajovej, Majke Tomkovej, Alžbete Soukupovej a za domáce prostredie v práci zvlášť patrí vďaka Petrovi Vasovčákovi a Zuzke Mušovej.

Na záver patrí moja veľká vďaka mojim rodičom, bratovi Milanovi a priateľovi Renému, ktorí ma v štúdiu a v živote vždy veľmi podporovali, občas aj na svoj úkor.

## Obsah

POUŽITÉ SKRATKY .....	5
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
1.1 DEFINÍCIA A SUBKLASIFIKÁCIA AUTIZMU.....	6
1.2 NEUROBIOLOGICKÉ ZMENY U AUTIZMU .....	8
1.3 EPIDEMIOLOGIA AUTIZMU.....	9
1.4 DIAGNOSTIKA A LIEČBA AUTIZMU.....	10
1.5 KOMORBIDITY A VONKAJŠIE VPLYVY ASOCIOVANÉ S AUTIZMOM .....	11
1.6 GENETIKA AUTIZMU.....	12
1.6.1 Genetická epidemiológia autizmu .....	12
1.6.2 Prístupy k štúdiu genetickej podstaty autizmu .....	12
1.6.3 Genetické nálezy u autizmu .....	14
1.6.4 Súčasný pohľad na genetiku autizmu .....	22
<b>2. CIELE PRÁCE .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>24</b>
3.1 MATERIÁL.....	24
3.1.1 Súbor pacientov a kontrolných jedincov .....	24
3.1.2 Klinický popis a výsledky predchádzajúcich vyšetrení pacientky 1 .....	25
3.1.3 Klinický popis a výsledky predchádzajúcich vyšetrení pacientky 2 .....	27
3.2 METÓDY .....	29
3.2.1 Analýzy prevedené inými špecialistami, na ktorých je práca postavená.....	29
3.2.2 Array-CGH .....	31
3.2.3 Navrhovanie primerov .....	31
3.2.4 PCR amplifikácia DNA a long-range PCR.....	32
3.2.5 Gélová elektroforéza fragmentov DNA.....	34
3.2.6 RFLP analýza.....	34
3.2.7 Sekvenovanie DNA a analýza sekvencií .....	35
3.2.8 Bioinformatická analýza zlomov a deletovaných úsekov.....	36
3.2.9 Analýza rodičovského pôvodu aberovaného chromozómu .....	37
3.2.10 Analýza miery inaktivácie chromozómov X .....	38
3.2.11 Štatistické hodnotenie asociačnej štúdie.....	39

<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>40</b>
4.1 ASOCIAČNÁ ŠTÚDIA S VARIANTAMI V GÉNE <i>ADA</i> .....	40
4.1.1 Podtypy autizmu, úroveň MR a komorbidity v súbore pacientov .....	40
4.1.2 Molekulárna analýza genotypov <i>ADA</i> .....	42
4.1.3 Výsledky molekulárnej analýzy v súbore pacientov a u kontrol .....	43
4.1.4 Štatistická analýza asociačných štúdií .....	45
4.1.5 Vyhodnotenie asociácie alely <i>ADA</i> *2 s jednotlivými premennými .....	47
4.1.6 Vyhodnotenie asociácie alely <i>ADA</i> *2 v multivariantom teste.....	47
4.2 MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ ANALÝZA PACIENTKY 1 .....	49
4.2.1 Detailné mapovanie zlomov aberácie .....	49
4.2.2 Sekvencie DNA na zlomoch.....	50
4.2.3 Širší sekvenčný kontext zlomov .....	52
4.2.4 Gény na zlomoch a v deléciách .....	53
4.2.5 Rodičovský pôvod aberácie a potenciálne imprintované gény.....	55
4.3 MOLEKULÁRNO-GENETICKÁ ANALÝZA PACIENTKY 2 .....	56
4.3.1 Detailné mapovanie zlomov aberácie .....	56
4.3.2 Sekvencie DNA na zlomoch.....	57
4.3.3 Širší sekvenčný kontext zlomov .....	58
4.3.4 Gény v delécii .....	59
4.3.5 Rodičovský pôvod delécie .....	60
4.3.6 Stupeň inaktívácie chromozómov X.....	61
<b>5. DISKUSIA .....</b>	<b>62</b>
5.1 ASOCIAČNÁ ŠTÚDIA S VARIANTAMI V GÉNE <i>ADA</i> .....	62
5.2 DETAILNÁ ANALÝZA CHROMOZOMÁLNYCH ABERÁCIÍ .....	67
<b>6. ZÁVER .....</b>	<b>75</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATÚRA.....</b>	<b>76</b>

## Použité skratky

A	adenín
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder - porucha pozornosti s hyperaktivitou
ADI-R	Autism Diagnostic Interview – Revised (diagnostická škála)
AR	androgénový receptor
ASD	autism spectrum disorders - poruchy autistického spektra
bp	pár báz
C	cytozín
CARS	Childhood Autism Rating Scale (diagnostická škála)
CGH	comparative genomic hybridization - komparatívna genómová hybridizácia
CNV	copy number variation - polymorfizmus v počte kópií
DA	detský autizmus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EEG	elektroencefalografia
FISH	fluorescence in situ hybridisation - fluorescenčná in situ hybridizácia
FXS	fragile X syndrome - syndróm fragilného chromozómu X
FXTAS	fragile X-associated tremor-ataxia syndrome
G	guanín
gDNA	genómová DNA
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium - Hardy-Weinbergova rovnováha
K	keto (G/T)
MKCH-10	medzinárodná klasifikácia chorôb - 10. vydanie
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (laboratorná metóda)
MR	mentálna retardácia
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
N	ľubovoľný nukleotid (A/C/G/T)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man - databáza génov a genetických ochorení
O.R.	odds ratio - podiel šancí, relatívne riziko
P	probability value - hodnota pravdepodobnosti, významnosti
PCR	polymerase chain reaction - polymerázová reťazová reakcia
PDD	pervasive developmental disorders - pervazívne vývojové poruchy
POF	premature ovarian failure - predčasné zlyhanie funkcie vaječníkov
R	purín (A/G)
RFLP	restriction fragment length polymorphism - polymorfizmus v dĺžke reštrikčných fragmentov
SNP	single nucleotide polymorphism - bodový polymorfizmus
STR	short tandem repeat - krátka tandemová repetícia
T	tymín
VNTR	variable number of tandem repeats - variabilný počet tandemových repetícií
Y	pyrimidín (T/C)

# 1. ÚVOD

## 1.1 Definícia a subklasifikácia autizmu

Autizmus (OMIM #209850) je komplexné neurovývojové ochorenie vymedzené triádou základných príznakov: neschopnosťou vzájomnej spoločenskej interakcie, poruchami komunikácie a obmedzenými, často stereotypne sa opakujúcimi zvykmi a záujmami. V niektorých prípadoch je možné rozpoznať tieto symptómy už v prvých mesiacoch života a obyčajne pretrvávajú aj v dospelosti. Autizmus prvý krát popísal viedenský detský psychiater Leo Kanner v roku 1943 (Kanner 1943).

Autizmus patrí do širšej skupiny chorôb nazývanej pervazívne vývinové poruchy (pervasive developmental disorders, PDD). PDD sa podľa Diagnostického a štatistického manuálu pre mentálne poruchy (Štvrté vydanie, Revízia textu, DSM-IV-TR, Americká psychiatrická asociácia) (APA 1994) delia na päť hlavných podtypov:

- autistická porucha (detský autizmus)
- Aspergerov syndróm
- inak nešpecifikované PDD (PDD-Not Otherwise Specified, PDD-NOS), kam patrí najmä atypický autizmus
- iná detská dezintegračná porucha
- Rettov syndróm.

Detský autizmus, Aspergerov syndróm a atypický autizmus spolu zdieľajú najviac symptómov a sú spoločne označované ako poruchy autistického spektra (autism spectrum disorders, ASD). Medzinárodná klasifikácia chorôb (10. vydanie, MKCH-10, Svetová zdravotnícka organizácia) (WHO 1992) vymedzuje a presne definuje vyššie uvedené tri oblasti správania charakteristicky narušené u autizmu (sociálna interakcia, komunikácia a obrazotvorná hra, obmedzený a stereotypne sa opakujúci repertoár záujmov a aktivít) s tým, že tieto kvalitatívne odchýlky sú prenikavou črtou fungovania autistického pacienta vo všetkých situáciách.

Detský autizmus je najlepšie preštudovanou PDD a vzťahuje sa k nemu väčšina odborných štúdií a publikácií. Pre splnenie kritérií diagnózy detského autizmu je nutné, aby poruchy aspoň v jednej z troch psychopatologických oblastí boli zreteľné ešte pred dovŕšením tretieho roku života. Nástup príznakov býva obvykle pomalý a postupný, občas ale môže nastať aj tzv. „autistická regresia“, kedy dieťa stráca už naučené vedomosti. V sociálnej interakcii sa problémy u detí najprv prejavujú vyhýbaním sa očnému kontaktu a nevytváraním citových väzieb k mame. Neskôr deti nejavia záujem o kontakt s ľuďmi, o ich emócie alebo o používanie bežných sociálnych signálov. Oblasť komunikácie a hry môže byť narušená na všetkých úrovniach. Vývin reči býva oneskorený, pričom u niektorých detí sa reč nikdy nerozvinie do použiteľnej formy. Ak sa aj reč rozvinie, býva nápadná, monotónna, s narušenou vetnou stavbou a častým používaním osobitných slov alebo viet. Neverbálna zložka komunikácie zvyčajne úplne chýba. Hra autistických detí nie je založená na predstavivosti alebo kolektívnom hraní s inými deťmi, ale hračky bývajú používané neobvyklým spôsobom, často založeným na sústredení sa na konkrétny detail, napr. na stereotypnom otáčaní kolieska alebo ruky bábiky. Podobne sa prejavujú poruchy aj v tretej oblasti, v činnosti a záujmoch. Autisti ťpejú na stereotypných rituáloch každodenného života a na nemennosti ich okolia. Ich záujem sa sústreďuje na mechanické predmety a systémy, napr. na lego, žalúzie, telefónny zoznam alebo cestovný poriadok.

Aspergerov syndróm je najmenej závažný podtyp ASD, pri ktorom dochádza k najmenšiemu spomaleniu vo vývine. Pacienti majú lepšie komunikačné schopnosti, ale ich reč býva nápadná. Intelekt môže byť v rozsahu od nadpriemerne vysokej inteligencie až po miernu mentálnu retardáciu, ale sociálne schopnosti sú vždy nízke. Podľa dnešnej klasifikácie by bolo zaradených k Aspergerovmu syndrómu aj 11 detí pôvodne opísaných Kannerom v jeho prvotnej práci o autizme (Kanner 1943).

Posledným podtypom ASD je PDD-NOS, ktorého najčastejšou formou je atypický autizmus. Atypický autizmus sa odlišuje od detského autizmu buď vekom nástupu príznakov, alebo tým, že pacient nespĺňa kritériá v jednej alebo dvoch zo zmienených troch oblastí psychopatológie, ktoré sa vyžadujú na diagnózu detského autizmu. Atypický autizmus vzniká najčastejšie u hlboko retardovaných pacientov alebo u postihnutých jedincov s ťažkou špecifickou vývinovou poruchou receptívneho jazyka. (Hrdlicka 2004).

## 1.2 Neurobiologické zmeny u autizmu

Autizmus síce patrí medzi najčastejšie neurovývojové poruchy u detí, ale doteraz nie je objasnená príčina jeho vzniku. Všeobecne sa prijíma, že je spôsobený abnormalitami v štruktúre a činnosti mozgu. Neuroanatomické a neurozobrazovacie štúdie, ktoré skúmajú abnormity v neurovývojových procesoch prebiehajúcich v prvých dvoch tretinách gravidity, podporujú aj možnosť prenatálneho pôvodu ochorenia (Fombonne 2002; Bauman 2005; Miller 2005).

Zhruba u polovice pacientov s diagnózou detského autizmu boli *in vivo* alebo *post mortem* nájdené rôzne nešpecifické zmeny mozgu, napríklad abnormálny pomer bielej a šedej hmoty, či abnormálna štruktúra mozgovej kôry alebo mozočku. Napriek veľkému množstvu rôznych pozorovaných anomálií sa jediným zhodným nálezom medzi radom štúdií zdá byť zväčšený predný mozog (megalencefália) a zmenšený zadný corpus callosum (Goldberg 1999; Casanova 2007; Hughes 2007; Minshew 2007). Z mikroskopických zmien boli nájdené napríklad anomálie v limbických oblastiach mozgu či vyššia hustota neurónov v mozočku autistov, ktoré ale boli menšie v porovnaní s kontrolami (Minshew 2007).

Jednou z teórií neurologických príčin autizmu, podporovanou výsledkami novších štúdií metódami magnetickej rezonancie (magnetic resonance imaging, MRI) a funkčnej MRI, je menšia prepojenosť určitých oblastí mozgu, hlavne vo vnútri hemisfér a v mozgovej kôre (Hughes 2007; Minshew 2007). V etiológii autizmu môže hrať významnú úlohu aj myelinizácia bielej hmoty (Hughes 2007). V rade štúdií boli u autistov opísané biochemické odchýlky týkajúce sa napríklad dysfunkcie endogénnych opioidov alebo hladín a prenosu niektorých neuromediátorov ako serotonínu, glutamátu alebo dopamínu (Pardo 2007). Na patofyziológii autizmu sa podieľajú anomálie v troch aspektoch: v migrácii neurónov, v nerovnováhe dráždivo-tlmivých systémov a v tvorbe synapsí. Vo všetkých troch je za kľúčový považovaný serotonín (Takeuchi 2008).

Pre obrovskú komplexnosť a mnohostrannosť autizmu je ho však možné študovať z pohľadov rôznych odborných špecializácií v niekoľkých prekrývajúcich sa rovinách: psychologickkej, psychofyzickej, morfolologickej, neurovývojovej, neuroanatomickej, neurofyziologickej, neurobiologickej, biologickej a genetickej (Hrdlicka 2004).



### 1.3 Epidemiológia autizmu

Prevalencia ASD bola dlho udávaná v rozmedzí okolo 4–10/10000 s incidenciou 5/10000 detí (Smalley 1988; Fombonne 1998; Gillberg 1999). Súčasnú epidemiologickú štúdiu však udávajú vyššie hodnoty, líšiac sa ako použitou diagnostickou metódou, tak aj napríklad etnickým pôvodom pacientov.

V beloškých (kaukazských) populáciách sa incidencia autizmu udáva 4,3-5,5/10000 v Austrálii (Williams 2005), 4,5/10000 v Severnej Amerike (Barbatesi 2005), 8,3/10000 vo Veľkej Británii (Powell 2000) či 8,6/10000 v Dánsku (Lauritsen 2004). Podobná je aj v čínskej populácii Hong Kongu (5,5/10000) (Wong 2008), ale v Japonsku dosahuje až 27,2 na 10000 narodených detí (Honda 2005).

Prevalencia detského autizmu sa potom pohybuje v širokej škále 11-67/10000 v USA (Bertrand 2001; Croen 2002), 12/10000 vo Fínsku (Kielinen 2000), 16/10000 v Hong Kongu (Wong 2008), 19-116/10000 vo Veľkej Británii (Lingam 2003; Chakrabarti 2005; Baird 2006), 39/10000 v Austrálii (Icasiano 2004), 53/10000 vo Švédsku (Gillberg 2006) a 65/10000 v Kanade (Fombonne 2006).

V súhrne 34 epidemiologických štúdií Fombonne (2005) zaznamenal pomer mužov a žien u pacientov s ASD v rozmedzí 1,3-16:1, s priemerom 4:1. V ďalšej metaanalýze Fombonne (2009) zhrnul výsledky 43 štúdií od roku 1966 a zistil priemernú prevalenciu všetkých PDD okolo 60-70/10000, pričom na detský autizmus pripadalo okolo 20/10000, na PDD-NOS približne 30/10000 a na Aspergerov syndróm 6/10000. PDD tak spolu tvoria jednu z najčastejších neurovývojových porúch u detí. V priebehu posledných 15-20 rokov sa teda podľa niektorých štúdií výskyt autizmu zvýšil niekoľkonásobne, v USA udávajú až 556% nárast v prevalencii autizmu medzi rokmi 1991-1997 (Muhle 2004). Tento nárast sa môže vysvetliť presnejšou a jednotnejšou diagnostikou, lepšou starostlivosťou a lepším povedomím lekárov a verejnosti, ale úplne vylúčiť sa nedá ani skutočný nárast frekvencie ochorenia vplyvom dosiaľ neznámych faktorov.

## 1.4 Diagnostika a liečba autizmu

V súčasnosti existuje viacero metód pre diagnostiku autizmu. U nás sú najviac používané CARS (Childhood Autism Rating Scale) (Schopler 1980), ktorá psychiatra orientačne informuje aj o závažnosti zistenej poruchy, a ADI-R (Autism Diagnostic Interview - Revised) (Lord 1994), ktorá je podrobnejšia, ale časovo náročnejšia posudzovacia stupnica. CARS je založená na pozorovaní dieťaťa lekárom, sleduje 15 atribútov a je vhodná na rýchle potvrdenie alebo vylúčenie diagnózy autizmu. ADI-R tvorí dotazník 111 otázok rozdelených do štyroch problémových oblastí, na ktoré odpovedá opatrovník, najčastejšie mama.

Moderná diagnostika autizmu je ale medziodborová. Pri určovaní diagnózy je nutné vždy brať do úvahy, že sa jedná o široké spektrum symptómov, ktoré sa môžu spájať s mnohými inými somatickými ochoreniami či genetickými anomáliami. V komplexnom algoritme diagnostiky autizmu preto majú svoje miesto vedľa psychiatrických a psychologických metód aj postupy neurologické, moderné zobrazovacie metódy, analýza porúch metabolizmu a ďalšie biochemické prístupy, a v neposlednom rade aj vyšetrenia genetické.

Včasná diagnostika poruchy umožňuje skoré zahájenie edukačných programov, ktoré sú zvyčajne jediným účinným spôsobom ako pomôcť autistickým deťom. Špeciálna výchova pomáha zmierniť problematické správanie (agresivitu, sebapoškodzovanie, záchvaty hnevu) a zvyšuje prispôsobivosť a samostatnosť autistov. Z liečebných terapií sa osvedčila kognitívna a behaviorálna terapia, muzikoterapia, hipoterapia alebo arteterapia.

Z farmakologických prístupov sa skúšajú rôzne podporné terapie v závislosti na ďalších nálezoch u pacienta, ktoré ale neriešia hlavný, doteraz však nepoznaný problém príčiny rozvoja autizmu. Napríklad antipsychotikum Risperdal (risperidón), pôvodne určené na liečbu schizofrénie, je v súčasnosti prvý liek na trhu určený pre liečbu autistických behaviorálnych symptómov ako agresia, hnev a sebazraňovanie.

## 1.5 Komorbidity a vonkajšie vplyvy asociované s autizmom

Hoci mentálna retardácia (MR) nie je určujúcim meradlom autizmu, je diagnostikovaná až u 75% autistov. Asi 30% má ľahkú (IQ 50-69) a stredne ťažkú MR (IQ 35-49) a 45% ťažkú (IQ 20-34) až hlbokú MR (IQ 0-19) (Sadock 1999; Tuchman 2002). Postihnutí s hlbokým mentálnym deficitom a autizmom sa líšia od osôb s prostou mentálnou retardáciou svojím špecifickým správaním. V súbore 112 autistických detí bolo zistené, že až 70% z nich má najmenej jednu ďalšiu psychiatrickú poruchu, a 41% má dve a viac porúch, najčastejšie úzkostnú poruchu, hyperkinetickú poruchu (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) a poruchu nerešpektovania autority (oppositional defiant disorder) (Simonoff 2008). Z neurologických komorbidít je najčastejšia epilepsia, zhruba u 30% autistov (Minschew 2007; Benvenuto 2009). Veľa pacientov má tiež tzv. "mäkké" neurologické príznaky, a naopak asi len u jednej desatiny autistov nebola diagnostikovaná žiadna zjavná porucha CNS (Rapin 2008).

U 10% až jednej štvrtiny detí s autizmom je pridružená iná diagnostikovateľná porucha, ktorej príčina je často známa (Benvenuto 2009). Vtedy hovoríme o tzv. syndromickom autizme. Medzi týmito pridruženými poruchami sú veľmi časté geneticky podmienené ochorenia. Z monogénnych porúch sa s autizmom najčastejšie asociuje syndróm fragilného chromozómu X, tuberózna skleróza alebo niektoré dedičné metabolické vady (napr. fenyylketonúria, poruchy metabolizmu purínov a pyrimidínov). Z chromozomálnych syndrómov sa s autizmom môže spájať napr. Downov syndróm. Asociované genetické choroby budú viac rozobrané v kap. 1.6.3. Boli popísané aj prípady autizmu podmienené environmentálnymi faktormi, napríklad prenatálnym pôsobením lieku Thalomid (thalidomid) alebo prenatálnou infekciou rubeolou a cytomegalovírusom. Na myších modeloch sa ukázalo, že maternálna infekcia má škodlivý účinok na štruktúru a funkciu mozgu mláďat, spôsobuje atrofiu určitých oblastí mozgu a zmenšenie bielej hmoty v corpus callosum, zmenu hladín serotonínu, taurínu a kyseliny 5-hydroxyindolyloctovej a mení expresiu génov ovplyvňujúcich myelinizáciu (Fatemi 2008; Winter 2008; Fatemi 2009a; Fatemi 2009b). Pri vzniku autizmu môžu hrať rolu aj perinatálne problémy a komplikácie (Bilder 2009). Väčšina autistov však nemá žiadny z týchto genetických alebo iných defektov, a preto sú niekedy označovaní ako idiopatickí autisti. Doterajšie rodinné štúdie naznačujú, že práve genetika hrá zásadnú úlohu aj u týchto jedincov.

## **1.6 Genetika autizmu**

### **1.6.1 Genetická epidemiológia autizmu**

Najväčšiu podporu genetickej podmienenosti autizmu dávajú štúdie dvojčiat a štúdie rodín s výskytom autizmu. Rekurencia u súrodencov postihnutých detí sa udáva od 2% do 8% (Rutter 1999), čo je niekoľkonásobne viac, ako je prevalencia v bežnej populácii. Výsledky výskumov na dvojčatách ukazujú, že konkordancia u jednovaječných dvojčiat je medzi 60-92%, čo je značný rozdiel oproti 0-3% konkordancii u dvojvaječných dvojčiat (Folstein 1977; Steffenburg 1989; Bailey 1995).

Veľké množstvo štúdií sa zameralo aj na súrodencov a iných príbuzných detí s ASD. Ukázalo sa, že v rodinách pacientov sa u niektorých príbuzných vyskytujú vo vyššej frekvencii miernejšie sa prejavujúce abnormality charakteristické pre ASD, tzv. širší autistický fenotyp (broader autism phenotype, BAP) ako tomu bolo u kontrolných rodín (Bailey 1998; Constantino 2006; Orsmond 2007). Okrem toho zaznamenali u príbuzných zvýšený počet neuropsychiatrických porúch, najčastejšie sociálnych fobií, obsesívno-kompulzívnej poruchy alebo Tourettovho syndrómu (Piven 1997; Freitag 2007).

Tieto štúdie ukázali, že dedičnosť ASD je pravdepodobne multifaktoriálna. Pritom je možné predpokladať účasť mnohých génov, mnohonásobnú lokusovú aj alelovú heterogenitu, a možno aj komplikované medzigénové interakcie. Diskordancia u niektorých jednovaječných dvojčiat s autizmom naopak jasne indikuje, že výsledný fenotyp ovplyvňujú aj iné, pravdepodobne environmentálne faktory.

### **1.6.2 Prístupy k štúdiu genetickej podstaty autizmu**

Vzhľadom na komplexný spôsob dedičnosti nie je možné použiť pri hľadaní génov zodpovedných za autizmus klasické postupy aplikované na monogénne choroby, a je nutné využiť iné možnosti. Prvou z nich je analýza génov podmieňujúcich dedičné ochorenia asociované s autizmom. Myšlienka je taká, že pokiaľ mutácie v danom géne spôsobujú ochorenie, ktoré má medzi svojimi symptómami aj autistické črty, mohli by varianty tohto génu ovplyvňovať aj vznik autizmu samotného. Zatiaľ čo príslušné dedičné ochorenie býva spôsobované závažnými mutáciami, autizmus by mohol byť

podmieneny variantami s menej závažným dopadom, ako sú napríklad promótorové alebo intrónové varianty, ovplyvňujúce intenzitu expresie alebo pomery alternatívnych transkriptov daného génu. Táto cesta sa ale neukázala byť produktívnou (Vincent 1996).

Ďalším možným prístupom sú cytogenetické štúdie, ktoré pátrajú po zdedených či novo vzniknutých chromozomálnych odchýlkach. Asi 3-7% autistických pacientov má chromozomálne abnormality, ako delécie, duplikácie, inverzie alebo translokácie (Reddy 2005; Freitag 2007). Tieto chromozómové prestavby môžu viesť k zmene génovej dávky, k prerušeniu génu, či k odlúčeniu génu od jeho regulačných oblastí. Delécie môžu navyše odkryť recesívne mutácie na homologickom chromozóme. Podrobná charakterizácia chromozomálnych prestavieb u autistov tak môže ukázať na gény hrajúce rolu v tejto poruche. S rozmachom metód ako sú komparatívna genómová hybridizácia (comparative genomic hybridization, CGH), alebo jej citlivejšia varianta array-CGH, sa ukázali nové možnosti hľadania chromozomálnych defektov. Významným posunom sa teraz javí objav zvýšeného výskytu zmien v počte kópií genetického materiálu (copy number variation, CNV), hlavne v rodinách so sporadickým výskytom autizmu, tzv. simplexných rodinách (Sebat 2007) alebo u pacientov so syndromickým autizmom (Jacquemont 2006).

Ďalšou cestou, ktorá môže viesť k identifikácii génov spôsobujúcich autizmus, je hľadanie neobvyklých variant v génoch, o ktorých sa podľa ich známej funkcie predpokladá, že by mohli hrať rolu v rozvoji ochorenia. V asociačných štúdiách sa tieto varianty porovnávajú medzi pacientmi a nepostihnutými kontrolami. Jedná sa opäť o výskum založený na hypotéze - kandidátne gény pre tieto analýzy sú prednostne vyberané napríklad na základe patologických nálezov v mozgu pacientov s autizmom a kódujú proteíny, ktoré hrajú úlohu vo vývine mozgu, alebo sú spojené s mozgovou štruktúrou, neurotransmitermi, alebo neuromodulátormi potenciálne zapojenými do autizmu. Selekcia vhodných kandidátnych génov je problematická, čiastočne aj preto, že až 1/3 ľudských génov je exprimovaná v mozgu alebo v priebehu jeho vývinu. Preto sa vedci začali zameriavať na hľadanie génov podľa tzv. endofenotypov, pri čom sa sústreďujú na gény zodpovedné len za určitý typ autistických symptómov. To dovoľuje analyzovať etiologicky homogénnejšie podskupiny postihnutých. Tento prístup je podporovaný aj rodinnými štúdiami, v ktorých sa potvrdili niektoré autistické symptómy aj u nepostihnutých príbuzných (širší autistický fenotyp).

Bez hypotézy naopak pracujú rôzne celogenómové štúdie. Tie sa nesústredujú na vybrané gény alebo chromozomálne segmenty, ale analyzujú paralelne všetky gény a celý genóm. Príkladom môže byť porovnanie kompletného expresného profilu mozgu autistického pacienta s profilom normálnej kontroly. Experiment poukáže na gény, ktoré sú u pacienta exprimované viac alebo menej ako u kontroly, a mohli by teda mať kauzálnu rolu v ochorení. Na podobnom princípe môžu viesť k odhaleniu zmien v genóme pacienta celogenómové väzbové alebo asociačné štúdie. Väzbové štúdie hľadajú väzbu medzi autizmom a alelami polymorfných markerov v genómoch postihnutých súrodencov - idea je taká, že ak majú súrodenci to isté ochorenie, mali by mať spoločné aj segmenty genómu, ktoré nesú kauzálne alely. Celogenómové asociačné štúdie porovnávajú zastúpenie aliel medzi veľkými súbormi postihnutých jedincov a normálnych kontrol - predpokladá sa, že pokiaľ nejaká varianta spôsobuje chorobu, alebo sa v genóme nachádza tesne vedľa kauzálnej varianty (a je s ňou vo väzbovej nerovnováhe), bude sa vyskytovať u postihnutých častejšie ako u kontrol.

### **1.6.3 Genetické nálezy u autizmu**

#### **1.6.3.1 Známe genetické ochorenia asociované s autizmom**

Autistické črty sú najčastejšie asociované so syndrómom fragilného chromozómu X (podrobný popis syndrómu nižšie). U tohto syndrómu vykazuje autistické správanie asi 25% postihnutých chlapcov a asi 6% dievčat (Hatton 2006). V súboroch autistov sa tento syndróm nachádza asi u 2% pacientov (Bailey 1993; Li 1993). Podobne často sa tam nachádza aj duplikácia 15q, ktorá je vo väčšine prípadov spojená s prejavmi autizmu. Tuberózna skleróza je diagnostikovaná asi u 1% autistov, a autizmus je naopak pozorovateľný asi u 20% postihnutých týmto ochorením. Všetky ostatné syndrómy často obsahujúce vo svojom fenotype autistické rysy (Angelmanov syndróm, delécia 16p11, delécia 22q13.3, syndróm kortikálnej dysplázie a fokálnej epilepsie, Joubertov syndróm, syndróm Potocki–Lupski, syndróm Smith–Lemli–Opitz, Timothyho syndróm alebo skupina chorôb spojená s mutáciami génu *MECP2*) majú výskyt v súboroch autistov nižší ako 1% (Abrahams 2008). Na úrovni jednotlivých popísaných prípadov bola s autizmom asociovaná široká plejáda ďalších monogénnych chorôb a mikrolečných syndrómov.

### *Syndróm fragilného chromozómu X*

Syndróm fragilného chromozómu X (FXS, OMIM #300624) je veľmi pozoruhodným genetickým ochorením a súčasne najčastejšou monogénnou dedičnou chorobou asociovanou s autizmom. Je to aj najčastejšia známa monogénná príčina mentálnej retardácie s prevalenciou 1/4000-9000 u mužov a 1/7000-15000 u žien (Crawford 2001). Príčinou FXS je predĺženie polymorfnej repetície trinukleotidu CGG v 5'-neprekladanej oblasti génu *FMRI* v oblasti Xq27.3 (Fu 1991; Oberle 1991; Verkerk 1991; Yu 1991). V bežnej populácii majú normálne alely génu *FMRI* 5-35 opakovaní trinukleotidu CCG. Alely s 36-58 opakovaniami CGG patria do takzvanej šedej zóny - majú podstatne zvýšené riziko expanzie pri prenose do ďalšej generácie a v niektorých prípadoch sú spojené aj s ľahkými fenotypovými odchýlkami. Premutačné alely s počtom opakovaní CGG v rozmedzí 59 až 200 spôsobujú syndróm FXTAS (fragile X-associated tremor-ataxia syndrome) (Hagerman 2001) u starších mužov a predčasné zlyhanie funkcie vaječníkov u žien (Allingham-Hawkins 1999). Premutačné alely sú nestabilné a v prípade ich maternálneho prenosu sa môžu predĺžiť až na úroveň plnej mutácie.

Plné mutácie (viac ako 200 CGG tripletov) spôsobujú hypermetyláciu promotóru a prvého exónu génu *FMRI* a potlačenie expresie ním kódovaného proteínu FMRP (fragile-X mental retardation protein) (Oberle 1991). Ten sa viaže na mRNA a pôsobí ako translačný represor (Zalfa 2003), ktorý ovplyvňuje plasticitu synapsií a procesy v mozgovej kôre, mozočku a hipokampe (Jacquemont 2007). Muži s plnou mutáciou sú mentálne postihnutí, majú ľahké dysmorfické črty - makrocefáliu, veľké odstavajúce uši, prominentnú bradu, vysoký hlas a postpubertálny makroorchidizmus (zväčšené semenníky). Táto stigmatizácia sa prehľbuje s vekom, v útlom detstve nemusí byť nápadná, čo sťažuje diagnostiku. Časté býva kognitívne, jazykové a motorické spomalenie vo vývine. Okrem toho majú pacienti s FXS špecifické správanie, často aj s autistickými črtami. Ženy s plnou mutáciou majú vďaka prítomnosti druhej normálnej alely *FMRI* variabilne ľahší fenotyp, ale okolo 50% z nich má mentálnu retardáciu a behaviorálne problémy (de Vries 1996; Jacquemont 2007).

### 1.6.3.2 Nálezy klasických cytogenetických štúdií

Medzi najčastejšie mikroskopicky viditeľné chromozomálne prestavby u autistov patrí maternálna duplikácia lokusu 15q11-13 (1-3% pacientov) a duplikácia 22q11.2 (Vorstman 2006; Kumar 2009). Vorstman kombináciou publikovaných chromozomálnych nálezov a výsledkov väzbových a asociačných štúdií vyhodnotil ako najmarkantnejšie kandidátne oblasti záujmu niektoré už známe úseky chromozómov a označil aj niekoľko nových lokalít - na chromozóme 7 a lokusy 15q11-q13 a 5p14. Okrem toho určil aj nové kandidátne lokusy, ktoré sa neprekrývali s väzbovými a asociačnými štúdiami, ale prekrývali sa navzájom v rôznych cytogenetických štúdiách: 2q37, 5p15, 7q11.23, 11q25, 16q22.3, 17p11.2, 18q21.1, 18q23, 22q11.2, 22q13.3 a Xp22.2-p22.3 (Vorstman 2006).

### 1.6.3.3 Výsledky celogenómových väzbových štúdií

Dodnes bolo prevedených viacerými pracovnými skupinami niekoľko celogenómových väzbových skríníngov. Tieto štúdie odhalili množstvo štatisticky významných väzbových oblastí, no s malou jednotnosťou a reprodukovateľnosťou. Problém replikovať tieto nálezy v rôznych kohortách môže súvisieť s tým, že preukázať väzbu u rizikovej varianty génu s malým účinkom je oveľa ťažšie, ako u alely s veľkým účinkom, a že v rôznych rodinách sa uplatňujú iné genetické faktory.

Minimálne v dvoch nezávislých štúdiách bola nájdená väzba v oblastiach 2q, 3q25, 6q14-21, 7q31-36 a 17q11-21. V štyroch štúdiách bola najčastejšou lokalitou s významnou väzbou oblasť na 7q označená *AUTSI*, ktorá sa použitím štatistickej meta-analýzy zúžila na región 7q22-q32 (Freitag 2007; Losh 2008). Ďalšia meta-analýza zahŕňajúca až 9 štúdií zameraných na širší autistický fenotyp nepotvrdila väzbu v oblasti 7q, ale naopak našla najsilnejšiu väzbu v oblastiach 10p12-q11.1 a 17p11.2-q12 (Freitag 2007; Losh 2008; Kumar 2009). V ďalších prácach bola nájdená významná väzba v lokusoch 11p12-p13 (Szatmari 2007) alebo 5p14.1 (Ma 2009; Wang 2009), zatiaľ je to však len ďalší dielik do skladačky, ktorá už obsahuje väzby nájdené na všetkých zvyšných chromozómoch.



Nejednoznačné výsledky väzbových analýz viedli k pokusom hľadať kauzálne lokusy podľa konkrétnych endofenotypov. V štúdií zameranej na pacientov s ASD, v skupine rodín charakterizovanej ako  $IQ \geq 70$ , zaznamenali významnú väzbu na chromozóme 15q13.3-q14, a v skupine rodín s oneskoreným vytváraním prvých viet (delayed onset of first phrases) našli väzbu na chromozóme 11p15.4-p15.3 (Liu 2008).

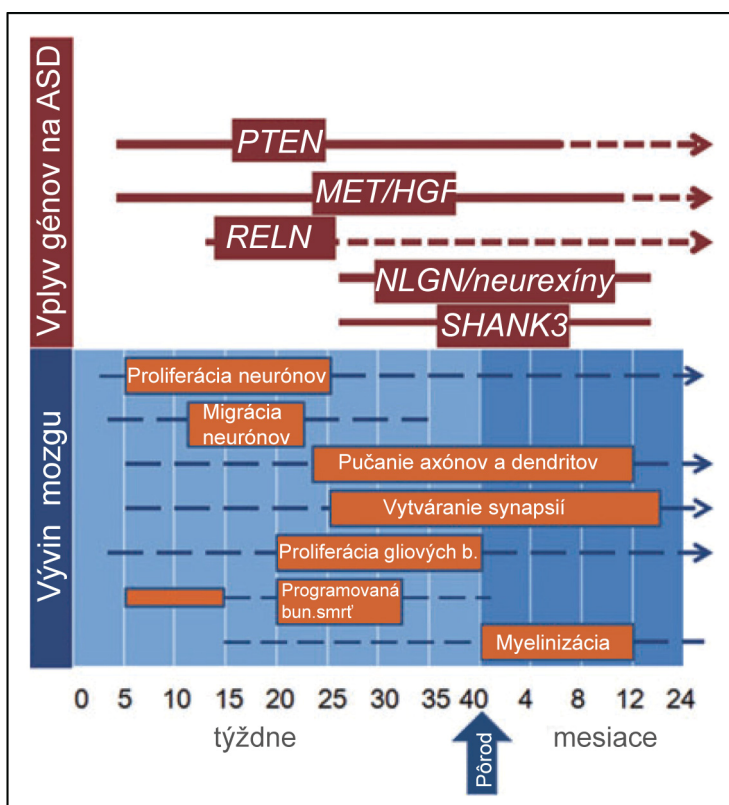
Určitým prekvapivým výsledkom všetkých týchto štúdií boli opakované negatívne nálezy signifikantnej väzby na chromozóm X, v rozpore s očakávaním kvôli vyššiemu pomeru mužov v prevalencii autizmu. Niekoľko štúdií ale väzbu na chromozóme X našlo, v lokuse Xq12 (Auranen 2002), Xq21.33 (Shao 2002) či Xq25 (Liu 2001). Naopak, nepotvrdila sa väzba na *FMRI* lokus v Xq27.3 (Vincent 2005).

#### 1.6.3.4 Asociačné štúdie s jednotlivými kandidátnymi génmi

V počiatočnom období genetickej analýzy autizmu boli prevádzané génové asociačné štúdie, zamerané na konkrétne alely vybraných kandidátnych génov, u ktorých sa predpokladá významný podiel na vývine ochorenia. Úlohou takej štúdie je zistiť, či je konkrétna alela (prípadne určitý genotyp) asociovaná s ochorením, teda či sa signifikantne líši frekvencia tejto alely (genotypu) v skupine pacientov od frekvencie v kontrolnej skupine nepostihnutých osôb. Využívajú sa pritom klasické polymorfne markery ako SNP, RFLP, mikrosatelitové repetície, alebo najnovšie aj CNV.

Kandidátne gény dôležité pre správnu neuronálnu a kortikálnu organizáciu zahŕňajú napr. gény pre hepatocytový rastový faktor HGF a jeho receptor MET, alebo gén pre signálnu molekulu reelín (Obr. 1). Gén *MET* je lokalizovaný na lokuse 7q31, jednom z regiónov najčastejšie asociovaných s ASD. *HGF* aj *MET* sú exprimované v prenatalnom mozgu, čo naznačuje ich úlohu pri vývine. Asociáciu s variantami génu *MET* potvrdili dve štúdie na americkej a talianskej populácii (Campbell 2006; Campbell 2008), kým v iných štúdiách bola potvrdená asociácia v americkom a anglickom, ale nie v talianskom súbore autistov (Jackson 2009; Sousa 2009). Reelín kódovaný génom *RELN* lokalizovanom na 7q22 je sekrečný proteín, ktorý kontroluje migráciu neurónov a iné vývinové aspekty mozgu. Asociácia génu *RELN* bola potvrdená v talianskej, americkej a čínskej populácii (Persico 2001; Skaar 2005; Li 2008), kým v indickej populácii a inej štúdií americkej populácie sa nepotvrdila (Li 2004; Dutta 2008).

Z ďalších patologických nálezov v mozgu autistov sú často zmieňované zmeny v hladine neurotransmiterov v serotonínerných, GABAerných a glutamátergných dráhach (Pardo 2007). Najviac skúmaným je serotonín (5-hydroxytryptamín), ktorého zvýšená hladina bola nájdená až u 30% autistov (Burgess 2006). Serotonín ovplyvňuje serotonínerný systém, tvorený sústavou neurónov v predĺženej mieche, moste, strednom mozgu a medzimotozgu a neuróny so serotonínovými receptormi sa vyskytujú tiež v limbickom systéme a v niektorých častiach mozgovej kôry. Niekoľko štúdií sa preto zameralo na gény zapojené do týchto dráh, napríklad pre transportér serotonínu 5-*HTT* (*SLC6A4*) alebo pre jeho receptor *HTR2A*. Veľa štúdií našlo signifikantnú asociáciu s niektorou variantou týchto génov (Cook 1997; Klauck 1997; Tordjman 2001; Yirmiya 2001; Kim 2002; Conroy 2004), pričom rovnako veľa štúdií tieto asociácie nepotvrdilo (Wu 2005; Ramoz 2006; Sakurai 2008; Guhathakurta 2009; Longo 2009), podobne ani ako meta-analýza 16 štúdií (Huang 2008).



Obrázok 1. Jeden z možných modelov genetického pozadia autizmu. Viacero génov asociovaných s ASD by mohlo ovplyvniť vývoj CNS v rôznych štádiách prenatálneho aj postnatálneho života. Tieto gény sú špecificky exprimované v určitom období (plná červená čiara) vývinu mozgu (oranžové rámce), ale ich vplyv môže pretrvávajúť aj v ďalších periódach vývinu, vrátane dospelosti (prerušovaná červená čiara). Prebraté z Pardo 2007.

#### 1.6.3.5 Celogenómové asociačné štúdie vrátane analýz CNV

Tento typ asociačných štúdií (genomewide association study, GWAS) systematicky prechádza obrovské množstvo polymorfnych markerov pokrývajúcich celý genóm a porovnaním veľkých súborov postihnutých a normálnych kontrol sa snaží odhaliť varianty asociované s ochorením. V poslednej dobe so vzrastajúcim povedomím o CNV a rýchlo sa rozvíjajúcim metódam pre ich detekciu sa celogenómové skríniny často sústreďujú práve na tento typ markerov.

Pomocou SNP markerov bol odhalený napr. gén *DRD3* pre dopamínový receptor, ktorého jedna bežná varianta je asociovaná s ASD (de Krom 2009). V dvoch nezávislých štúdiách bola potvrdená asociácia autizmu s regiónom 5p14, kde sú mapované gény *CDH9* a *CDH10* kódujúce kadheríny, molekuly bunkovej adhézie neurónov (Ma 2009; Wang 2009).

Šesť najnovších nezávislých štúdií GWAS s použitím metódy array-CGH identifikovalo rôzne mikrodélácie, mikroduplikácie a CNV asociované s autizmom. Sebat (2007) a Marshall (2008) zistili signifikantný nárast *de novo* CNV u autistov (osobitne 10% a 7%) oproti kontrolám (1%). Najvyšší záchyt bol v skupine sporadických prípadov, oproti tomu rodiny s viacerými postihnutými sa nelíšili od kontrol. Christian (2008) našla u 11,6% pacientov s ASD unikátne CNV, pričom len 14% z nich bolo *de novo*. Najvyšší záchyt CNV mal Jacquemont (2006), ktorý ich identifikoval u 8 z 29 (27,5%) pacientov so syndromickou formou ASD, z toho 6 bolo *de novo*.

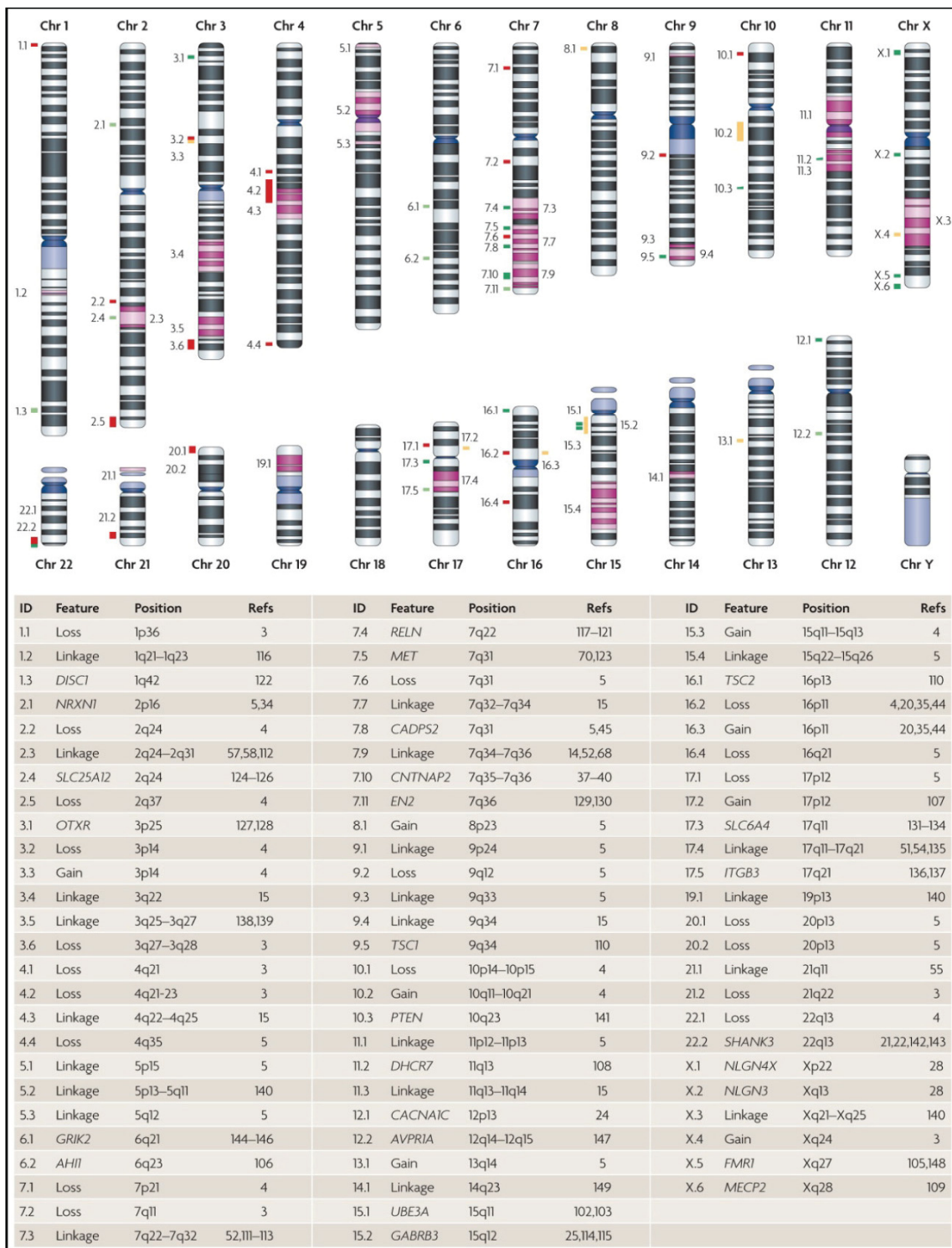
V troch štúdiách boli nájdené delécie a duplikácie v oblasti 16p11.2 u signifikantne viac autistov (okolo 1%) oproti kontrolám (0%) (Kumar 2008; Marshall 2008; Weiss 2008). Oblasť 16p11.2 obsahuje 25 génov, z ktorých niektoré sú zapojené do bunkových signalizácií a interakcií. Gény *DOC2A*, *MAPK3I* a *ALDOA* sú dôležité pre post-synaptickú denzitu a sú teda vhodnými kandidátmi pre autizmus. *MAPK3I* je exprimovaný vo fetálnom aj dospelom mozgu. Pri pokusoch s myšami knockoutovanými v tomto géne vykazovali tieto myši hyperaktivitu, abnormálne správanie a abnormality imunitného systému (Kakinuma 2008).

V novej štúdií od Glessnera (2009) sa najskôr zamerali na už publikované lokusy a kandidátne gény pravdepodobne asociované s autizmom. Vo svojej skupine

pacientov s ASD potvrdili nálezy CNV v lokusoch 15q11-q13 a 22q11.21 a v oblastiach génov *NRXN1* a *CNTN4*, kým v oblastiach iných kandidátnych génov, napr. *AUTS2*, *NLGN3*, *SHANK3* alebo 16p11.2, sa im asociácia nepotvrdila. Navyše našli u pacientov ďalších deväť génov s CNV, ktoré neboli nájdené v kontrolnej skupine. Najviac signifikantný bol lokus s duplikáciou 55 kb od *AK123120*, ďalej gény *GRID1* a *NLGN1*, ale zaujímavým objavom sú štyri gény patriace do ubikvitínovej rodiny (*UBE3A*, *PARK2*, *RFWD2* a *FBXO40*) (Glessner 2009). Doteraz stál v strede pozornosti len gén *UBE3A*, pritom ale všetky štyri gény kódujú ubikvitín-proteín ligázy. To môže súvisieť so známou funkciou ubikvitínu a ubikvitínového proteazómového systému v tvorbe pre- a post-synaptických kompartmentov regulujúcich napr. uvoľňovanie neurotransmiterov, recyklovanie synaptických váčkov, dynamické zmeny dendritických trňov a post-synaptickú denzitu.

V ďalšej veľkej štúdii zameranej hlavne na delécie a duplikácie exónov a duplikácie celých génov identifikovali viaceré už publikované *de novo* CNV v multiplexných rodinách (s viacerými postihnutými členmi) (Bucan 2009), čím sa pomaly začína vykresľovať obraz autistického genómu (Obr. 2). Bucan svojou prácou prispela aj k dlhému zoznamu kandidátnych génov, keď u 12 nepríbuzných autistov (ale u žiadnej kontroly) identifikovala CNV v exónoch viacerých génov, napr. v géne *BZRAP1*, kódujúceho adaptorové proteíny regulujúce synaptický prenos.

Z ďalších kandidátnych génov, viackrát sa opakujúcich v rôznych celogenómových štúdiách a dôležitých pre správne vytváranie a fungovanie neuronálnych synapsií, môžeme spomenúť napr. gény *NRXN1*, *CNTNAP2*, *CNTN4*, *NLGN3*, *NLGN4X*, *SHANK3* a *AP2* (Kumar 2009). Podporou pre gén *CNTN4* je práca Roohi (2009), kde u 3 jedincov s autizmom identifikovali paternálne zdedenú CNV na chromozóme 3. Dvaja súrodenci mali deléciu a tretí nepríbuzný pacient duplikáciu, ktoré boli výsledkom nealelickej rekombinácie cez repetíciu *Alu Y*. Obe prestavby narušili gén *CNTN4*. Keďže ním kódovaný kontaktín 4 má dôležitú úlohu pri vytváraní siete neurónov a zároveň je známa jeho účasť pri mentálnej retardácii, jeho mutácie môžu byť relevantné v patogenéze ASD (Roohi 2009).



Obrázok 2. Lokusy zapojené do etiológie ASD podľa doterajších výsledkov rôznych metodických prístupov. Červené obdĺžniky odpovedajú *de novo* deléciám a žlté *de novo* duplikáciám, ktoré sa našli u autistov, ale nie u kontrol. Zelené obdĺžniky odpovedajú kandidátnym génom pravdepodobne podmieňujúcim vyššie riziko vzniku ASD (buď cez vzácny syndróm alebo genetickú asociáciu). Ružové oblasti chromozómov odpovedajú miestam s nájdenou väzbou. Čísla pri chromozómoch odpovedajú číslam génov v tabuľke. Prebraté z Abrahams a Geschwind (2008).

#### 1.6.4 Súčasný pohľad na genetiku autizmu

Napriek dlhoročným snahám, bohatému financovaniu a širokej medzinárodnej spolupráci ucelený obraz génov zodpovedných za autizmus stále chýba. Získalo sa množstvo dát, ale rad pozitívnych nálezov sa nepodarilo replikovať. Pokrok v metódach celogenómových analýz v poslednom roku umožnil prevedenie niekoľkých veľkých štúdií, ktoré viedli k identifikácii CNV a génov nepochybné asociovaných s autizmom. Heterogenita je však príliš veľká a jednotlivé defekty sa nájdu iba v zlomku percent pacientov. Ich penetrancia je neúplná a ich fenotypový prejav veľmi heterogénny.

Okrem klasických mechanizmov sa špekuluje aj o úlohe epigenetiky v etiológii autizmu. Epigenetická regulácia expresie génov býva ovplyvnená aj environmentálnymi faktormi, čím sa vytvára spojenie medzi genómom a vonkajším prostredím pacienta. Epigenetické faktory sú angažované v patogenéze s autizmom asociovaného Rettovho syndrómu a syndrómu fragilného chromozómu X (Hagerman 2005; Lopez-Rangel 2006). Medzi neimprintované, ale metyláciou DNA regulované gény, patrí aj gén *RELN* (Schanen 2006). Existuje aj presah alebo tesná blízkosť väzbových oblastí autizmu a regiónov podliehajúcich genomovému imprintingu (15q11–13, 7q21–31.31, 7q32.3–36.3 a asi aj 4q21–31, 11p11.2–13 a 13q12.3) (Schanen 2006). Metylácia lyzínu v histónoch je zmenená v mozgoch psychiatrických pacientov vrátane autistov, pričom mutácie v génoch *JARID1C* alebo *SMCX*, kódujúcich histónové demetylázy, sú osobitne spájané s mentálnou retardáciou alebo autizmom (Akbarian 2009).

Kauzalita autizmu je teda zakliata krajina, ktorá len postupne odhaľuje svoje tajomstvá. Tie by sa mohli zhrnúť nasledovne:

- autizmus má nespochybniteľne silný genetický základ, ale genetické príčiny sú v populácii pacientov veľmi heterogénne
- CNV, najmä *de novo* CNV, sú často zodpovedné za autizmus, častejšie v simplexných rodinách ako v multiplexných, a ich penetrancia je vyššia u mužov
- v multiplexných rodinách môžu nepostihnuté ženy prenášať viaceré rizikové alely na potomstvo s dominantným efektom u synov
- fenotyp autizmu v oboch typoch rodín môže byť modifikovaný viac ako jedným prídavným genetickým, epigenetickým alebo environmentálnym faktorom.

## 2. CIELE PRÁCE

Cieľom práce bolo prispieť k pochopeniu role genetiky u autizmu. Podobne ako u väčšiny populačne najčastejších a medicínsky najdôležitejších chorôb sa aj u autizmu predpokladá multifaktoriálny alebo iný nemendelovský typ dedičnosti. Autizmus ako porucha s jasne preukázaným výrazným genetickým komponentom preto predstavuje dôležitý model a výsledky jeho štúdia môžu mať dôsledky pre rad ďalších ochorení.

V ČR je autizmus rutinne diagnostikovaný, ale jeho genetika zatiaľ nebola podrobnejšie študovaná. Genetická analýza autizmu má vedľa všeobecnej roviny aj veľmi dôležitú rovinu praktickú. Pretože je dnes využitie výstupov základného výskumu genetiky idiopatického autizmu limitované, najmä vďaka heterogenite a malej incidencii popísaných špecifických genetických defektov, predstavuje tohto času jedinú konkrétnu pomoc genetiky postihnutým rodinám identifikácia známych postihnutí, ktoré sú asociované s autizmom. A ich skríningom každá genetická štúdia autizmu začína.

Projekt popísaný v tejto práci takisto veľmi pekne kopíruje historický vývoj priorít ako aj metodických trendov vo výskume genetiky autizmu, kde bolo rozčarovanie z génových asociačných štúdií nahradené o to usilovnejším pátraním po defektoch na chromozomálnej úrovni a ich detailnou analýzou. Na základe niekoľkých publikácií popisujúcich asociáciu autizmu s génom pre adenosín deaminázu (*ADA*) u talianskych pacientov (ktorú v tom čase ešte nikto nevyvrátil) sa práca najskôr zamerala na zopakovanie tejto štúdie na veľkom súbore českých pacientov. Potom sme sa sústredili na chromozomálne aberácie u autistov.

### ***Konkrétne ciele***

- Previest' asociačnú štúdiu autizmu a dvoch známych variant *ADA\*1* (8A<sub>sp</sub>) a *ADA\*2* (8A<sub>sn</sub>) na veľkom súbore na pracovisku zhromaždených a komplexne vyšetrených pacientov s autizmom, vrátane pokusu o koreláciu s jednotlivými endofenotypmi (podtypmi autizmu, stupňom mentálnej retardácie)
- Previest' detailnú molekulárno-genetickú charakterizáciu rozsahu a zlomov vybraných chromozomálnych aberácií identifikovaných u dvoch pacientov z nášho súboru, vrátane následnej podrobnej bioinformatickej analýzy a interpretácie pravdepodobných dôsledkov defektov v genotype pacientov na ich fenotyp

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Súbor pacientov a kontrolných jedincov

V rokoch 2000-2009 bolo na Detskej psychiatrickej klinike 2. LF UK a FN Motol na autizmus vyšetrených viac ako 400 pacientov. Väčšina splňovala diagnostické kritéria autizmu podľa MKCH-10 a pomocou škály CARS a dotazníku ADI-R u nich bola potvrdená jedna z foriem PDD. Zvyšní pacienti kritéria nespĺňovali, ale vykazovali zjavné autistické črty (kategória pacientov niekedy nazývaná Not Quite Autism/Broad Spectrum (NQA/BS), klasifikácia podľa [www.agre.org](http://www.agre.org), (Geschwind 2001)). Na oddelení Klinickej genetiky Ústavu biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol boli všetci pacienti ďalej vyšetrovaní, registrovaní v databáze a rozdelení do podkategórií podľa podtypu autizmu, závažnosti mentálnej retardácie a prítomnosti alebo neprítomnosti komorbidít alebo iných klinických nálezov. Od väčšiny postihnutých detí a niektorých rodičov bol odobraný biologický materiál a od všetkých rodín bol získaný informovaný súhlas k laboratórnemu genetickému vyšetreniu.

Do asociačnej štúdie s génom *ADA* bolo zahrnutých 385 pacientov s autizmom alebo s autistickými črtami, od ktorých boli k dispozícii dostatočné informácie a dostatočné množstvo genómovej DNA. Jednalo sa o 72 dievčat a 313 chlapcov, priemerný vek 7,7 roku, rozsah 1,5-26 rokov.

Do asociačnej štúdie bolo zahrnutých aj 130 anonymných kontrolných vzoriek DNA z krvi zdravých jedincov, ktorí boli vybratí tak, aby zloženie kontrolného súboru korešpondovalo so zložením súboru pacientov z hľadiska veku a pohlavia. Boli to zdravé deti (26 dievčat a 104 chlapcov, priemerný vek 8,1 rokov, rozsah 2-17 rokov), ktoré sa podrobili menšiemu chirurgickému zákroku na úrazovej ambulancii FN Motol medzi februárom a júnom 1999. Tieto vzorky boli použité na zistenie frekvencie variant *ADA\*1* a *ADA\*2* v bežnej českej populácii.

Dve pacientky s autizmom, u ktorých boli v priebehu charakterizácie súboru nájdené chromozomálne prestavby, boli vybrané pre detailnú analýzu genetických defektov. Tieto dve pacientky sú podrobne opísané nižšie.



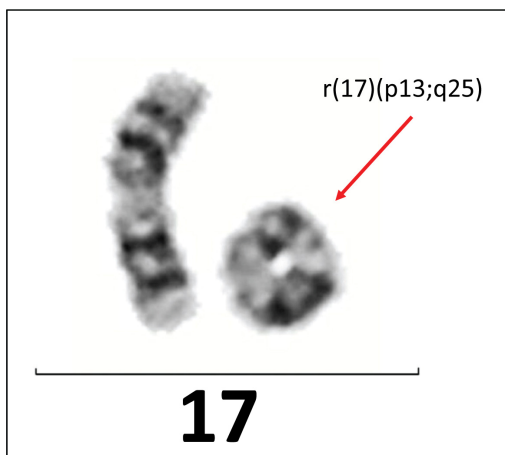
### **3.1.2 Klinický popis a výsledky predchádzajúcich vyšetrení pacientky 1**

Pacientka 1 sa narodila ako prvé dieťa 21-ročnej ženy a 22-ročného nepríbuzného muža. Pôrodná hmotnosť dievčaťa bola 2950 g (25.-50. percentil) a dĺžka 48 cm (25. percentil). Už u novorodenca bolo jemne naznačené mongoloidné postavenie očných štrbín, škvrny *café-au-lait* a depigmentácia kože na bruchu. V 4. mesiaci začali problémy s kŕmením a následne s prospieváním pacientky. Psychomotorický vývin bol oneskorený (sedenie s podporou vo veku 1 roku, prvé kroky v 18 mesiacoch). Aj vývin reči bol spomalený (prvé slová po 1. roku, jednoduché vety po 3. roku, ťažká dyslália).

Pacientka bola u nás vyšetrená vo veku 6,5 roka. Jej výška bola 104 cm (<3. percentil), hmotnosť 16,5 kg (<3. percentil), obvod hlavy 46,5 cm (<3. percentil). Dievčatko vykazovalo ľahké dysmorfické črty: brachycefáliu, bitemporálne zúženie hlavy, široký koreň nosa, úzke očné štrbiny s epikantálnymi záhybmi, tenkú hornú peru, široko rozložené zuby, kútiky úst smerujúce dole a nízko položené dysplastické uši. Na koži mala škvrny *café au lait*, ktorých počet aj rozsah sa vekom zvyšovali. Mala aj jemné pehy v podpazuší a v slabinách. Na základe tohto nálezu bola stanovená diagnóza neurofibromatózy typu 1 (NF1). Počas 4 rokov sledovania sa mierne dysmorfické črty nezmenili, ale zvýraznil sa rastový deficit. Epileptické záchvaty prvýkrát pozorované v 4 rokoch sa výrazne zhoršili, avšak po kombinovanej liečbe od 9,5 roka úplne ustúpili. Neurologické vyšetrenie v 10 rokoch konštatovalo mentálnu retardáciu, autistické rysy a oneskorený kognitívny a jazykový vývin. EEG vyšetrenie ukázalo pravostrannú epileptiformnú aktivitu v parietotemporálnej oblasti, kým MRI mozgu bolo normálne.

Pozoruhodný bol vývoj v správaní dievčaťa. V 6,5 rokoch boli dominantnými príznakmi hyperaktivita a nepozornosť. Obraz nebol typicky autistický (CARS skóre 26,5 bodov (hranica 30 bodov)) a bola pozorovaná mierna mentálna retardácia (IQ 69). Od 10,5 roka sa prejavili výrazné zmeny v správaní (agresivita, negativizmus, znížený prah bolesti a sebapoškodzovanie, neprimerané ovoniavanie vecí a nutkavý záujem pozorovať zvieratá a napodobňovať ich zvuky). CARS skóre dosiahlo iba 23,5 bodov, ale výsledky ADI-R potvrdili atypický autizmus. MR bola klasifikovaná ako stredne ťažká (IQ 45). Zhoršenie mentálnych schopností bolo pravdepodobne dôsledkom epilepsie a/alebo antiepileptickej liečby. V rodinnej anamnéze nebola zaznamenaná NF1, MR ani autizmus. Paternálny strýko matky pacientky spáchal samovraždu, paternálny starý otec matky bol alkoholik a maternálny bratranec mal tikovú poruchu.

Cytogenetická analýza leukocytov pacientky 1 odhalila mozaikový karyotyp 46,XX,r(17)(p13;q25)[83] / 45,XX,-17[12] / 47,XX,r(17),+r(17)[1] / 46,XX,-17,+mar1[2] / 46,XX,-17,+mar2[1] / 46,XX,-17,+mar3[1]. Kruhový chromozóm 17 bol teda prítomný vo väčšine analyzovaných buniek (83%), no nezanedbateľné množstvo buniek (12%) obsahovalo len jednu kópiu normálneho chromozómu 17 (Obr. 3). Marker chromozómy pochádzali z chromozómu 17, ale mali rozdielne veľkosti. Rodičia pacientky nesúhlasili s biopsiou kožných buniek pacientky pre analýzu mozaiky v inom type tkaniva. Karyotypy oboch rodičov boli normálne. Zlomy na oboch ramienkach r(17) boli v oblastiach svetlých terminálnych G-pruhov 17p13 a 17q25, čomu zodpovedá strata rádovo do 10 Mb DNA na oboch koncoch chromozómu.



Obrázok 3. Chromozómy 17 nájdené v karyotype pacientky. Kruhový chromozóm 17 sa našiel v 83% leukocytov.

Analýza FISH potvrdila deléciu subtelomerických lokusov D17S2199 (60 kb od 17pter) a D17S2200 (90 kb od 17qter) (Knight 2000) z r(17), kým gén *MDLS* (asi 2,5 Mb od 17pter) nebol deletovaný. Výsledok analýzy FISH teda bol 46,XX,r(17).ish r(17)(D17S2199-,LIS1+,TP53+,FL1+,D17Z1+, D17S2200-). Analýzou MLPA bola zistená delécia génov *GEMIN4* a *SECTM1* na r(17). Touto analýzou sa vylúčili zlomy v terminálnych 640 kb na 17p a v terminálnych 700 kb na 17q. Signály v ostatných subtelomerických oblastiach nevykazovali odchýlku od kontrolnej DNA. Podobne sa metódou MLPA u pacientky nezistila delécia žiadneho exónu génu *NFI*, ktorá by sa mohla očakávať na základe symptómov neurofibromatózy v jej fenotype.

Tieto pozorovania boli publikované (Havlovicova 2007).

### 3.1.3 Klinický popis a výsledky predchádzajúcich vyšetrení pacientky 2

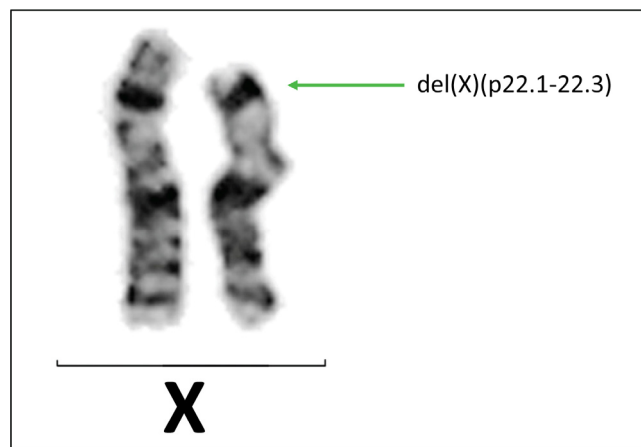
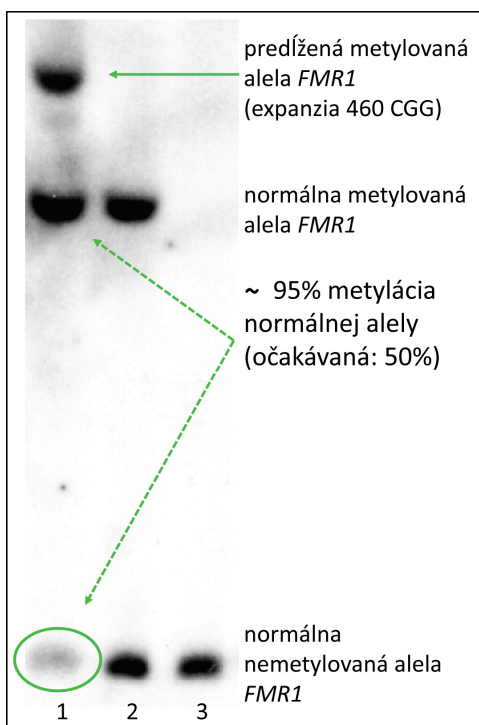
Pacientka 2 sa narodila zdravým nepríbuzným rodičom ako ich prvé dieťa vo veku 26 rokov matky a 31 rokov otca. Pôrod bol umelo vyvolaný v 42. týždni bezproblémového tehotenstva. Pôrodné parametre: váha 3750 g (75. percentil), dĺžka 51,5 cm (75. percentil), Apgarovej skóre 9, 10 a 10 po 1., 5. a 10. minúte. Po narodení dievčatko slabo pilo, stratilo na váhe a prekonalo novorodeneckú žltáčku. U pacientky postupne dochádzalo k výraznému oneskoreniu psychomotorického vývinu (plazenie v 10., státie v 15., chodenie v 20. mesiaci). Vývin reči nebol oneskorený, ale reč bola značne zvláštna a dyslalická; okrem toho sa vyskytli aj gramatické problémy.

Pacientka bola u nás vyšetrená vo veku 6,5 roka s oneskoreným vývinom, ľahkou mentálnou retardáciou, autistickými črtami a podozrením na pervazívnu vývojovú poruchu. Vo veku 6,5 roka bola pacientka vysoká 120 cm (50. percentil), vážila 28 kg (90-97. percentil) a obvod hlavy bol 52 cm (75. percentil). Okrem nadváhy sa u nej prejavili aj mierne dysmorfické črty ako vypuklé čelo, strabizmus, úzky koreň nosa, odstávajúce dysplastické ušnice a tenká horná pera. Na tlstých rukách mala krátke tučné prsty a široké palce. Röntgenové snímky ukázali príznaky Thiemannovej choroby.

Pacientke bol diagnostikovaný atypický autizmus vo veku 7,5 roka. V škále CARS dosiahla 32 bodov. V škále ADI-R mala pozitívne skóre v doménach "Repetitive Behaviors a Stereotyped Patterns", "Qualitative Impairments in Reciprocal Social Interaction" a "Verbal Communication". V jej správaní sa prejavovala náladovosť, tvrdohlavosť, dlhotrvajúca mrzutosť, záchvaty hnevu, agresivita, sebapoškodzovanie a hyperkinetický syndróm. Okrem toho v kontakte s rodinou aj cudzími ľuďmi opakovane používala vulgarizmy a nemiestne vyjadrovanie. V rodine pacientky nebola pozorovaná mentálna retardácia ani autizmus. U maternálneho starého otca sa vyskytol tremor s neskorým nástupom vo veku 60 rokov. Maternálna teta a prastará mama trpeli na predčasné zlyhanie vaječníkov (POF).

Rodinná anamnéza pacientky 2 zahrňujúca MR (u pacientky), tremor s neskorým nástupom a POF poukazovala na možný defekt v géne *FMRI*. Vyšetrenie bolo prevedené dvoma nezávislými molekulárnymi metódami. Ako PCR, tak aj Southernova hybridizácia identifikovali plnú mutáciu v géne *FMRI*, čím sa potvrdila diagnóza syndrómu fragilného X u pacientky. Asymptomatická matka a maternálny

starý otec s tremorom boli nositeľmi premutácie (s počtom 90 a 96 opakovaní CGG). Vzorky DNA od maternálnej tety a prastarej mamy s POF neboli k dispozícii. Southern blot určil počet opakovaní CGG u plnej mutácie pacientky 2 približne na 460. Táto metóda navyše odhalila u pacientky takmer úplnú metyláciu druhej, nemutovanej alely *FMRI* (Obr. 4), čo bolo v protiklade s očakávanou 50% metyláciou každého chromozómu X (za predpokladu náhodnej X-inaktívácie). Príliš veľká saturácia signálu z expandovaných metylovaných fragmentov síce neumožnila stanoviť presný pomer, ale metylácia normálnej alely bola najmenej 90%.



Obrázok 5. Chromozómy X nájdené u pacientky, šípka naznačuje deléciu v oblasti Xp.

Obrázok 4. Southern blotová metylačná analýza génu *FMRI*. V dráhe č.1 naša pacientka, č.2 normálna žena, č.3 normálny muž. U normálnych jedincov sonda identifikuje krátky fragment z aktívnej nemetylovannej alely *FMRI* (u oboch pohlaví) a dlhší fragment z inaktívnej metylovannej alely (u žien). Pacientka má okrem toho aj ďalší dlhý fragment vznikajúci z mutovanej metylovannej alely (plná šípka). Signál z nemetylovannej normálnej alely je veľmi slabý oproti metylovanému (prerušovaná šípka).

Vyšetrenie karyotypu pacientky 2 ukázalo veľkú *de novo* deléciu v oblasti Xp22.1-p22.3 (Obr. 5) na jednom z jej X chromozómov. Karyotypy oboch jej rodičov boli normálne. Vyšetrenie metódou FISH preukázalo, že obidve väzbové miesta pre subtelomerické sondy na Xp a Xq boli prítomné na aberantnom chromozóme, takže sa jednalo o intersticiálnu deléciu.

## 3.2 Metódy

### 3.2.1 Analýzy prevedené inými špecialistami, na ktorých je práca postavená

#### 3.2.1.1 Psychiatrická diagnostika autizmu

Poruchy autistického spektra boli diagnostikované škálou CARS (Childhood Autism Rating Scale) (Schopler 1980) a dotazníkovým interview ADI-R (Autism Diagnostic Interview - Revised) (Lord 1994). Pásmo mentálnej retardácie bolo stanovené psychologickým vyšetrením (hlboká MR = IQ 0-19, ťažká MR = IQ 20-34, stredne ťažká MR = IQ 35-49, ľahká MR = IQ 50-69). Vyšetrenia boli prevedené na Detskej psychiatrickej klinike 2. LF UK a FN Motol (Michal Hrdlička).

#### 3.2.1.2 Klinicko-genetické a genealogické vyšetrenia

Tieto vyšetrenia boli postavené na rozhovore s rodičmi pacienta, na štúdiu zdravotnej dokumentácie a posúdení fenotypu pacienta. Všetky údaje boli vložené do databázy. Vyšetrenia boli prevedené na Ústave biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol (Markéta Havlovicová).

#### 3.2.1.3 Karyotypovanie

Analýza chromozómov z periférnych leukocytov bola rutinne prevedená u všetkých pacientov s autizmom s použitím štandardných postupov. Pri pozitívnom náleze u pacienta boli vyšetrené aj karyotypy oboch rodičov, aby sa zistilo, či sa jedná o zdedenú alebo *de novo* aberáciu. Cytogenetické analýzy boli prevedené na Ústave biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol (Drahuše Novotná).

#### 3.2.1.4 Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)

Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) bola prevedená na preparátoch chromozómov pacientov s použitím komerčne dodávaných centromerických, lokus-spezifických a subtelomerických sond (Cytocell, Vysis) podľa pokynov výrobcov. Signály boli hodnotené vo fluorescenčnom mikroskope. Analýzy boli prevedené

na Ústave biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol (Eduard Kočárek, Zdeňka Vlčková).

#### 3.2.1.5 Vyšetrenie génu *FMRI*

Analýza génu *FMRI* bola prevedená u indikovaných autistických pacientov s podozrením na syndróm fragilného chromozómu X. Analýza expanzie trinukleotidovej repetície CGG v géne *FMRI* bola prevedená metódou PCR s kitom Fragile X PCR (Abbott) a následnou fragmentačnou analýzou na sekvenátore ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Veľkosť expanzie spolu s metyláciou génu *FMRI* bola nezávisle potvrdená metódou Southern blot so štiepením DNA enzýmami HindIII a SacII a hybridizáciou so sondou StB12.3 (Rousseau 1992). Vyšetrenia boli prevedené na Ústave biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol (Zuzana Mušová).

#### 3.2.1.6 Metóda MLPA

Metóda MLPA (Schouten, 2002) bola použitá pre zistenie prítomnosti subtelomerických regiónov na aberovaných chromozómoch s použitím kitov P019/P020 alebo pre diagnostiku delécií exónov génu *NFI* s použitím kitov P081/082 (všetky kity MRC-Holland) podľa pokynov výrobcu. MLPA analýzy boli prevedené na Ústave biológie a lekárskej genetiky 2. LF UK a FN Motol (Šárka Bendová, Kamila Procházková, Petra Hedvičáková).

#### 3.2.1.7 Overenie našich výpočtov asociácie - multivariantný model

K multivariantnej analýze bola použitá metóda logistickej regresie s korekciou na pohlavie a vek, ktorá je schopná odhaliť tzv. „confounding“ faktory, čo sú premenné nepriamo asociované s hlavnou testovanou premennou (alela), a ktoré môžu ovplyvniť výsledky. Ďalej bola prevedená POWER analýza, ktorá určila silu našej štúdie zistiť možnú asociáciu. Tieto analýzy boli prevedené štatistickým programom SPSS (Jan Petrášek, Laboratoř experimentální hepatologie, Inštitút klinickej a experimentálnej medicíny, Praha).

### **3.2.2 Array-CGH**

K odhaleniu rozdielov v počte kópií konkrétneho chromozómového úseku bola použitá metóda oligonukleotidovej array-CGH. Ide o variantu klasickej komparatívnej genómovej hybridizácie (CGH), ktorá je založená na hybridizácii testovanej a referenčnej DNA značených dvoma rozdielnymi fluórochrómami na metafázne chromozómy. Technika oligonukleotidovej array-CGH dosahuje o niekoľko rádov vyššieho rozlíšenia použitím oligonukleotidových sond naviazaných na podložnom sklíčku. K analýze bola použitá genómová DNA izolovaná z nezrážanlivej periférnej krvi s použitím komerčnej súpravy PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra) podľa pokynov v manuáli kitu. Kvalita DNA bola overená na spektrofotometre NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), kde bola sledovaná hlavne jej koncentrácia a čistota (pomer absorbancií pri vlnových dĺžkach 260/280 nm by mal byť okolo 1,8). Analýza bola prevedená servisným laboratóriom firmy Nimblegen na katalógových čipoch firmy, konkrétne pre chromozóm 17 to bola array HG18\_WG\_CGH\_7of8 (interval prób približne 713 bp) a pre chromozóm X array HG18\_CHRX\_FT (interval prób približne 340 bp). Výsledky boli dodané elektronicky vo formáte GFF. Tieto súbory boli analyzované pomocou softvéru SignalMap (Nimblegen).

### **3.2.3 Navrhovanie primerov**

Mnoho použitých PCR primerov bolo navrhnutých manuálne s podporou internetového serveru UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Ten umožňuje okrem iného identifikovať SNP alebo rozptýlené repetície, ktoré by mohli interferovať so správnou funkciou primerov, a simulovať *in silico* PCR, a tým overiť dĺžku PCR fragmentu, unikátnosť sekvencie primerov a súlad medzi teplotami nasadania (annealingu) oboch primerov. Primery pre mikrosatelitovú analýzu boli navrhnuté podľa sekvencií priliehajúcich k STR lokusom identifikovaným v UCSC Genome Browseru, alebo podľa Taiwan Polymorphic Marker Database (<http://tpmd.nhri.org.tw/php-bin/graphic.php>). Niekoľko párov primerov pre konkrétne analýzy bolo navrhnutých podľa literatúry (viď ďalej). Primery použité pre všetky analýzy sú uvedené v spoločnej Tabuľke 1.

Tabuľka 1. Prehľad sekvencií oligonukleotidových primerov použitých pri príprave PCR produktov.

Primer F a R	Sekvencia primerov	Primer F a R	Sekvencia primerov
r77800 r1894	ACCCTCAGGAGCGAGCATCGCC CTGTCCGAGGACTCACAACTGG	D17S2197F D17S2197R	CTGCCTTAGTGTTCCTGAGT CACAGGGACGCACATGCTTT
r77801 r1892a	GCAACCCTAGGTCTTAGGCTGC CCAAGGCGTTCCCATGACAACG	D17S663F D17S663R	GGCAACAAGAGCAAAAATTCCG TCATTTCGTGGCCATTATTTAACTC
r77797 r1892a	TCCAAAGCTCTCTGTGGACAGC CCAAGGCGTTCCCATGACAACG	D17S1533F D17S1533R	AGTGGCTCTAGAGTCAGACAGC CTGAGGCTCACCTAGGATGA
r77801a r1895	TTCACCAGGCAACACACAGACC CGTCTCAATAATCCCAAGCAG	VNTRX_7387L VNTRX_7387R	GTCTGACAAATATTGAATGGCTCT ACCAGGTCCCTCTCACAACAC
r17del1 r17del2	GTGTCCCCAAAAACATGGAGCG GTTCCCATGACAACGGCAAAAG	VNTRX_15233L VNTRX_15233R	GGGTGAAGAGAAGCAGGAATTT GTCAAAAAACATAAAAATTGATGATGTC
X6652 X24073	GTCAAAAGTCACATCCCATGGC GGGCACAGCAAACAACTAGCTC	VNTRX_14063L VNTRX_14063R	GTCCGGAGAGTCAAATGTTTTTC TGAAATGACTGTTATAGGCCAAA
X6654 X24071	CACCAGCTGTAGAATTATGGGGG CAGGAGTCTTGGTGATACACAGAC	VNTRX_21686L VNTRX_21686R	CATGTTAGGAGGAAGGGTGAAC TTATAAGCATGAGCCACCACAC
X6653 X24069	CTGTAAACGCTTCTCTTGGGT GACCGACTTCTGTTTTGTCCT	VNTRX_20818L VNTRX_20818R	CTCACAACCTCAAGAACAATGC AGGGCATTACAACCTATGGAAA
D17S695F D17S695R	TAATCTCAGCTGCTCGGGAGGC TTTGTGTTGTTTCATTGACTTCAGTCT	HUMARA F HUMARA R	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC
D17S1308F D17S1308R	TGTGAAACTTGTGCATCACTATACC TTGGTGACAAAGAAAGTCTCC	ADA F ADA R	ACCGAGCCGGCAGAGACCCAC CTTGACAGACAGCGAACTGAGACCCA
D17S831F D17S831R	CGCCTTTCCTCATACTCCAG GCCAGACGGGACTTGAATTA		

### **3.2.4 PCR amplifikácia DNA a long-range PCR**

Pre amplifikáciu vybraných úsekov DNA bola použitá polymerázová reťazová reakcia (PCR). V niektorých pokusoch bola kvôli zvýšeniu špecifickosti použitá metóda nested alebo seminested-PCR, dvojkroková reakcia, pri ktorej sa v prvom kroku amplifikuje dlhší DNA fragment pomocou jednej sady primerov a v druhom kroku sa amplifikuje vnútorný (kratší) DNA fragment pomocou druhej sady primerov (alebo jedného pôvodného a jedného nového primeru), pričom ako templát je použitý produkt z prvej PCR reakcie.

Podmienky všetkých PCR reakcií sú uvedené v Tabuľke 2. Vo väčšine amplifikácií do 1000 bp boli použité komerčné mastermixy PPP (Top-Bio) alebo AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems) podľa pokynov výrobcov. Pre analýzu génu *ADA* sa použila DNA polymeráza TaqI (Fermentas). Pre amplifikáciu fragmentov DNA dlhších ako 1000 bp metódou long-range PCR (LR-PCR) boli použité kity Expand Long Template PCR System (Roche) alebo LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio), opäť podľa pokynov výrobcov. PCR reakcie prebiehali v termocyklerocho iCycler (Biorad) alebo T-Gradient (Biometra).



Tabuľka 2. Podmienky PCR reakcií použitých v ďalších analýzach.

Reakcia: použité primery (kit)	Objem: zloženie reakčnej zmesi	Podmienky (°C, min/s)
r17 zlom: r77800+r1894 (LR-PCR)	50 µl :H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 3 + 500 µM dNTPs + 3,75 U pol + 20-100 ng DNA	93°C/2min, 10 cyklov (93°C/10s,65°C/30s,68°C/5min), (93°C/15s,65°C/30s,68°C/5min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
r17 zlom: r77801+r1892a (LR-PCR)	50 µl :H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 3 + 500 µM dNTPs + 3,75 U pol + 20-100 ng DNA	93°C/2min, 10 cyklov (93°C/10s,65°C/30s,68°C/5min), (93°C/15s,65°C/30s,68°C/5min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
r17 PCR/RFLP: r77797+r1892a (LR-PCR)	25 µl :H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 1+ 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2 U pol + 20-100 ng DNA	94°C/2min, 10 cyklov (94°C/10s,59°C/30s,68°C/3,5min), (94°C/15s,59°C/30s,68°C/3,5min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
r17 PCR/RFLP: r7780a+r1895 (LR-PCR)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 1+ 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2U pol + 20-100 ng DNA	94°C/2min, 10 cyklov (94°C/10s,60,1°C/30s,68°C/3min), (94°C/15s,60,1°C/30s,68°C/3min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
r17 del1kb: r17del1 +r17del2 (LA-Top-Bio)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x LA pufor + 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2,5 U pol + 20-100ng DNA	94°C/2min, 30 cyklov (94°C/30s,62°C/30s,68°C/1,5min), 68°C/7min
r17 STR: D17S695, 1308 (PPP)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 1x PPP + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1,25% TMSO + 20-100 ng DNA	95°C/2min, 30 cyklov (95°C/30s,66°C/30s,72°C/50s), 72°C/7min
r17 STR: D17S 831, 2197,663, 1533 (PPP)	20 µl: H <sub>2</sub> O + 1x PPP + 12 pmol primer F + 12 pmol primer R + 20-100 ng DNA	95°C/2min, 30 cyklov, (95°C/30s,62°C/30s,72°C/50s), 72°C/7min
del X zlom: X6652+24073 (LR-PCR)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 3 + 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2U pol + 20-100 ng DNA	94°C/2min, 10 cyklov (94°C/10s,62°C/30s,68°C/3min), (94°C/15s,62°C/30s,68°C/3min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
del X nested: X6652+24071 a X6654+24071 (LR-PCR)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 3 + 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2U pol + 0,3 µl predchádzajúceho produktu	94°C/2min, 10 cyklov (94°C/10s,62°C/30s,68°C/3min), (94°C/15s,62°C/30s,68°C/3min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
del X nested: X6653+ X24069 (LR-PCR)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 1x pufor 2 + 250 µM dNTPs + 4% DMSO + 2U pol + 20-100 ng DNA	94°C/2min, 10 cyklov (94°C/10s,62°C/30s,68°C/2min), (94°C/15s,62°C/30s,68°C/2min+20s) 20 cyklov, 68°C/7min
del X STR: VNTRX 7387, 15233 (GOLD)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 1x GOLD + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 10-50 ng DNA	95°C/5min, 35 cyklov (93+1min+60°C/45s+75°C/1min), 75°C/7min
del X STR: VNTRX 14063, 21686, 20818 (GOLD)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 1x GOLD + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 10-50 ng DNA	95°C/5min, 35 cyklov (93+1min+60°C/1min+75°C/1min), 75°C/7min
ADA PCR/RFLP: ADA F/R (TaqI pol)	25 µl: H <sub>2</sub> O + 1x StB pufor + 15 pmol primer F + 15 pmol primer R + 4,4% TMSO + 250 µM dNTPs + 0,75 U Taq + 20-100 ng DNA	94°C/3min, 35 cyklov (93°C/1min,66,5°C/1min,72°C/1min), 72°C/5min

10xStB pufor: 100mM Tris.Cl [pH= 9,0]; 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% w/v želatína, 1%Triton X 100

### 3.2.5 Gélová elektroforéza fragmentov DNA

K separácii fragmentov DNA bola použitá horizontálna elektroforéza Biorad (45-120 min., 120 V, 400 mA) a 1% agarózový gél v 1x pufru TBE (45 mM Tris Borát, 1 mM EDTA [pH=8]) s prídavkom etídiu bromidu. Na odčítanie veľkosti PCR fragmentov bol použitý DNA marker molekulových hmotností 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) alebo 1kb DNA Ladder (Sigma). K vizualizácii a fotografickému dokumentovaniu PCR fragmentov bol použitý prístroj DNR's MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

### 3.2.6 RFLP analýza

Niektoré SNP sú súčasťou rozpoznávacieho miesta pre určitú reštrikčnú endonukleázu a ich alely je možné s pomocou tohto enzýmu detegovať ako RFLP. K detekcii SNP v géne *ADA* (G22A) a k vylúčeniu ďalších zmien DNA v okolí zlomov chromozómovej prestavby bola použitá metóda PCR/RFLP (Tabuľka 3). Analýza bola prevedená klasickou PCR, pomocou ktorej bola najprv amplifikovaná cieľová sekvencia (viď Tabuľky 1 a 2). Tá bola potom štiepená v reštrikčnej zmesi, ktorá obsahovala 3-8  $\mu$ l PCR produktu, 1x príslušný pufo, 5-10 U enzýmu a vodu vo finálnom objeme 10  $\mu$ l. Výsledné fragmenty boli analyzované elektroforézou.

Tabuľka 3. Prehľad podmienok pre jednotlivé reštrikčné reakcie.

Analýza	Enzým (výrobca)	Rozoznávaná sekvencia	Čas (hod)	T (°C)	Pufo + aditíva
G22A / r17	TaqI (Invitrogen)	5'-T↓CGA-3'	2/16	65	REact® 2
r17	RsaI (LifeScience)	5'-GT↓AC-3'	16	37	pufo T + BSA
r17	XhoI (LifeScience)	5'-C↓TCGAG-3'	16	37	pufo SH

T - teplota, BSA - bovine serum albumin

### **3.2.7 Sekvenovanie DNA a analýza sekvencií**

PCR produkty určené pre metódu sekvenovania boli purifikované s použitím kitu QIAamp PCR Purification Kit (Qiagen) podľa pokynov v manuáli kitu alebo systémom ExoSAP (Fermentas). V tomto prípade purifikačná reakcia prebiehala v objeme 10 µl v zložení 7,3 µl produktu PCR, 2,5 U enzýmu SAP (shrimp alkaline phosphatase) a 5 U enzýmu Exonukleáza I za podmienok: 37°C/60 min a 80°C/20 min. Sekvenovanie potom prebiehalo v objeme 7 µl v reakcii zloženej z: 10-200 ng templátovej DNA v závislosti na dĺžke analyzovaného PCR fragmentu, 2,5 pmol primeru a 2 µl sekvenačného kitu ABI PRISM Big Dye Terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sekvenačná reakcia prebiehala v termocyklere iCycler (Biorad) za nasledujúcich podmienok: počiatočná denaturácia 96°C/1 min a potom 25 cyklov (96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min). Produkt sa najskôr vyzrážal pomocou roztoku 96% etanolu a octanu sodného (3M, pH=5,2), potom sa peleta DNA prečistila vyzrážaním 70% etanolom a po centrifugácii a úplnom vysušení sa k pelete pridalo 25 µl deionizovaného formamidu Hi-Di (Applied Biosystems). Po úplnom rozpustení peliet sa vzorky analyzovali kapilárnym sekvenátorom ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) vybaveným 36 cm štvorkapilárkou. Vzorky boli injektované do polyméru POP6 pri 1 kV po dobu 6-12 s a elektroforéza prebiehala pri teplote 55°C a 15 kV po dobu 1000-2700 s podľa veľkosti produktov. Pri hľadaní chromozomálnych zlomov bola niekedy použitá aj metóda primer walking, kde až na základe získanej sekvencie sa navrhne ďalší primer čo najďalej od pôvodného primeru. Tento nový primer slúži v nasledujúcej sekvenačnej reakcii k získaniu ďalšieho úseku sekvencie DNA, čo umožní získať sekvencie aj veľmi dlhých fragmentov.

Vyhodnotenie sekvenačných elektroforetogramov bolo prevedené v programoch Sequence Analysis (Applied Biosystems) alebo Trev a Gap4 (Staden Package, <https://sourceforge.net/projects/staden>). Program Gap4 umožňoval tiež porovnanie získaných sekvencií so štandardnými sekvenciami vyhladanými v UCSC Genome Browser a skladanie jednotlivých prekrývajúcich sa sekvencií do kontigov.

### **3.2.8 Bioinformatická analýza zlomov a deletovaných úsekov**

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) slúžil ako zdroj štandardných sekvencií ľudského genómu. Tieto boli porovnané (tzv. multiple alignment) so sekvenciami zlomov u pacientov s pomocou programu Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Nízko-frekvenčné repetície a homológie s inými sekvenciami v genóme boli hľadané pomocou programu BLAT (Kent 2002) (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Repetitívne elementy boli hľadané programom RepeatMasker obsiahnutom v UCSC Genome Browseru. Krátke sekvenčné motívy boli hľadané pomocou programov DNAPattern Find a FuzzySearchDNA (Stothard 2000) (<http://bioinformatics.org/sms2/index.html>).

Polymorfne DNA markery boli hľadané s pomocou UCSC Genome Browseru alebo vybrané z Taiwan Polymorphic Marker Database ([http://tpmd.nhri.org.tw/php-bin/index\\_en.php](http://tpmd.nhri.org.tw/php-bin/index_en.php)). Zoznamy génov obsiahnutých v deléciách boli zostavené pomocou UCSC Genome Browseru a databázy OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Posledná databáza bola tiež použitá pre stanovenie dedičných chorôb mapovaných do delécií. Potvrdené alebo suspektné imprintované gény boli hľadané v niekoľkých databázach vrátane The Geneimprint Database (<http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens>), The Imprinted Gene Catalogue (<http://igc.otago.ac.nz/home.html>), The Mouse Imprinting Data and References (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprin-viewmaps.html>), The CITE Database (<http://fantom2.gsc.riken.go.jp/imprinting>) a online prístupnej prílohe článku popisujúceho predikciu myších imprintovaných génov (Luedi 2005) ([http://www.geneimprint.com/media/pdfs/15930497\\_supplement.pdf](http://www.geneimprint.com/media/pdfs/15930497_supplement.pdf)).

### 3.2.9 Analýza rodičovského pôvodu aberovaného chromozómu

Na túto analýzu boli použité viaceré mikrosatelitové markery lokalizované v deletovanej časti chromozómu. Mikrosatelitové markery boli zvolené preto, že sú charakterizované väčšou variabilitou ako SNP, teda pravdepodobnosť, že sa chromozómy navzájom líšia, je vyššia. Markery boli analyzované sekvenovaním, ktoré je u jednorázovo používaných markerov ekonomicky výhodnejšie ako fragmentačná analýza, lebo odpadá potreba fluorescenčného značenia primerov. Metóda bola robená klasickou PCR s použitím DNA pacientky a oboch rodičov (primery a podmienky vid' Tabuľky 1 a 2). Vyhodnotenie dát prebiehalo odčítaním počtu repetitívnych jednotiek na nedeletovanej alele pacientky a následným porovnaním s počtom jednotiek na oboch alelách rodičov (Tabuľka 4). V prípade, že sa počet opakovaní u pacientky nesúcej len jednu alelu daného lokusu zhodoval s počtom opakovaní len u jedného rodiča, bol tento marker informatívny. Ak sa zistený počet repetícií u pacientky našiel zároveň aj u matky, aj u otca, bol takýto marker neinformatívny.

Tabuľka 4. Prehľad markerov použitých pre analýzu rodičovského pôvodu u pacientky 1 a 2.

PCR reakcia / názov mikrosatelitu	Repetitívny motív	Chromozóm	Lokalizácia na chromozóme – vzdialenosť od teloméru
D17S2197	CA	17p	192 kb
D17S1308	GTAT	17p	570 kb
D17S663	CTTT+CTCTCTTT	17p	692 kb
D17S695	GAAA	17p	693 kb
D17S1533	CTAT	17p	1 487 kb
D17S831	CA	17p	1 857 kb
VNTRX_7387 (DXS9895)	GATA	Xp	7 387 kb
VNTRX_14063	TAGA	Xp	14 213 kb
VNTRX_15233 (DXS9902)	GATA	Xp	15 233 kb
VNTRX_20818	TTG	Xp	20 968 kb
VNTRX_21686	TAGA	Xp	21 836 kb

### 3.2.10 Analýza miery inaktívácie chromozómov X

Okrem analýzy génu *FMRI* bola X-inaktívacia zisťovaná aj testovaním miery metylácie v lokuse pre ľudský androgénový receptor (*AR*, OMIM #313700), ktorý sa nachádza na Xq12 (Allen 1992). V prvom exóne tohto génu sú prítomné dve reštrikčné miesta pre metyl-senzitívnu endonukleázu HpaII (5'-C↓CGG-3'), v blízkosti ktorých je vysoko polymorfná trinukleotidová repetícia (20 aliel, 90% heterozygotita). Pred PCR sa analyzovaná DNA najskôr enzymaticky štiepi. Amplifikácia DNA prebieha iba ak obidve štiepne miesta pre HpaII sú metylované, čiže k štiepeniu nedôjde. V prípade, že je len jedno z týchto miest nemetylované, DNA je štiepená a v PCR nevznikne žiadny fragment. PCR produkt zahrňujúci štiepne miesta aj variabilnú repetíciu sa analyzuje fragmentačnou analýzou. Metylácia štiepných miest koreluje s celkovou X-inaktíváciou a PCR produkt sa amplifikuje iba z neaktívneho metylovaného chromozómu X. Polymorfná repetícia dovoľuje odlíšiť maternálny a paternálny chromozóm X porovnaním dĺžky fragmentov s rodičovskými alelami.

Každá vzorka DNA bola pripravovaná v dvoch zmesiach - s reštrikčným enzýmom a bez enzýmu. Reakcia bola robená v objeme 20 µl za prítomnosti 400 ng DNA, 1x pufru NEB1, 5 U RsaI a 5 U HpaII (oba NEB). Zmes bola inkubovaná cez noc pri 37°C a inaktivovaná 10 min. pri 95°C. Z oboch reakcií boli použité 4 µl pre prípravu PCR reakcie do konečného objemu 10 µl spolu s 1x pufrom PC2 (50 mM Tris-HCl [pH=9,1]; 16 mM amónium sulfát; 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> a 150 mg/ml BSA); 200µM dNTPs; 3,3 pmol primerov HUMARA F a R; 0,04 U Deep Vent DNA Polymeráza (NEB) a 0,9 U KlenTaq1 DNA polymeráza (Ab Peptides). Primery boli navrhnuté podľa Tilley (1989), pričom primer F bol na 5' konci fluorescenčne značený Cy-5. PCR prebiehala za nasledujúcich podmienok: počiatočná denaturácia 95°C/5 min, potom 25 cyklov (95°C/45 s, 64°C/20 s, 72°C/50 s) a nakoniec finálna extenzia 72°C/5 min. PCR produkty boli denaturované po zmiešaní 1:1 s roztokom bromfenolovej modrej s formamidom Hi-Di po dobu 5 min pri 98°C, potom 5 min na ľade. Denaturované fragmenty boli následne separované v denaturačnom polyakrylamidovom géle (7,5% Hydrolink Long Ranger Gel (Serva) s 6 M močovinou v 1,5x TBE s 10% peroxidisíranu amónného a TEMEDu (Serva)) v 0,5x TBE. Elektroforéza prebiehala na planárnom sekvenátore AlfExpress (Pharmacia) pri 40°C a 1200 V. Výsledky boli analyzované programom DNA Fragment Manager (Pharmacia).

### 3.2.11 Štatistické hodnotenie asociačnej štúdie

#### 3.2.11.1 Sledovanie HWE v kontrolnej skupine

V kontrolnej skupine bola sledovaná Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE) ako test nezávislej distribúcie aliel v populácii a test správneho genotypovania. Na výpočet HWE bol použitý Chi kvadrát ( $\chi^2$ ) test. Pre všetky genotypy zložené z aliel *ADA\*1* a *ADA\*2* boli spočítané čiastkové hodnoty  $\chi^2$  a pre ich súčet zistená hodnota P v MS Excel zadáním „=CHIDIST(a;b)“, kde „a“ je hodnota  $\chi^2$  a „b“ je počet stupňov voľnosti (zadané „1“). Pre  $\chi^2$  test Hardy-Weinbergovej rovnováhy bola hypotéza taká, že frekvencia pozorovaných genotypov sa nebude líšiť od očakávaných. Hodnota P, pri ktorej je hypotéza prijatá, je  $P > 0,05$ . Ak sa zistí, že HWE neplatí ( $P < 0,05$ ), je dôležité analyzovať, ktorá z predpokladaných podmienok nie je splnená (napr. malý súbor, chyba výberu, technická chyba v genotypovaní, prítomnosť delečnej alely atď.).

#### 3.2.11.2 Vlastné výpočty asociácie - univariantný model

Na určenie asociácie bol použitý univariantný alelický model (tzv. dominantný), kde rizikový faktor je nosičstvo alely *ADA\*2* a pre výpočet je dôležitý pomer voči alele *ADA\*1* v oboch vyšetrovaných skupinách. Prepočet asociácie genotypovým modelom (tzv. recesívnym) nebol nutný z dôvodu veľmi nízkeho zastúpenia homozygotných jedincov pre rizikovú alelu *ADA\*2* ako v súbore pacientov, tak kontrol.

K zisteniu, či sú rozdiely v nameraných frekvenciách štatisticky signifikantné, je potreba poznať hodnotu  $\chi^2$  a hodnotu významnosti P. V prípade, že sa potvrdí signifikantná asociácia alely s ochorením ( $P < 0,05$ ), je dôležitá hodnota podielu rizika (odds ratio, O.R.), ktorá vyjadruje silu asociácie medzi rizikovou alelou a ochorením, a hodnotu 95% intervalu spoľahlivosti (confidence interval, 95% C.I.) pre danú O.R. Všetky tieto hodnoty boli získané Chi kvadrát testom. Z dôvodu, že pracujeme s frekvenciami menšími ako 5%, bol použitý aj Fisherov exaktný test vhodný aj pre veľmi nízke frekvencie, ktorý druhou nezávislou hodnotou P spresnil a potvrdil signifikantnosť výsledku, ktorá v testoch  $\chi^2$  nemusí byť u malých vzoriek dostatočná. Pri výpočte Chi kvadrát testu aj Fisherovho exaktného testu bol použitý voľne prístupný program SISA (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fisher.htm>).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Asociačná štúdiá s variantami v géne *ADA*

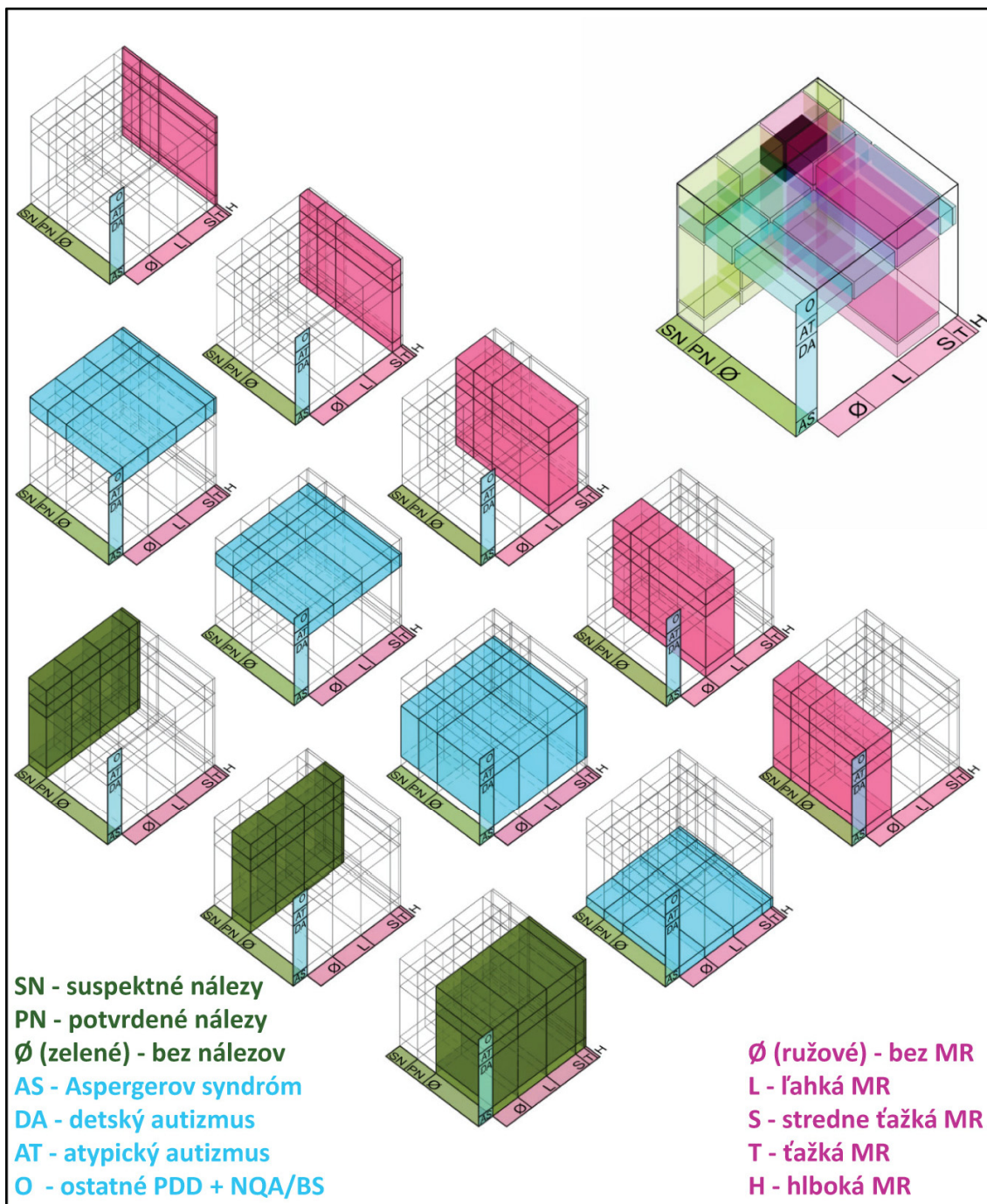
#### 4.1.1 Podtypy autizmu, úroveň MR a komorbidity v súbore pacientov

Bola vytvorená elektronická databáza všetkých pacientov, ktorí splňovali diagnostické kritéria autizmu podľa MKCH-10, ako aj pacientov so zjavnými autistickými črtami (kategória Not Quite Autism/Broad Spectrum (NQA/BS) (Geschwind 2001). Databáza v súčasnosti obsahuje 400 českých pacientov. Súbor našich pacientov zahŕňa všetky základné typy autizmu a niektoré ďalšie poruchy autistického spektra. Fenotyp postihnutých detí a ich zaradenie do podskupín podľa typu autizmu, stupňa mentálnej retardácie a výskytu komorbidít ukazuje, že škála klinických prejavov a ich možných kombinácií je veľmi široká (Obr. 6).

Ďalšie zistenia :

- pomer mužov a žien v našom súbore je 3,9 : 1 (319:81), podobne ako sa udáva v literatúre
- u 58% pacientov bol diagnostikovaný detský autizmus, u 14% atypický autizmus, u 10,5% Aspergerov syndróm a 17,5% pacientov patrí do skupiny ostatné PDD a NQA/BS
- mentálna retardácia je u pacientov zastúpená takto: 29% ľahká, 30% stredne ťažká, 8,5% ťažká a 1,5% hlboká; bez MR (normálne alebo nadpriemerné IQ) je 26% pacientov a u 5% nebolo možné stanoviť úroveň MR
- autizmus je u 80% pacientov možné označiť ako idiopatický, u zvyšných 20% sa najčastejšie nachádzajú rôzne komorbidity ako monogénne choroby a známe syndrómy (vrátane 4% FXS) či chromozomálne odchýlky (6%); u 19% pacientov existujú rôzne suspektné nálezy (napr. stigmatizácia), ale títo sú zatiaľ zahrnutí do 80% skupiny bez potvrdených nálezov

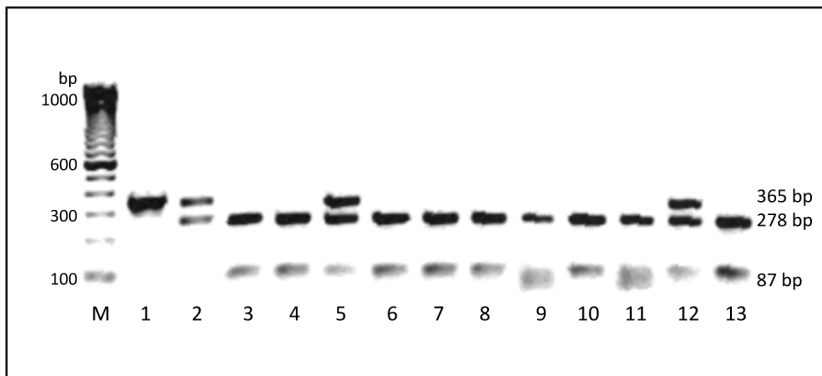




Obrázok 6. Rozloženie nášho súboru 400 pacientov podľa typu autizmu (modrá rovina), stupňa mentálnej retardácie (ružová rovina) a prípadných asociovaných nálezov (zelená rovina). Čierny kváder znázorňujúci prienik všetkých troch rovín vyjadruje jednu z mnohých možných podskupín pacientov, ktoré vzniknú kombináciou týchto nezávislých atribútov autizmu (podtyp autizmu, mentálna retardácia)

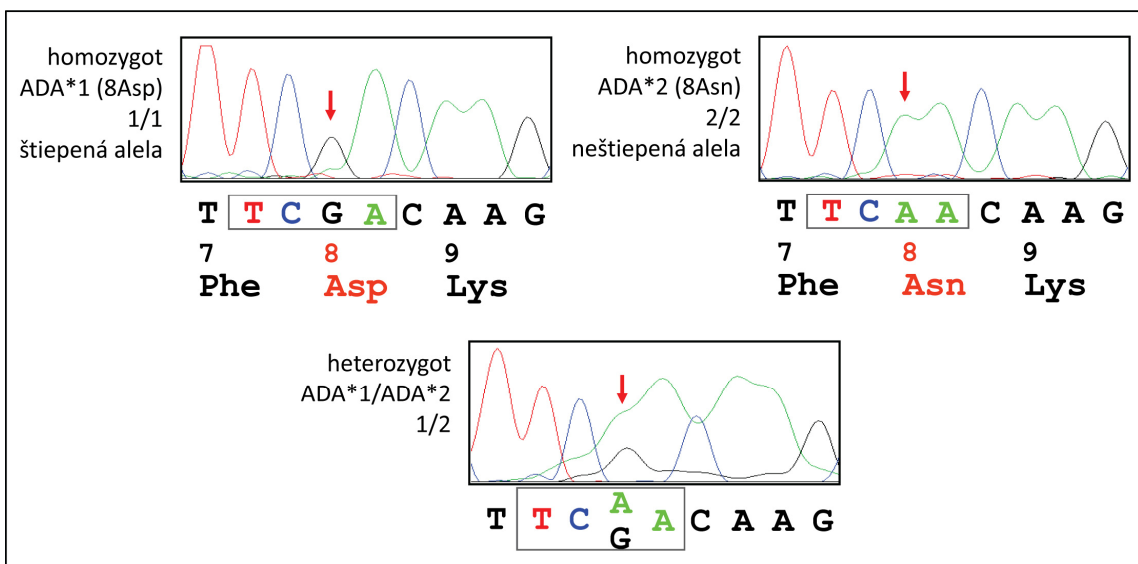
#### 4.1.2 Molekulárna analýza genotypov ADA

Bola zavedená analýza variant *ADA\*1/ADA\*2* metódou PCR/RFLP. PCR produkt dlhý 365 bp bol štiepený reštrikčnou endonukleázou TaqI rozoznávajúcou motív T↓CGA. Alela *ADA\*1* má na 1. pozícii 8. kodóna G, sekvencia TCGA je zachovaná a produkt je štiepený Taq I na dva fragmenty o dĺžke 278 a 87 bp. Alela *ADA\*2* má v danom mieste A, sekvencia TCAA nie je rozpoznaná TaqI a fragment ostane dlhý 365 bp. Heterozygotní jedinci *ADA\*1/ADA\*2* vykážu po štiepení fragmenty o dĺžke 87, 278 a 365 bp (Obr. 7) (Hirschhorn 1994). Metódu genotypovania pomocou reštrikčného štiepenia sme overili sekvenovaním (Obr. 8) a potom previedli u všetkých 385 pacientov a u 130 zdravých kontrol bližšie charakterizovaných v Tabuľke 5.



Obrázok 7. Štiepenie PCR produktu z génu ADA enzýmom TaqI.

M – marker, dráha č. 1 neštiepený PCR produkt, č.2 heterozygotná kontrola 1/2, č. 3-13 homozygotní pacienti 1/1, okrem dráh č.5 a 12, kde sú heterozygotní pacienti 1/2.



Obrázok 8. Sekvencia troch možných genotypov pre alely *ADA\*1* a *ADA\*2* s vyznačením štiepneho miesta a zmeny v 8. aminokyseline (asparagín za kys. asparagóvú).

Tabuľka 5. Prehľad zloženia jednotlivých podskupín pacientov a zdravých kontrol analyzovaných v asociačnej štúdii.

Skupina	Počet	Pomer Ž:M	Vekový priemer	Rozsah veku
<b>A - všetci autisti</b>	N=385	1 : 4,4	7,7	1,5 - 26
<b>I - idiopatickí autisti</b>	N=272	1 : 5,5	7,7	2,5 - 26
<b>DA - detský autizmus</b>	N=225	1 : 4,8	7,3	1,5 - 26
<b>AT - atypický autizmus</b>	N=55	1 : 2,2	7,1	3 - 20
<b>AS - Aspergerov syndróm</b>	N=41	1 : 4,9	9,3	4 - 19
<b>O - ostatné PDD+NQA/BS</b>	N=64	1 : 3,3	8,2	3 - 18
<b>K – zdravé kontroly</b>	N=130	1 : 4	8,1	2 - 17

Vek v rokoch.

#### **4.1.3 Výsledky molekulárnej analýzy v súbore pacientov a u kontrol**

V Tabuľkách 6a-6d sú zhrnuté výsledné počty jednotlivých genotypov a aliel v rôznych skupinách pacientov. Tabuľka 6a obsahuje aj výsledky v kontrolnej skupine zdravých jedincov. Súbor pacientov je rozčlenený do skupín podľa porovnáwanej premennej autizmu, čo je buď splnenie kritérií diagnózy, alebo prítomnosť endofenotypov (podtyp autizmu, stupeň mentálnej retardácie, prítomnosť komorbidít). U všetkých pacientov (N=385) skúmame asociáciu alely *ADA\*2* s ochorením v celom súbore a potom v skupinách podľa prítomnosti komorbidít. V skupine idiopatických autistov (pacienti bez NQA/BS a potvrdených nálezov, N=272) zisťujeme asociáciu alely *ADA\*2* s ochorením a potom v skupinách podľa podtypov autizmu a podľa stupňa mentálnej retardácie.

Tabuľka 6a. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v súbore všetkých pacientov, v skupine pacientov s idiopatickým autizmom a v skupine zdravých kontrol.

Skupiny pacientov a zdravé kontroly	Počet genotypov (%)			Počet aliel (%)	
	1/1	1/2	2/2	1	2
<b>všetci autisti (N=385)</b>	347 (90,1)	36 (9,4)	2 (0,5)	730 (94,8)	40 (5,2)
<b>idiopatickí autisti (N=272)</b>	242 (88,9)	29 (10,7)	1 (0,4)	513 (94,3)	31 (5,7)
<b>zdravé kontroly (N=130)</b>	111 (85,4)	18 (13,8)	1 (0,8)	240 (92,3)	20 (7,7)

1 - alela *ADA\*1*, 2- alela *ADA\*2*

Tabuľka 6b. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v skupinách idiopatických autistov rozdelených podľa podtypu autizmu.

Skupiny idiopatických autistov podľa podtypu autizmu (N=272)	Počet genotypov (%)			Počet aliel (%)	
	1/1	1/2	2/2	1	2
<b>DA (N=183)</b>	164 (89,6)	18 (9,8)	1 (0,6)	346 (94,5)	20 (5,5)
<b>AT (N=43)</b>	35 (85,5)	8 (14,5)	0	78 (90,7)	8 (9,3)
<b>AS (N=38)</b>	35 (92,7)	3 (7,3)	0	73 (96,0)	3 (4,0)
<b>O (N=8)</b>	8 (100)	0	0	16 (100)	0

1 - alela *ADA\*1*, 2- alela *ADA\*2*

Tabuľka 6c. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v skupinách idiopatických autistov rozdelených podľa závažnosti mentálnej retardácie.

Skupiny idiopatických autistov podľa MR (N=255)	Počet genotypov (%)			Počet aliel (%)	
	1/1	1/2	2/2	1	2
<b>bez MR (N=78)</b>	71 (91,0)	7 (9,0)	0	149 (95,5)	7 (4,6)
<b>ľahká (N=69)</b>	58 (84,1)	10 (14,5)	1 (1,4)	126 (91,3)	12 (8,7)
<b>stredne ťažká (N=83)</b>	75 (90,4)	8 (9,6)	0	158 (95,2)	8 (4,8)
<b>ťažká a hlboká (N=25)</b>	22 (88,0)	3 (12,0)	0	47 (94,0)	3 (6,0)

N=255 lebo u niektorých pacientov údaj o MR chýbal, 1 - alela *ADA\*1*, 2- alela *ADA\*2*

Tabuľka 6d. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v súbore všetkých pacientov rozdelených podľa prítomnosti alebo neprítomnosti nálezov.

Skupiny pacientov podľa nájdených komorbíd (N=385)	Počet genotypov (%)			Počet aliel (%)	
	1/1	1/2	2/2	1	2
<b>bez nálezov (N=234)</b>	210 (89,7)	23 (9,8)	1 (0,4)	443 (94,6)	25 (5,4)
<b>suspektné nálezy (N=76)</b>	66 (86,8)	10 (13,2)	0	142 (93,4)	10 (6,6)
<b>potvrdené nálezy (N=75)</b>	71 (94,7)	3 (4,0)	1 (1,3)	145 (96,7)	5 (3,3)

1 - alela *ADA\*1*, 2- alela *ADA\*2*

#### 4.1.4 Štatistická analýza asociačných štúdií

##### 4.1.4.1 Sledovanie Hardy-Weinbergovej rovnováhy v kontrolnej skupine

Pred vlastným výpočtom asociácie sme zisťovali, či sú genotypy v kontrolnej skupine v Hardy-Weinbergovej rovnováhe. V Tabuľke 10 sú zhrnuté získané výsledky. Z uvedených hodnôt vyplýva, že frekvencie aliel *ADA\*1* a *ADA\*2* a zastúpenie genotypov spĺňa podmienky pre HWE (HWE platí pre  $P > 0,05$ ).

Tabuľka 10.  $\chi^2$  test pre zistenie Hardy-Weinbergovej rovnováhy v kontrolnej skupine.

Zdravé kontroly	Počet genotypov			Suma $\chi^2$	P, stupeň voľnosti 1
	1/1	1/2	2/2		
namerané hodnoty	111	18	1	0,08125	0,77561
očakávané hodnoty	110,77	18,48	0,77		

##### 4.1.4.2 Kontingenčné tabuľky pre jednotlivé porovnávané skupiny

Pre ďalšie výpočty sme najskôr zostavili kontingenčné tabuľky vyjadrujúce pozorovaný počet aliel *ADA\*1* a *ADA\*2* v porovnávaných skupinách pacientov a u kontrol. Kontingenčné tabuľky boli zostavené podľa nasledujúceho príkladu:

Skupina	Alela		Spolu
	1	2	
všetci autisti	730	40	770
kontroly	240	20	260
Spolu	970	60	1030

##### 4.1.4.3 Výpočet štatistických hodnôt potrebných pre určenie asociácie.

Do programu SISA boli postupne zadané hodnoty zo všetkých kontingenčných tabuliek. Získané hodnoty  $\chi^2$ , hodnotu p(P) z Chi kvadrát testu, hodnoty 95% konfidenčného intervalu (95%C.I.) pre O.R a hodnoty P z Fisherovho exaktného testu sú uvedené v Tabuľkách 11a-11d. V oboch použitých testoch sú za štatisticky významné považované výsledky, keď platí, že  $P < 0,05$  a 95%C.I. nepresiahne 1

v prípade, že  $O.R.<1$ , alebo keď 95%*C.I.* presiahne 1 v prípade že  $O.R.>1$ . Čím je interval spoľahlivosti výsledkov 95%*C.I.* užší, tým spoľahlivejšie výsledky sú. Ak sa zistí signifikantná asociácia, je dôležitá hodnota *O.R.*  $O.R.=1$  indikuje absenciu rozdielu medzi porovnávanými skupinami, čiže prítomnosť danej alely neprispieva k ochoreniu. Koľkokrát je vyššia hodnota v prípade  $O.R.>1$ , toľkokrát je vyššie riziko nosičstva danej alely pre ochorenie. Ak je  $O.R.<1$ , daná alela má protektívny účinok, čiže znižuje riziko ochorenia.

Tabuľka 11a. Výsledky testov asociácie v súbore všetkých autistov a skupine idiopatických autistov.

Pacienti verzus zdravé kontroly	Odds- Ratio	Konfidenčný interval	Chi kvadrát test		Fisherov test
	<b>O.R.</b>	<b>95%C.I.</b>	$\chi^2$	<b>p(P)</b>	<b>P</b>
všetci autisti (N=385)	0,657	0,377< <i>O.R.</i> <1,146	2,21	0,1371	0,1668
idiopatickí autisti (N=272)	0,725	0,404< <i>O.R.</i> <1,298	1,17	0,277	0,2820

Tabuľka 11b. Výsledky testov asociácie podľa podtypov autizmu v skupine idiopatických autistov.

Podtyp autizmu (idiopatickí autisti) verzus zdravé kontroly	Odds- Ratio	Konfidenčný interval	Chi kvadrát test		Fisherov test
	<b>O.R.</b>	<b>95%C.I.</b>	$\chi^2$	<b>p(P)</b>	<b>P</b>
DA (N=183)	0,693	0,365< <i>O.R.</i> <1,317	1,26	0,2613	0,3198
AT (N=43)	1,230	0,521< <i>O.R.</i> <2,905	0,22	0,6350	0,6503
AS (N=38)	0,4931	0,142< <i>O.R.</i> <1,706	1,29	0,2554	0,3123
O (N=8)	nepoužiteľné hodnoty frekvencií pre výpočet				

Tabuľka 11c. Výsledky testov asociácie podľa stupňa MR v skupine idiopatických autistov.

MR (idiopatickí autisti) verzus zdravé kontroly	Odds- Ratio	Konfidenčný interval	Chi kvadrát test		Fisherov test
	<b>O.R.</b>	<b>95%C.I.</b>	$\chi^2$	<b>p(P)</b>	<b>P</b>
bez MR (N=78)	0,5637	0,232< <i>O.R.</i> <1,365	1,65	0,1989	0,2237
ľahká (N=69)	1,142	0,541< <i>O.R.</i> <2,413	0,12	0,7260	0,7035
stredne ťažká (N=83)	0,607	0,261< <i>O.R.</i> <1,413	1,36	0,2432	0,3169
ťažká a hlboká (N=25)	0,7659	0,218< <i>O.R.</i> <2,681	0,17	0,6758	1,000

Tabuľka 11d. Výsledky testov asociácie podľa nálezov v súbore všetkých pacientov

Komorbidity verzus zdravé kontroly	Odds- Ratio	Konfidenčný interval	Chi kvadrát test		Fisherov test
	O.R.	95%C.I.	$\chi^2$	p(P)	P
bez nálezov (N=234)	0,677	0,368<O.R.<1,244	1,59	0,2070	0,2604
suspektné nálezy (N=76)	0,845	0,384<O.R.<1,856	0,17	0,6747	0,8445
potvrdené nálezy (N=75)	0,413	0,152<O.R.<1,126	3,15	0,0756	0,0880

#### **4.1.5 Vyhodnotenie asociácie alely ADA\*2 s jednotlivými premennými**

Z Tabuliek 11a-11d jasne vyplýva, že ani v jednom prípade nie je  $p(P) < 0,05$  alebo  $P < 0,05$ . Vo všetkých porovnávaných kombináciách skupín pacientov s kontrolnou skupinou zdravých jedincov sa zistilo  $p(P) > 0,05$  aj  $P > 0,05$ ; čiže asociáciu alely ADA\*2 s autizmom alebo niektorým endofenotypom autizmu sme nepotvrdili.

#### **4.1.6 Vyhodnotenie asociácie alely ADA\*2 v multivariantom teste**

V Tabuľke 12 sú zhrnuté výstupy testu „Multivariantná logistická regresia s korekciou na vek a pohlavie“ prevedeného externe pre kontrolu nami prevedenej analýzy. Rovnako ako v našich univariantných testoch, tak ani v multivariantnom teste sa nepreukázala asociácia alely ADA\*2 s autizmom, a to ani po zohľadnení veku a pohlavia. Z multivariantnej analýzy jednoznačne vyplynulo, že vek ani pohlavie nepredstavujú „confounding factors“ pre našu štúdiu. Pre multivariantnú analýzu bolo potrebné najskôr porovnať zastúpenie veku a oboch pohlaví medzi jednotlivými skupinami. Chi kvadrát test ukázal, že distribúcia genotypov a aliel sa medzi mužmi a ženami nelíšila. Pri porovnaní veku autistov medzi jednotlivými podtypmi autizmu sa ukázal jeden potenciálne zaujímavý záver: pacienti s Aspergerovým syndrómom sú signifikantne starší (čo pravdepodobne znamená neskôr diagnostikovaní) ako pacienti s detským autizmom alebo s atypickým autizmom. Pre našu potrebu je však dôležité, že žiadna zo skupín sa signifikantne nelíši od zdravých kontrol.

Tabuľka 12. Výsledky multivariantného testovania asociácie s autizmom.

Testovaná závislosť	N	P	Test
rozdielnosť zastúpenia pohlavia v jednotlivých podtypoch autizmu	385	0,194	Chi
rozdielnosť distribúcie genotypov medzi mužmi a ženami	385	0,104	Chi
rozdielnosť veku v jednotlivých skupinách	385	všetky P>0,05	ANOVA
test, či <u>genotypy</u> spolu s vekom a pohlavím determinujú autizmus	385	všetky P>0,05	LR
test, či <u>genotypy</u> spolu s vekom a pohlavím determinujú idiopatický autizmus	272	všetky P>0,05	LR
test, či <u>alely</u> spolu s vekom a pohlavím determinujú autizmus	385	všetky P>0,05	LR
test, či <u>alely</u> spolu s vekom a pohlavím determinujú idiopatický autizmus	272	všetky P>0,05	LR

N - počet analyzovaných pacientov v danom teste, Chi - Chi kvadrát test, ANOVA - Analysis of Variance, LR - Multivariantná logistická regresia s korekciou na vek a pohlavie

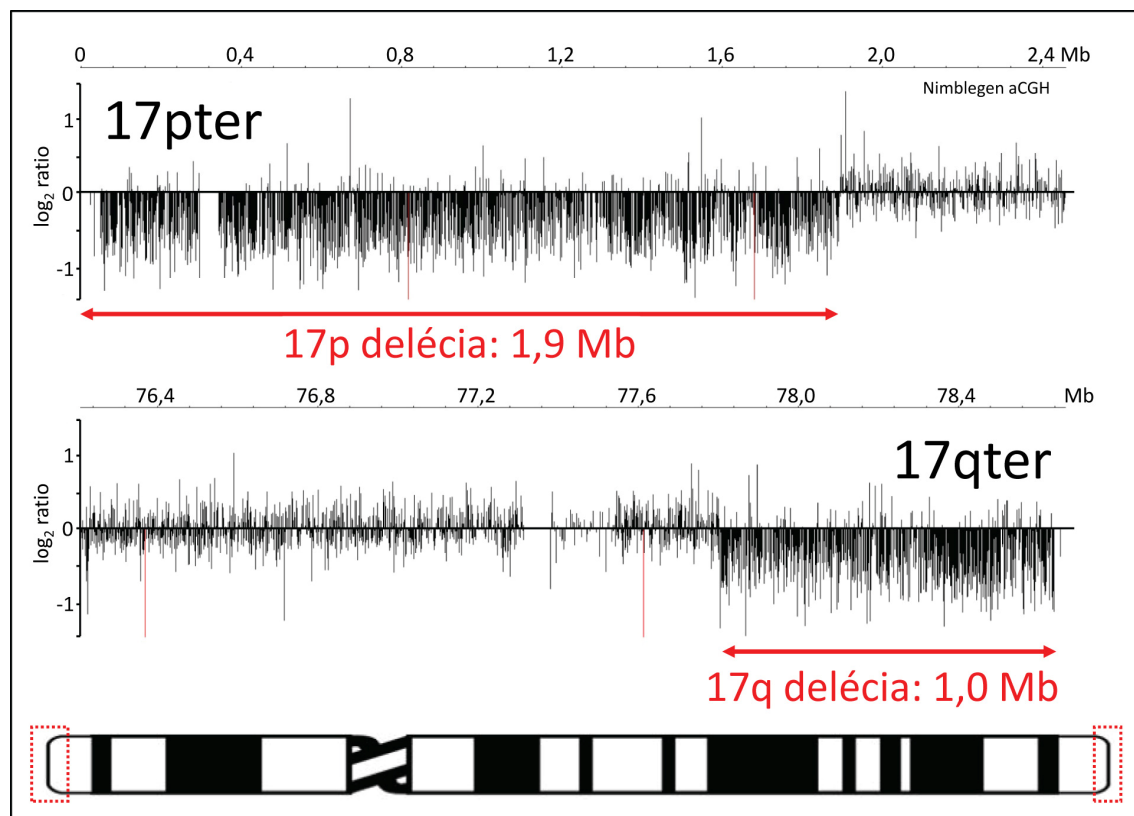
Prevedená POWER analýza ukázala, že naša štúdia má svojim rozsahom pacientov a kontrol dostatočnú silu odhaliť potenciálne klinicky významnú asociáciu nami testovaného polymorfizmu s autizmom, v prípade, že  $O.R. \geq 2,404$  alebo  $O.R. \leq 0,244$ . Naša štúdia má pri frekvencii rizikovej alely cca 8% hodnotu významnosti  $P=0,05$  a power 80%.



## 4.2 Molekulárno-genetická analýza pacientky 1

### 4.2.1 Detailné mapovanie zlomov aberácie

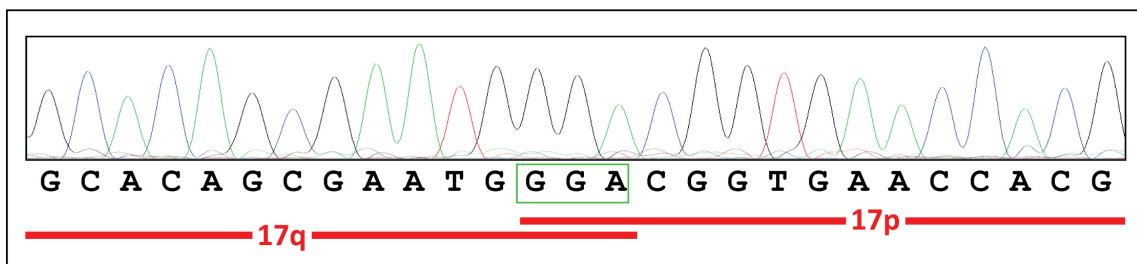
Výsledky analýzy DNA pacientky 1 metódou array-CGH nám pomohli bližšie určiť oblasti na jej chromozóme 17, kde došlo k zlomom oboch ramienok a ich následnému spojeniu za vzniku kruhového chromozómu. Array-CGH lokalizovala zlomy do pruhu 17p13.3, približne 1,9 Mb od teloméry 17p, a do 17q25.3, asi 1,0 Mb od teloméry 17q (Obr. 9). Oblasť zlomov bola vymedzená medzi oligonukleotidové sondy umiestnené na 1 891 424 bp a 1 893 509 bp na ramienku 17p a medzi 77 800 844 a 77 803 630 bp na ramienku 17q (sonda na 77 801 584 bp nebola informatívna). Tieto údaje nám umožnili navrhnúť sady primerov na premostenie spojenia ramienok 17p a 17q pomocou LR-PCR. Ďalšie kvantitatívne zmeny v genetickom materiáli chromozómu 17 pacientky 1 neboli na výsledkoch array-CGH pozorované.



Obrázok 9. Výsledok analýzy array-CGH u pacientky 1. Červené šípky znázorňujú pokles signálu DNA v deletovaných terminálnych oblastiach kruhového chromozómu.

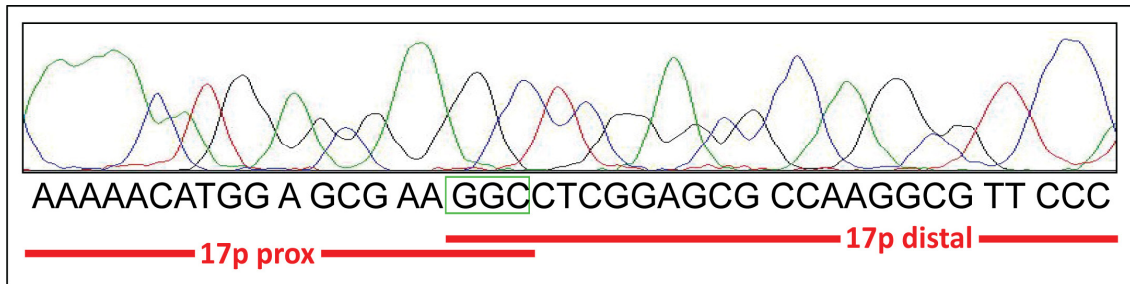
#### 4.2.2 Sekvencie DNA na zlomoch

Z niekoľkých rôznych párov primerov použitých na klonovanie unikátneho spojovacieho úseku kruhového chromozómu bola úspešná kombinácia primerov r1894 a r77800, pomocou ktorých sme metódou LR-PCR získali 2,8 kb dlhý produkt. Sekvenovaním tohto fragmentu s primermi r1894 a r77800 a následným primer walkingom s primermi r1892a, r77801 a r77801a sme lokalizovali miesto spojenia oboch ramienok na nukleotidovej úrovni. Zlom na ramienku 17p vznikol v bázach 1 891 604-6 a na 17q v bázach 77 802 210-12, pričom tri bázy (GGA) nachádzajúce sa v týchto intervaloch tvorili mikrohomoľógiu a nebolo možné presne určiť, z ktorého ramienka chromozómu 17 pochádzajú (Obr. 10). Cirkularizáciou chromozómu 17 došlo teda k delícii 1 891 604 bp z ramienka 17p a 972 530 bp zo 17q, čo dohromady pre pacientku predstavuje stratu genetického materiálu o veľkosti 2 864 136 bp z jedného jej chromozómu 17 (podľa stavu genómu z marca 2006 (HG18)).



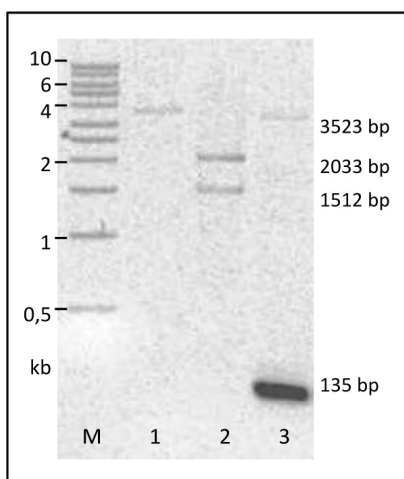
Obrázok 10. Sekvencia spojenia zlomov medzi ramienkami 17p-17q s vyznačenou mikrohomoľógiou 3bp (GGA).

Okrem toho bola sekvenovaním odhalená ďalšia malá prestavba ležiaca len 384 bp od zlomu na 17p. Táto 983 bp dlhá delécia nebola viditeľná metódou array-CGH, ale jej odhalenie vysvetlilo zlyhanie amplifikácie pri pokuse premostiť spojenie ramienok a nesúhlasiacu veľkosť niektorých PCR produktov oproti očakávaniu. Jeden z primerov bol totiž navrhnutý práve do oblasti tejto malej delécie, ktorá tiež obsahovala v mieste spojenia jej zlomov mikrohomoľógiu 3 bp (GCC) (Obr. 11). Navrhli sme primery r17del1 a r17del2 tesne obopínajúce túto deléciu a pomocou PCR a sekvenovania sme overili, že ani u jedného z rodičov pacientky sa táto delécia nevyskytuje, a musí sa teda jednať o *de novo* jav.



Obrázok 11. Reverzná sekvencia spojenia zlomov krátkej delécie na ramienku 17p s vyznačenou mikrohomológiou 3bp (GCC).

Aby sme vylúčili prítomnosť ďalších prestavieb v okolí zlomov, zmapovali sme približne 5 kb intervaly od obidvoch zlomov pomocou PCR/RFLP. Metódou LR-PCR s použitím primerov r77797+r1892a a r77801a+r1895 sme amplifikovali dva PCR produkty o dĺžke 5,6 a 3,5 kb obsahujúce spojenie zlomov a smerujúce od spojenia na opačné strany. Jeden produkt (r77801a+r1895) okrem spojenia 17p-17q obsahoval aj premostenie krátkej asociovanej delécie, čo sme overili nested-PCR pomocou primerov r17del1 a r17del2. Tieto PCR produkty sme štiepili niekoľkými reštrikčnými enzýmami. Všetky vzniknuté fragmenty mali veľkosť zhodnú s veľkosťami fragmentov predpovedaných *in silico*, čiže k ďalším prestavbám v okolí zlomov nedošlo (Obr. 12).



Obrázok 12. Výsledok štiepenia PCR produktu amplifikovaného primermi r77801a+r1895. Dráha č.1 marker, č.2 produkt štiepený endonukleázou TaqI na fragmenty 2033 a 1512 bp, č.3 neštiepený produkt o veľkosti 3523 bp, č.4 produkt nested-PCR dlhý 135 bp.

#### 4.2.3 Širší sekvenčný kontext zlomov

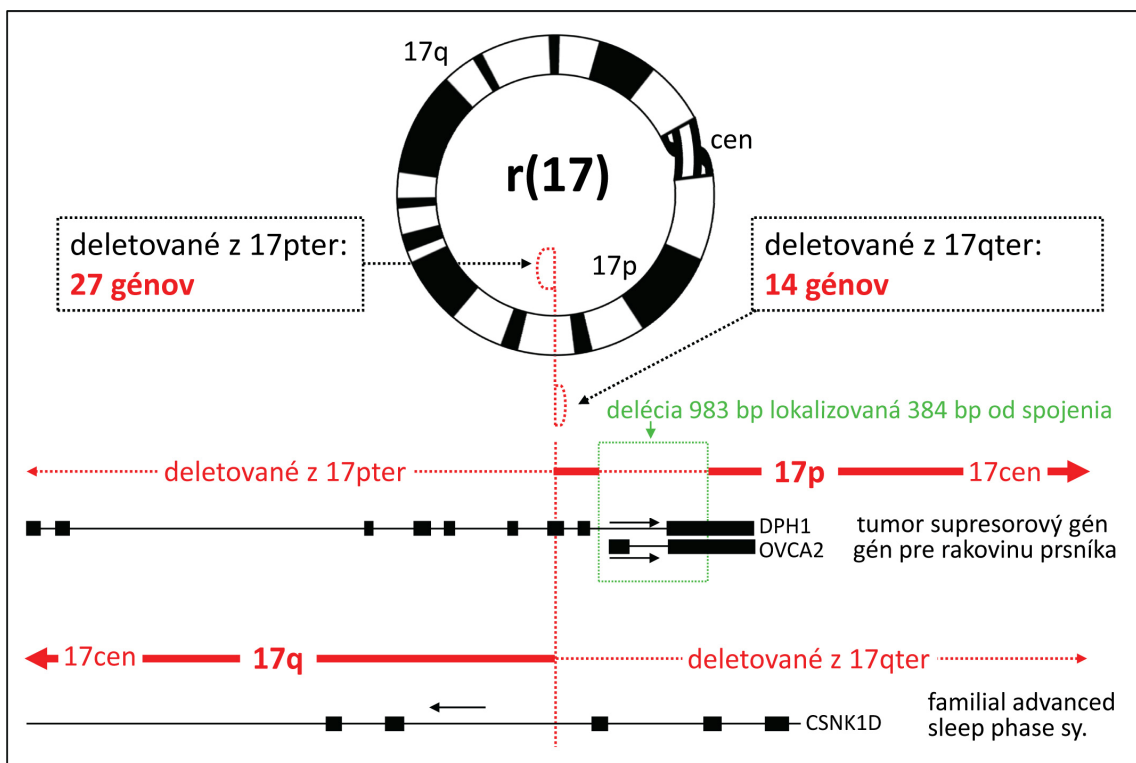
Okolie zlomov sme vyšetřili bioinformatickými metódami na prítomnosť prípadných homologických úsekov. Zamerali sme sa na sekvencie samotných zlomov oboch aberácií a na ich okolie až do vzdialenosti 5 kb smerom k centromére aj k teloméře. Žiadne oblasti s významnou homológiou medzi nimi neboli nájdené. Zlomy neobsahovali ani nízkofrekvenčné (low-copy) repetície, ani známe disperzné repetitívne sekvencie, ktoré by mohli byť substrátom nealelickej homologickej rekombinácie. V analyzovanom širšom okolí zlomov, hlavne na ramienku 17q, boli disperzné repetície dosť zriedkavé. V blízkosti spoja bol nápadný iba jeden GC-bohatý úsek (Obr. 13). V oblasti sme nenašli žiadne telomerické repetície. V okolí zlomov sme identifikovali niekoľko potenciálnych miest rozpoznávaných topoizomerázou II (konsenzus RNYNNCNNGYNGKTNINY), ktorá by sa tiež mohla podieľať na vzniku zlomov (Abeysinghe 2003). S prestavbami sa spájajú ešte aj iné krátke nešpecifické alebo čiastočne degenerované motívy, ktoré je možné nájsť na mnohých miestach v genóme (Abeysinghe 2003). Ich prítomnosť v blízkosti oboch spojení nebola analyzovaná, lebo ich úloha pri vzniku aberácie by ostala pravdepodobne aj tak nejasná.

```
17p  AGGGACATTTCTGTCAGCAGCCCTACCCGATGGACTTCTACGCTGGCA-
ring TAGCACCTCACCAGGCCCAACCCCACTCATCTCGTGGGCACCACGACCA
17q  TAGCACCTCACCAGGCCCAACCCCACTCATCTCGTGGGCACCACGACCA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
17p  -GTCCTTGGGGCCCTGGACGGTGAACCAC--GGCCAGGACCGCCGTCCC
ring TGTGGCACAGCGAATGGGACGGTGAACCAC--GGCCAGGACCGCCGTCCC
17q  TGTGGCACAGCGAATGGGAATGCGCACCCCCAGCCCCACCCTCTGCCCC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
17p  CA-----CGCCCCGGGCC--GGCCCGCGCGGGGGAAGGTAGGCG-GGGG
ring CA-----CGCCCCGGGCC--GGCCCGCGCGGGGGAAGGTAGGCG-GGGG
17q  CAGGGCATGCTCTGGGCCCTAGCTCCGCTTGGTGACAGGGAGGGAAGGGG
      **          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Obrázok 13. Alignment sekvencií v okolí spojenia 17p-17q použitím programu Clustal W. Sekvencia aberantného chromozómu 17 (v strede) je znázornená spolu so sekvenciou normálneho chromozómu 17 (hore a dole). Nukleotidy vyskytujúce sa v spojení zlomov sú vyznačené zeleným rámcom, čiarky naznačujú medzery pre maximalizáciu alignmentu, zhoda je znázornená hviezdíčkou.

#### 4.2.4 Gény na zlomoch a v deléciách

Na oboch ramienkach chromozómu 17 vznikol zlom v géne. Na 17p sa prerušil exón 11 génu *DPHI*, na 17q intrón 3 génu *CSNK1D* (Obr. 14). Pri zacyklení chromozómu 17 sa odstránili 5'-konce oboch týchto génov, vrátane ich promótorových oblastí, takže pravdepodobnosť vytvorenia akéhokoľvek fúzneho alebo prestavaného transkriptu je nízka. Okrem toho odstránila asociovaná 1 kb delécia značnú časť terminálneho exónu génu *DPHI* a zároveň aj prvý exón génu *OVCA2*, ktorý sa prekrýva s génom *DPHI* (Obr. 14). Anomália teda priamo zasiahla až 3 gény, ktoré pravdepodobne inaktivovala a ich transkripciou z kruhového chromozómu 17 pravdepodobne nemohla vzniknúť žiadna funkčná mRNA. Aberácia spôsobila ešte deléciu ďalších 41 známych génov kódujúcich proteíny: 27 génov z 17p a 14 génov z 17q.



Obrázok 14. Schematický nákras spojenia zlomov na r(17) a detailný pohľad na oblasť 10 kb v okolí zlomov. DNA prítomná na aberantnom chromozóme je znázornená plnou čiarou, deletované segmenty bodkovanou čiarou. Vertikálna bodkovaná čiara vyznačuje spojenie medzi 17p a 17q, zelený obdĺžnik zvyrazňuje *de novo* 1kb deléciu. Zasiahnuté gény sú naznačené čiernymi obdĺžnikmi (exóny) spojenými tenkou čiernou čiarou (intróny), šípky ukazujú ich orientáciu.

Tabuľka 13. Zoznam niektorých génov mapovaných do delécií na ramienkach 17p a 17q (rozdelené dvojitou čiarou) u pacientky 1, ktoré sú významné z hľadiska s nimi asociovaných ochorení alebo vyššej expresie v mozgu (M). Červenou sú vyznačené gény priamo narušené prestavbou.

Gén	Gén pre:	Asociované ochorenie	Mozog
<i>FAM57A</i>	family with sequence similarity 57, member A		M
<i>ABR</i>	active breakpoint cluster region-related	Miller-Dieker liessencephaly syndrome (MDLS), cancer	M
<i>YWHAE</i>	tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase	MDLS	M
<i>CRK</i>	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog	MDLS, cancer	
<i>MYO1C</i>	myosin IC	MDLS	
<i>SKIP</i>	skeletal muscle and kidney enriched inositol	MDLS	
<i>SCARF1</i>	scavenger receptor class F, member 1 isoform 1	MDLS	
<i>RILP</i>	Rab interacting lysosomal protein	MDLS	
<i>PRPF8</i>	U5 snRNP-specific protein	MDLS	
<i>SERPINF1</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade	MDLS	
<i>SMYD4</i>	SET a MYND domain containing protein 4		M
<i>RTN4RL1</i>	reticulon 4 receptor-like 1		M
<b><i>DPH1</i></b>	diphtheria toxin resistance protein required for diphthamide biosynthesis-like 1		M
<b><i>OVCA2</i></b>	ovarian cancer-associated gene 2 (tumor suppressor gene)	cancer	M
<b><i>CSNK1D</i></b>	casein kinase 1, delta isoform 1	familial advanced sleep-phase syndrome	M
<i>SECTM1</i>	secreted and transmembrane 1 precursor	cancer	
<i>FOKK2</i>	forkhead box K2 isoform 2		M
<i>RAB40B</i>	member RAS oncogene family	cancer	M
<i>FN3KRP</i>	fructosamine-3-kinase-related protein		M
<i>TBCD</i>	beta-tubulin cofactor D		M
<i>METRNL</i>	meteorin		M
<i>ZNF750</i>	zinc finger protein 750	seborrhea-like dermatitis with psoriasiform elements	

#### 4.2.5 Rodičovský pôvod aberácie a potenciálne imprintované gény

Z analyzovaných mikrosatelitových markerov z oblasti 17p deletovanej z kruhového chromozómu 17 boli informatívne iba tri: D17S695, D17S831 a D17S663 (Tabuľka 14). U pacientky bola identifikovaná vždy len jedna alela (z jej normálneho chromozómu 17), ktorá sa u všetkých týchto troch markerov zhodovala s alelou prítomnou len u jej matky. Z toho vyplýva, že pacientka má iba jednu, a to maternálnu kópiu terminálnych oblastí 17p a 17q. Zacyklenie a delécia genetického materiálu v týchto oblastiach postihli teda paternálny chromozóm 17.

Tabuľka 14 Prehľad počtu nájdených repetíc jednotlivých mikrosatelitových markerov v deletovanej oblasti chromozómu 17 u pacientky 1 a oboch jej rodičov.

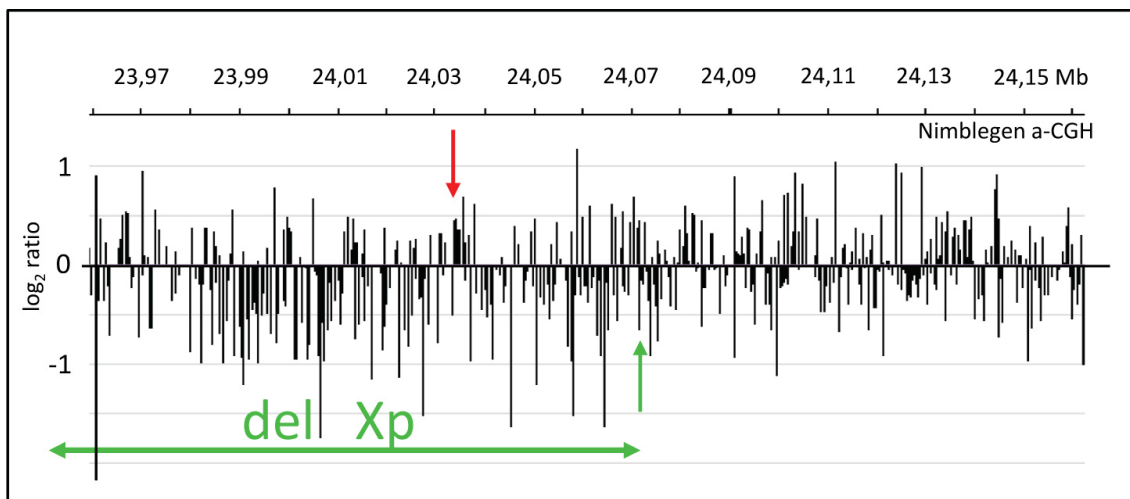
Mikrosatelit	Počet opakovaní motívu		
	u matky	u otca	u dcéry
D17S2197	7/7	7/7	7
D17S1308	11/11	11/11	11
<b>D17S663</b>	<b>12/13+7/7</b>	8/11+5/6	<b>12+7</b>
<b>D17S695</b>	<b>11/12</b>	5/6	<b>11</b>
D17S1533	10/10	9/10	10
<b>D17S831</b>	<b>15/18</b>	21/24	<b>15</b>

Publikovaný pacient s aberantným fenotypom a maternálnou heteroizodizómiou 17q25 (ale podstatne väčšou ako 1 Mb) (Rio 2001) nás naviedol na hľadanie potenciálne imprintovaných génov deletovaných u našej pacientky. Fenotyp chlapca vo veku 3 rokov sa prekrýval s fenotypom našej pacientky, hlavne prítomnosťou mentálnej retardácie, hyperaktivity, behaviorálnych problémov, absencie reči a dysmorfickými črtami (vysoké čelo, malý a široký nos s nosnými dierkami smerujúcimi dopredu, široký koreň nosu, široké ústa s kútikmi smerom dole). Pri hľadaní v databázach ľudských a myších imprintovaných alebo potenciálne imprintovaných génov sme ale nenašli ani jeden z génov deletovaných u našej pacientky.

## 4.3 Molekulárno-genetická analýza pacientky 2

### 4.3.1 Detailné mapovanie zlomov aberácie

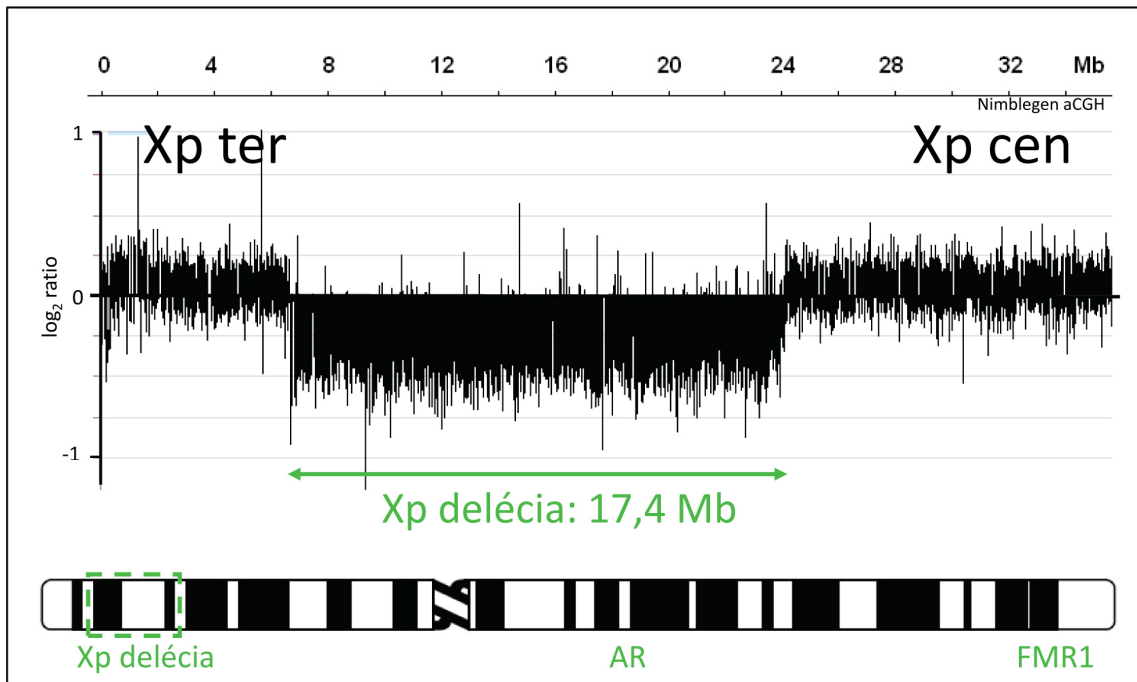
Výsledky prvej array-CGH v prípade tejto pacientky nám síce umožnili bližšie lokalizovať delečné zlomy do chromozomálnych pruhov Xp22.31 a Xp22.11, čiže približne 6,6 a 24,0 Mb od teloméry Xp, ale neistota v presnom určení miest zlomov ostávala vysoká. Najmä lokalizácia proximálneho zlomu delécie bola veľmi problematická, keďže pokles signálu v delícii nebol jasne odlišiteľný od normálnych signálov sond na proximálnom okraji delécie. Ten bol odhadnutý v širokom rozmedzí sond v okolí 24 030 000 alebo 24 065 000 (Obr. 15), ale ani jedna séria navrhnutých primerov nefungovala a neamplifikoval sa žiadny PCR produkt premost'ujúci deléciu.



Obrázok 15. Výsledok analýzy prvej array-CGH DNA pacientky 2 pri vyššom rozlíšení. Červená šípka znázorňuje oblasť prvotne určenú ako pravdepodobný koniec delécie, zelená ukazuje skutočné miesto zlomu.

Pri opakovanej analýze rovnakým typom čipu bola fluktuácia signálov menšia a ukázalo sa, že distálny koniec delécie o veľkosti okolo 17,4 Mb ležal medzi sondami 6 654 143 a 6 654 388 a proximálny medzi 24 069 311 a 24 069 812 (Obr. 16). Tieto dáta už umožnili lokalizáciu zlomov na nukleotidovej úrovni pomocou LR-PCR. Okrem tejto delécie sa v array-CGH profile chromozómov X pacientky nevyskytla žiadna iná chromozomálna odchýlka.

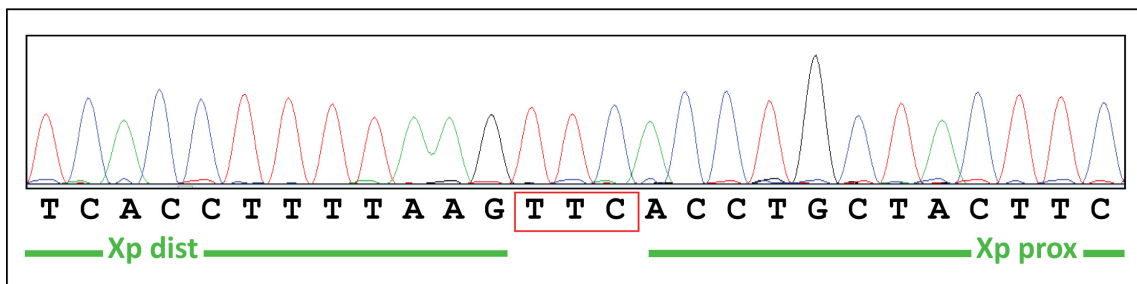




Obrázok 16. Analýza array-CGH u pacientky 2 pri nižšom rozlíšení. Šípka označuje pokles signálu u pacientky oproti kontrole a naznačuje polohu deletovanej oblasti na chromozóme Xp a miesta zlomov.

#### 4.3.2 Sekvencie DNA na zlomoch

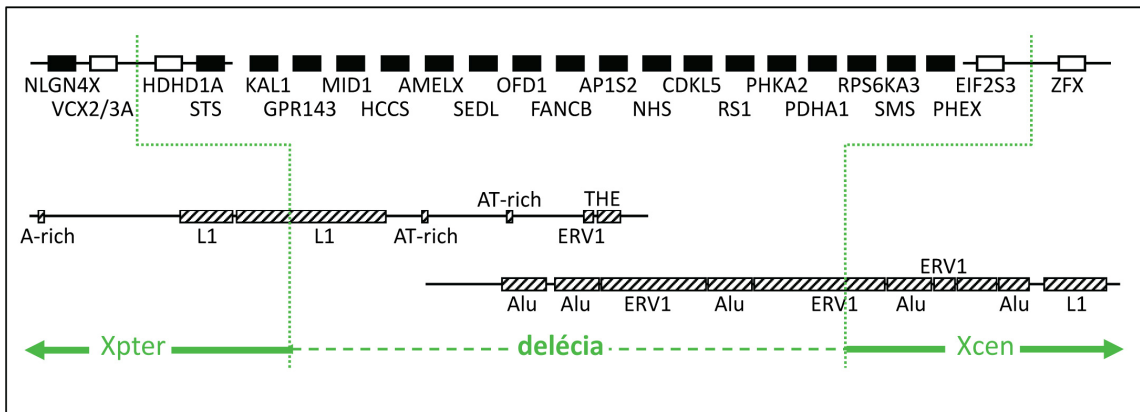
Po prvotných neúspešných pokusoch sme navrhli niekoľko ďalších primerov v blízkom okolí v druhom experimente lepšie lokalizovaných zlomov. Pomocou kombinácie primerov X6652+X24073, X6654+X24071 a X6653+X24069 sme metódou LR-PCR a nested-PCR amplifikovali rôzne dlhé PCR produkty obsahujúce spojenie oboch zlomov. Na sekvenačnú analýzu sme použili fragment dlhý 1,6 kb získaný pomocou primerov X6653 a X24069. Sekvenovaním tohto produktu sme identifikovali presnú lokalizáciu delécie na X chromozóme, medzi bázami 6 654 160 a 24 069 365 (HG18). V mieste spojenia zlomov boli vsunuté tri nukleotidy (TTC), ktoré nie sú prítomné ani na jednom delečnom zlome (Obr. 17).



Obrázok 17. Sekvencia spojenia zlomov delécie Xp s vyznačenými 3 nukleotidmi (TTC), ktoré nepatria ani proximálnej, ani distálnej oblasti zlomu.

### 4.3.3 Širší sekvenčný kontext zlomov

Obidva zlomy vznikli v oblastiach bohatých na rôzne repetície a nezasahujú do žiadneho génu (Obr. 18). Distálny zlom je v repetícii L1MA5 patriacej do rodiny L1 (trieda LINE). Z low-copy repetícií sa nachádza najbližšie AT-bohatý úsek približne 700 bp od zlomu. Proximálny zlom je lokalizovaný do repetície LOR1b-int patriacej do rodiny ERV1 (trieda LTR), ale v okolí sa nachádza mnoho ďalších repetícií, prevažne *Alu* (trieda SINE). Okolie zlomov sme bioinformaticky analyzovali na prítomnosť prípadných homologických úsekov, ale napriek veľkému množstvu repetícií v blízkosti zlomov nevykazujú tieto repetície žiadnu homológiu (Obr. 19). Repetície sa teda asi ani v tomto prípade nepodielali na nealelickej rekombinácii.



Obrázok 18. Schematické znázornenie okolia zlomov na Xp u pacientky 2. Šrafované obdĺžniky označujú repetície. Prerušovaná čiara označuje deléciiu Xp22.11-p22.31, plná čiara nedeletovanú oblasť. Z viac než 90 deletovaných génov sú zvýraznené iba gény podieľajúce sa na dedičných poruchách (čierne obdĺžniky) a gény lemujúce deléciiu (biele obdĺžniky).

prox	ACACGGCCATGCCCATTTTAA--TT-CCTAAGTGTGTATAATGT-GTCACCTTCAGCA
pac.	<b>TATTTTGTTTTGTAGCAGTTTAGGTTATTTATAAATCATTTCCTTGTTATCTATTTTACAA</b>
dist	<b>TATTTTGTTTTGTAGCAGTTTAGGTTATTTATAAATCATTTCCTTGTTATCTATTTTACAA</b>
	* * * * *
prox	TGATCAAGAAGAAGGGCCACTGATGTTCAA---ACCTGCTACTTCTCTAAAGTAGGAGAA
pac.	<b>ACTGTGAATATCAGGTGTTCCACCTTTTAAAGTTACCTGCTACTTCTCTAAAGTAGGAGAA</b>
dist	<b>ACTGTGAATATCAGGTGTTCCACCTTTTAAAGTTACCTGCTACTTCTCTAAAGTAGGAGAA</b>
	* * * * *
prox	<b>GTAAGGCAATGAGAGATAAACCATCCTCTGAAAGGTGAGAGATTTGAGAAGGGAGGAAA</b>
pac.	<b>GTAAGGCAATGAGAGATAAACCATCCTCTGAAAGGTGAGAGATTTGAGAAGGGAGGAAA</b>
dist	TTTTCACTAATACTCAGAATATTCTGCTG-----TTTTTTTTTTCATTAAACCAATAA
	* * * * *

Obrázok 19. Alignment sekvencií v okolí spojenia zlomov na Xp použitím Clustal W. Sekvencia aberantného chromozómu X (v strede) je znázornená so sekvenciou normálneho chromozómu X (hore a dole). Nukleotidy vyskytujúce sa v spojení zlomov sú v červenom ráme, čiarky znázorňujú medzery pre maximalizáciu alignmentu, zhoda je znázornená hviezdíčkou.

#### 4.3.4 Gény v delécii

Zlomky priamo nezasahujú do žiadneho génu (Obr. 18). Najbližšie nedeletované gény sú *ZFX* na proximálnej a *VCX3A* na distálnej strane delécie. V deletovanej oblasti je až 90 génov kódujúcich proteíny, medzi ktorými je niekoľko génov spôsobujúcich známe ochorenia, minimálne 20 génov, ktoré nepodliehajú inaktivácii chromozómu X a gény exprimované v mozgu potenciálne dôležité pre vznik autizmu (Tabuľka 15).

Tabuľka 15. Niektoré gény mapované do delécie Xp u pacientky 2, ktoré sú významné z hľadiska s nimi asociovaných ochorení, X-inaktivácie alebo expície.

Gén	Gén pre:	X	Asociované ochorenie
<i>STS</i>	steryl-sulfatase	E	X-linked ichthyosis, ADHD
<i>PNPLA4</i>	patatin-like phospholipase domain containing 4	E	
<i>KAL1</i>	Kallmann syndrome	?	Kallmann syndrome
<i>TBL1X</i>	transducin beta-like 1X isoform	E	
<i>GPR143</i>	G protein-coupled receptor 143	E	Ocular albinism type 1
<i>MID1</i>	midline 1	I	Opitz-GBB syndrome
<i>HCCS</i>	holocytochrome c synthase	I	syndromic microphthalmia
<i>AMELX</i>	amelogenin X chromosome	?	amelogenesis imperfecta
<i>TMSB4X</i>	thymosin, beta 4	E	
<i>RAB9A</i>	member RAS oncogene family	E	cancer
<i>TRAPPC2</i>	trafficking protein particle complex 2-like	E	spondyloepithelial dysplasia tarda
<i>OFD1</i>	orofacialdigital syndrome 1	E	orofacialdigital syndrome 1
<i>GPM6B</i>	glycoprotein M6B	E	expícia v mozgu
<i>FANCB</i>	Fanconi anemia	I	X-linked Fanconi anemia
<i>PIGA</i>	phosphatidylinositol	I	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
<i>PIR</i>	pirin	E	
<i>TMEM27</i>	transmembrane protein 27	E	
<i>CA5BL</i>	carbonic anhydrase VB-like	E	
<i>CA5B</i>	carbonic anhydrase VB	E	
<i>INE2</i>	inactivation escape 2 (non-protein coding)	E	non-coding RNA
<i>AP1S2</i>	adaptor-related protein complex 1 sigma 2	E	X-linked MR
<i>GRPR</i>	gastrin releasing peptide receptor	E	ASD susceptibility
<i>SI00G</i>	vitamin D-dependent calcium binding 3	E	
<i>CTPS2</i>	CTP synthetase	E	
<i>SYAP1</i>	synapse associated protein 1	E	expícia v mozgu
<i>CXORF15</i>	gamma-taxilin	E	
<i>RBBP7</i>	retinoblastoma binding protein 7	E	
<i>NHS</i>	Nance Horan syndrome	I	Nance Horan syndrome, MR, ASD
<i>CDKL5</i>	cyclin-dependent kinase-like 5	I	inf. epileptic encephalopathy-2, ASD
<i>XLRS1</i>	juvenile retinoschisis	I	juvenile retinoschisis, X-linked
<i>PHKA2</i>	phosphorylase kinase, alpha 2	I	Glycogen storage disease IXa
<i>PDHA1</i>	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	I	pyruvate decarboxylase deficiency
<i>RPS6KA3</i>	ribosomal protein S6 kinase	I	Coffin-Lowry syndrome
<i>SMS</i>	Spermine synthase	I	Snyder-Robinson syndrome, MR
<i>PHEX</i>	phosphate-regulating neutral endopeptidase	I	X-linked hypophosphatemia
<i>SATI</i>	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	?	Keratosis follicularis spinulosa

modré-recesívne ochorenia, červené-dominantné ochorenia, zelená-ochorenie spôsobené somatickými mutáciami, X - X-inaktivácia, E - gén nepodlieha inaktivácii, I - gén podlieha inaktivácii, ? - nejasný stav

#### 4.3.5 Rodičovský pôvod delécie

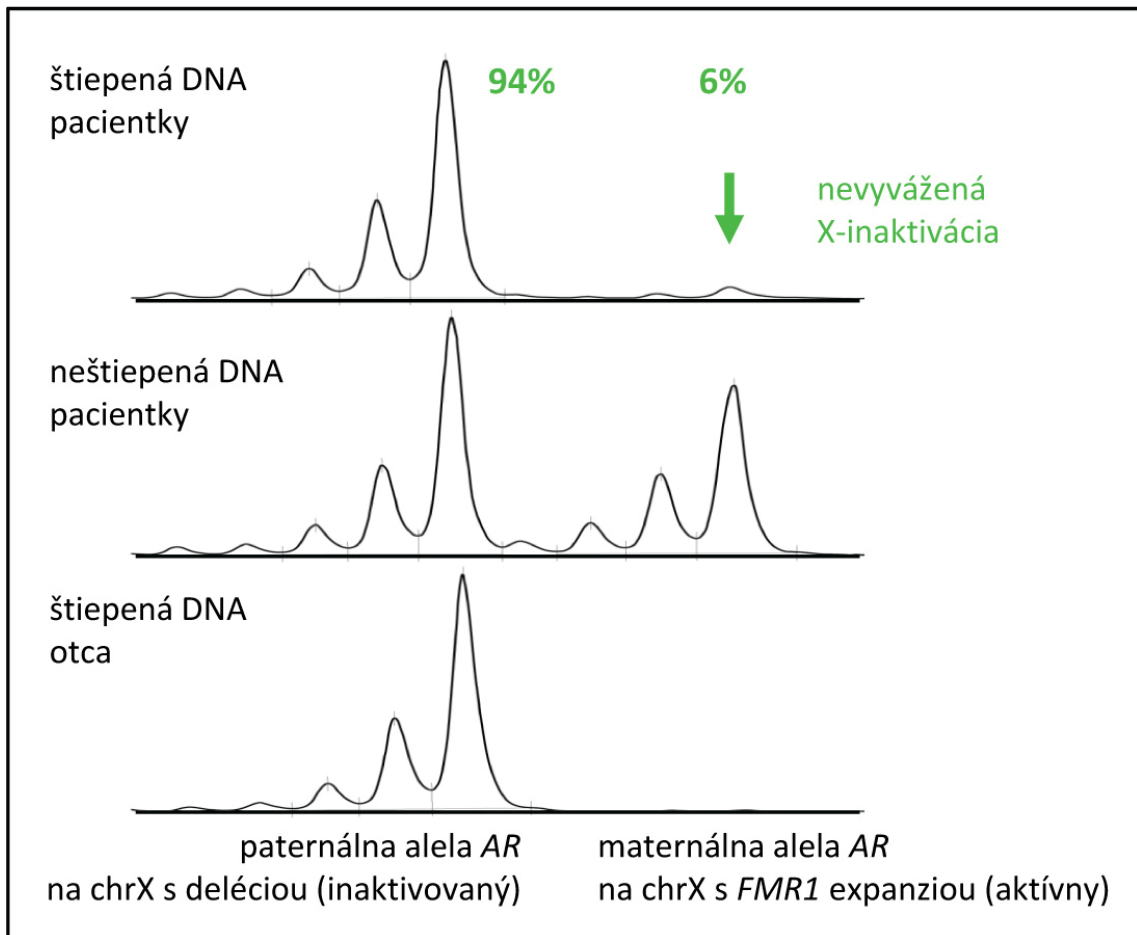
Z viacerých analyzovaných markerov lokalizovaných v deletovanej oblasti chromozómu X boli tri informatívne: DXS9895, DXS9902 a bezmenná repetícia (TAGA)<sub>n</sub> (Tabuľka 16). U týchto markerov bola jediná alela prítomná na normálnom chromozóme X pacientky zhodná vždy s jednou alelou len u jediného rodiča, v tomto prípade matky. Z týchto zistení vyplynulo, že pacientka nesie kópiu oblasti Xp22.11-p22.31 iba od matky a delécia vznikla na otcovskom chromozóme X. Keďže expanzia v géne *FMRI* pochádzala od matky, u pacientky boli oba defekty na chromozómoch X (expanzia *FMRI* a veľká delécia Xp) v pozícii trans.

Tabuľka 16 Prehľad počtu nájdených repetícií jednotlivých mikrosatelitových markerov v deletovanej oblasti Xp u pacientky 2 a oboch jej rodičov.

Mikrosatelit	Počet opakovaní motívu		
	u matky	u otca	u dcéry
VNTRX_7387 (DXS9895)	10/11	9/9	10
VNTRX_14063	14/24	25/26	24
VNTRX_15233 (DXS9902)	14/15	13/13	15
VNTRX_20818	11/12	11/11	11
VNTRX_21686	10/10	10/10	10

#### 4.3.6 Stupeň inaktívácie chromozómov X

Na základe prekvapujúceho zistenia metylácie oboch aliel génu *FMRI* sme sa rozhodli u pacientky prešetriť inaktíváciu jej chromozómov X ešte aj analýzou metylácie v géne *AR*. Náš predpoklad sa potvrdil, pacientka mala jeden chromozóm X prednostne inaktívovaný na úkor druhého. Ako mužské kontroly pre určenie pôvodu jednotlivých X chromozómov boli použité vzorky DNA otca a maternálneho starého otca. Analýza leukocytov ukázala, že z 94% inaktívovaný chromozóm X pochádzal od otca, čiže to bol ten, ktorý niesol deléciu a normálnu alelu *FMRI*. Druhý chromozóm X, pochádzajúci od matky a nesúci mutovanú alelu *FMRI*, bol inaktívovaný len z 6% (Obr. 20). Tento pomer bol v súlade s metylačným vzorom lokusu *FMRI*.



Obrázok 20. Analýza miery metylácie v lokuse *AR* pacientky, ktorý korešponduje s celkovou X-inaktíváciou. Porovnanie amplifikácie HpaII-štiepenej a neštiepenej gDNA pacientky jasne ukazuje vysokú mieru vychýlenia X-inaktívácie: alela vykazujúca skoro úplnú metyláciu pochádza od otca, kým maternálna alela *AR* (z X chromozómu nesúceho *FMRI* expanziu, ale nie deléciu) je takmer úplne nemetylovaná (zelená šípka).

## 5. DISKUSIA

### 5.1 Asociačná štúdia s variantami v géne *ADA*

Gén pre adenzín-deaminázu (*ADA*) o veľkosti 32 kb a obsahujúci 12 exónov je lokalizovaný na 20q13.11 (Wiginton 1986). V géne bolo popísaných viac ako 29 mutácií a polymorfizmov (OMIM #102700). Väčšina mutácií tvorí nefunkčné alely, ktoré sú zodpovedné za ťažkú kombinovanú imunodeficienciu (severe combined immunodeficiency disease, SCID). Niektoré varianty génu *ADA* sa vyskytujú aj u zdravých jedincov. Dve najčastejšie sú *ADA\*1* a *ADA\*2*. Alela *ADA\*2* sa vyskytuje s nižšou frekvenciou - asi 3-11% v kaukasskej populácii (Weissmann 1982). V tejto alele dochádza k tranzícii v exóne 1, kde sa v 8. kodóne zamieňa G za A (G22A), čo spôsobuje substitúciu kyseliny asparárovej za asparagín (Asp8Asn) (Hirschhorn 1994).

Enzým ADA katalyzuje deamináciu adenzínu a deoxyadenzínu. Je činný v niekoľkých bunkových procesoch: v metabolizme purínov, regulácii aktivity peptidáz, v imunitnej odpovedi a v regulácii nervového prenosu. Receptory ADA sa zúčastňujú bunkovej adhézie pri vývine CNS. Enzým existuje v intracelulárnej aj v extracelulárnej forme na membráne viacerých typov buniek vrátane lymfocytov a neurónov (Franco 1997). Navyše, adenzín je regulátor dopamínerných a serotonínerných dráh v CNS, o ktorých úlohe v autizme sa špekuluje. Stubbs (1982) skúmal aktivitu enzýmov metabolizmu purínov a zistil, že aktivita ADA bola redukovaná v sére autistických detí v porovnaní so zdravými kontrolami. Novšia štúdia to ale nepotvrdila (Zoroglu 2004). Heterozygotní jedinci pre *ADA\*1* a *ADA\*2* vykazujú v erytrocytoch a lymfocytoch o 15 až 20% menšiu katalytickú aktivitu ako homozygoti pre *ADA\*1* (Battistuzzi 1981).

Štúdie populácií z Apeninského polostrova ukázali, že alela *ADA\*2* je častejšia u autistov oproti zdravým kontrolám (Persico 2000; Bottini 2001). Štúdia Hettingera (2008) v severoamerickej populácii to naopak vyvrátila. Iná štúdia v talianskej populácii (Saccucci 2006) sa zamerala na asociáciu alely *ADA\*2* s ľahkou mentálnou retardáciou neznámej etiológie a zistila potenciálnu úlohu alely *ADA\*2* v patogenéze tejto poruchy. V Tabuľke 17 sú frekvencie aliel a genotypov v rôznych talianskych populáciách, v severoamerickej a v českej populácii (súbor pacientov s idiopatickým autizmom).

Tabuľka 17. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v súboroch pacientov a zdravých kontrol v jednotlivých populáciách.

		Frekvencia genotypov (%)			Frekvencia aliel (%)	
		1/1	1/2	2/2	1	2
Neapol <i>Persico</i>	<b>autisti (N=91)</b>	<b>82,4</b>	<b>17,6</b>	<b>0</b>	<b>91,2</b>	<b>8,8</b>
	kontroly (N=152)	92,1	7,9	0	96,0	4,0
Rím a Sicília <i>Bottini</i>	<b>autisti (N=118)</b>	<b>66,1</b>	<b>31,4</b>	<b>2,5</b>	<b>81,8</b>	<b>18,2</b>
	kontroly (N=118)	88,9	11,8	0	94,4	5,6
Severná Amerika <i>Hettinger</i>	<b>autisti (N=126)</b>	<b>90,4</b>	<b>9,6</b>	<b>0</b>	<b>95,2</b>	<b>4,8</b>
	kontroly (N=167)	86,2	13,2	0,6	92,8	7,2
ČR <i>táto práca</i>	<b>autisti (N=272)</b>	<b>88,9</b>	<b>10,7</b>	<b>0,4</b>	<b>94,3</b>	<b>5,7</b>
	kontroly (N=130)	85,4	13,8	0,8	92,3	7,7

Naša štúdia bola prevedená so zámerom reprodukovať štúdie, v ktorých sa zistil častejší výskyt alely *ADA\*2* u pacientov s autizmom a potvrdiť alebo vyvrátiť závery týchto štúdií v našom súbore pacientov. Navyše teraz už môžeme porovnať výsledky s recentnou štúdiou prevedenou aj v inej ako talianskej populácii.

V kontrolnej skupine sme našli variantu *ADA\*2* v 7,7% prípadov, čo zodpovedá očakávaným frekvenciám v kaukazskej populácii. Rovnako to platí aj pre kontroly v ostatných prácach. Rozdiely nájdeme pri porovnávaní jednotlivých populácií autistov, ktoré ale nemusia byť homogénne. Kým *Persico* analyzoval skupinu autistov z okolia Neapolu, ktorí boli zo simplexných rodín, *Bottini* skúmal autistov tiež prevažne zo simplexných rodín, ale z dvoch populácií: prvú izolovanú na ostrove Sicília môžeme považovať za veľmi homogénnu, druhá z Ríma bude vplyvom väčšej fluktuácie pravdepodobne heterogénnejšia (kontroly pochádzali taktiež z oboch regiónov). *Hettinger* (2008) vyšetroval 46 multiplexných rodín z Kanady a 80 z USA. Naš súbor pochádza z celej Českej republiky a s výnimkou niekoľkých prípadov sa jedná o simplexné rodiny. Pre porovnanie s ostatnými prácami je adekvátny len súbor pacientov s idiopatickým autizmom.

Frekvencie rizikovej alely *ADA\*2* sa medzi publikovanými skupinami autistov a našim súborom pacientov líšia. V talianskych štúdiách sú tieto frekvencie významne zvýšené: Persico zistil viac ako dvojnásobnú frekvenciu tejto alely u autistov oproti kontrolám, Bottini našiel až 3-násobnú, pričom skupina autistov z Ríma sa len veľmi málo líšila od tej zo Sicílie. V oboch prípadoch to znamená štatisticky významný rozdiel, kde hodnota významnosti  $P=0,023$  (Persico, Fisherov exaktný test) a  $P<0,00001$ ; O.R.=4,1 a 95%C.I.=(1,998-8,526) (Bottini,  $\chi^2$  test). Keby sa však v prvej práci použila správnejšia dvojstranná hodnota  $P$  namiesto použitej jednostrannej hodnoty, vyšlo by  $P=0,043$ . Nami pozorované výsledky sa naproti tomu podobajú výsledkom získaným v severoamerickej populácii. Použitím  $\chi^2$  testu sme dostali hodnoty  $\chi^2=1,17$  a  $p(P)=0,277$  a pri použití Fisherovho testu je hodnota hladiny významnosti  $P=0,2820$ . Hettinger nadobudol použitím  $\chi^2$  testu hodnoty  $\chi^2=1,40$  a  $P=0,236$ . Z týchto výsledkov môžeme teda podobne ako Hettinger vyvodit' záver, že v populácii českých pacientov s autizmom nepredstavuje alela *ADA\*2* rizikovú alelu pre rozvoj autizmu.

Tento rozpor sa dá vysvetliť viacerými dôvodmi. Po prvé, frekvencia alely *ADA\*2* sa líši v rôznych etnikách a v rôznych populáciách. Existuje viditeľný rozdiel aj medzi európskymi kaukazskými populáciami, kde u stredomorských národov je vyššia ako u severských (Weissmann 1982). Po druhé, obe alely *ADA* sa pravdepodobne môžu prenášať rozdielne v závislosti od rodiča. Zistilo sa, že alela *ADA\*1* sa významne častejšie prenáša od otca, kým alela *ADA\*2* od matky (Persico 2000; Hettinger 2008), čo môže mať význam vzhľadom na možný imprinting. U myši bola identifikovaná imprintovaná oblasť na chromozóme 2, ktorá zodpovedá ľudskej oblasti chromozómu 20q nesúcej gén *ADA* (Peters 2004). V tejto oblasti sú identifikované dva paternálne imprintované gény: *NNAT* na 20q11.2 (Evans 2001) a *GNAS* na 20q13.3 (Hayward 1998). Hoci ani jeden z nich neleží v tesnej blízkosti génu *ADA*, ich vplyv na túto oblasť nemožno vylúčiť. Na záver a predovšetkým, nemožno zabudnúť na skutočnosť, že autizmus je multifaktoriálne ochorenie, na ktorom sa pravdepodobne podieľa mnoho rôznorodých genetických a negenetických faktorov, preto i len mierna redukcia aktivity enzýmu *ADA* môže v interakcii s inými činiteľmi hrať u autistických pacientov rolu. Z tohto dôvodu sme vyšetřovali celý náš súbor pacientov aj s inými pridruženými nálezmi, kde sa však rovnako nepotvrdila asociácia s alelou *ADA\*2* ( $P=0,1668$ ).



Saccucci sa v talianskej populácii zamerala na asociáciu alely *ADA\*2* s ľahkou mentálnou retardáciou v porovnaní so skupinou kontrol a skupinou pacientov so stredne ťažkou a ťažkou MR známej etiológie (Saccucci 2006). Preto sme prešetrili aj túto možnú spojitosť u našich pacientov s idiopatickým autizmom. K mentálnej retardácii môžeme pristupovať ako k jednému z endofenotypov autizmu. V súbore pacientov s idiopatickým autizmom sme analyzovali oddelene všetky typy mentálnej retardácie, ale v porovnaní s kontrolami sme ani v jednej skupine pacientov nezistili signifikantnú odchýlku (všetky  $P > 0,05$ ). Vytvorili sme aj spojenú skupinu autistov so stredne ťažkou a s ťažkou MR. Frekvencie aliel sú zhrnuté v Tabuľke 18 spolu s výsledkami z talianskej štúdie, kde bol nájdený rozdiel medzi skupinou s ľahkou MR a ťažšou MR ( $P < 0,05$ ), s ľahkou MR a zdravými kontrolami ( $P < 0,01$ ), ale nie medzi ťažšou MR a zdravými kontrolami. Kombináciou nami nameraných údajov v skupinách s ľahkou MR a zdravými kontrolami ( $P = 0,703$ ), s ľahkou MR a ťažšou MR ( $P = 0,269$ ), a medzi ťažšou MR a zdravými kontrolami ( $P = 0,351$ ) sme nezistili žiadnu signifikantnú odchýlku, ktorá by nasvedčovala tomu, že pri rozvoji alebo závažnosti mentálnej retardácie, ako jedného z endofenotypov autizmu, by u autistov hrala rolu alela *ADA\*2*.

Tabuľka 18. Zastúpenie jednotlivých genotypov a aliel v súbore talianskych a našich autistických pacientov s rôznymi stupňami mentálnej retardácie a v skupine zdravých kontrol.

		Frekvencia genotypov (%)			Frekvencia aliel (%)	
		1/1	1/2	2/2	1	2
Taliansko Saccucci	LMR (N=80)	78,75	21,75	0	89,4	10,6
	TMR (N=80)	91,4	8,6	0	95,7	4,3
	kontroly (N=153)	88,9	11,1	0	94,4	5,6
ČR táto práca	LMR (N=69)	84,1	14,5	1,4	91,3	8,7
	TMR (N=105)	89,5	10,5	0	94,8	5,2
	kontroly (N=130)	85,4	13,8	0,8	92,3	7,7

LMR – pacienti s ľahkou MR, TMR – pacienti so strednou a stredne ťažkou MR

Okrem kategórie splnenia diagnostických kritérií autizmu a endofenotypu stupňa mentálnej retardácie sme analyzovali aj asociáciu s jednotlivými podtypmi autizmu a s prítomnosťou komorbidít, ale v ani jednej analyzovanej podskupine pacientov sa žiadna asociácia s alelami *ADA\*1* a *ADA\*2* nepotvrdila. Žiadna z testovaných premenných a z použitých štatistických metód, ani po zohľadnení potenciálnych „confounding faktorov“ ako je pohlavie a vek, nepreukázala žiadnu asociáciu s autizmom, a to ani v univariantnej analýze, ani v multivariantnej analýze. Z analýzy naopak v náznaku možno vyplýva, že alela *ADA\*2* by mohla byť protektívnou. Okrem našej štúdie sa tento trend objavuje ešte aj v americkej štúdii (Hettinger 2008), ale ani tam táto závislosť nedosahuje štatistickej signifikancie.

Naša štúdia prevyšuje rozsahom súboru doterajšie publikované práce. Veľkosť nášho súboru by umožnila identifikáciu asociácie s variantou zvyšujúcou riziko viac ako 2,5x (znižujúcou 0,25x). To, že asociácia nebola nájdená, neznamená, že polymorfizmus nemôže byť asociovaný s ochorením. Pokiaľ áno, jeho odds ratio (relatívne riziko) bude menšie než 2,5 (vyššie ako 0,25). Je teda pravdepodobné, že rozšírenie súboru (minimálne na dvojnásobok pacientov a kontrol) by mohlo identifikovať asociáciu, avšak podľa znalosti výsledku súčasných rozsiahlych alelických asociačných štúdií by bolo možné očakávať, že zistené odds ratio bude nižšie ako 2 (vyššie než 0,5), čo znamená, že polymorfizmus síce môže byť štatisticky asociovaný, ale význam prediktívnej hodnoty tohto polymorfizmu pre jednotlivca (klinická využiteľnosť) bude minimálna. Preukázali sme teda, že polymorfizmus nemá žiadnu využiteľnosť v klinickej praxi. Štúdie, ktoré asociáciu preukázali, boli buď založené na nesprávnej štatistickej analýze - napr. použitím jednostrannej hodnoty P, alebo mali malý počet pacientov, čo znamená, že mali vyššiu pravdepodobnosť tzv. štatistickej chyby I typu (falošná pozitivita).

Naša asociačná štúdia, podobne ako mnoho ďalších, je príkladom toho, čo je v štúdiách s autizmom bežné. Veľmi často sa vzápätí po tom, čo sa v nejakej kohorte pacientov objaví významný nález, nepodarí tento nález v inej skupine replikovať. Je to dané pravdepodobne komplexnou genetickou determináciou a veľkou heterogenitou ochorenia, ako aj heterogenitou rôznych populácií, rodín alebo vonkajšieho prostredia.

## 5.2 Detailná analýza chromozomálnych aberácií

Chromozomálne aberácie sa vyskytujú približne u 10-15% pacientov s dysmorfickými črtami, u 20% pacientov s ľahkou alebo stredne ťažkou mentálnou retardáciou a asi u 5% pacientov s autizmom (Raynham 1996; Nussbaum 2001; Castermans 2004).

Naša pacientka 1 mala kruhový chromozóm 17. Kruhové chromozómy patria medzi veľmi zriedkavé aberácie. Vznikajú prerušením oboch ramienok chromozómu a následným spojením voľných koncov. Tieto aberácie sú nestabilné a vytvárajú mozaiky bunkových línií so širokým spektrom odchýlok vrátane straty kruhu, dvojitéch kruhov, izochromozómov alebo iných marker chromozómov pochádzajúcich z pôvodného kruhového chromozómu (Vogel 1997). U pacienta môžu spoločne existovať rôzne bunkové línie, a zloženie a frekvencia mozaiky sa môžu líšiť v rôznych tkanivách (Nishiwaki 2005).

Veľmi sa diskutuje o spôsobe, akým kruhové chromozómy vplývajú na fenotyp ich nositeľov. Jednou z možností je, že chorobné symptómy sú dôsledkom nestability, čo dalo vznik teórii „syndrómu kruhového chromozómu“. Ta postuluje, že za majoritu fenotypových znakov je zodpovedná prítomnosť kruhového chromozómu, a závažnosť fenotypu závisí na miere nestability kruhu, ktorá často súvisí s rastovou retardáciou v dôsledku zvýšenej úmrtnosti aneuploidných buniek (Kosztolanyi 1987). Spomalenie rastu býva sprevádzané mentálnou retardáciou, dysmorfizmami a zmenami pigmentácie.

Ďalšou možnosťou je, že fenotyp nositeľov kruhového chromozómu súvisí oveľa viac s genetickým obsahom konkrétneho zúčastneného chromozómu, a teda že žiadny univerzálny syndróm neexistuje. V súlade s týmto pohľadom boli u nositeľov rôznych kruhových chromozómov popísané špecifické syndrómy, ktoré sa podstatne líšia v stupni mentálnej retardácie, prítomnosťou a závažnosťou epilepsie, špecifickými dysmorfickými črtami a prítomnosťou rôznych defektov orgánov (napr. syndróm kruhového chromozómu 13, syndróm kruhového chromozómu 20, atď.) (Schinzel 2001). Zlomy ramienok a ich spojenie môžu ovplyvňovať expresiu špecifických génov mnohými spôsobmi. Gény na distálnej strane zlomov bývajú deletované a pacienti môžu trpieť ich haploinsuficienciou, alebo môžu byť odhalené prípadné recesívne mutácie na zvyšných alelách. Gény ležiace v oblasti zlomov môžu byť prerušené, ale aj

spojené (fúzované), čo môže viesť k získaniu novej funkcie takto vytvoreného peptidu. Ďalej môže dôjsť k oddeleniu génov od ich regulačných oblastí. Vplyv kruhového chromozómu na fenotyp nositeľa sa tak môže líšiť v závislosti na veľkosti a obsahu deletovaných častí a na umiestnení a podstate týchto zlomov (Havlovicova 2007).

Všetky tieto genetické mechanizmy potenciálne operujúce aj na kruhovom chromozóme 17 našej pacientky 1 môžu ovplyvňovať jej fenotyp. Kruhové chromozómy 17 sú veľmi zriedkavé. Od prvej zmienky o takom pacientovi (Petit 1971) bolo v literatúre popísaných len niekoľko ďalších prípadov (Endo 1999; Shashi 2003). U pacientov s rôznymi kruhovými chromozómami sú často pozorované zmeny pigmentácie, a tieto príznaky môžu viesť k mylnej diagnóze NF1. U našej pacientky 1 boli splnené klinické kritériá pre NF1 (Gutmann 1997) prítomnosťou škvŕn *cafe-au-lait* a pehami v trieslach a podpaзуší. Diagnóza NF1 na pozadí mozaikovej monozómie 17 vyvoláva otázku, či odchýlky v pigmentácii kože vznikli skutočne ako nešpecifická manifestácia „syndrómu kruhového chromozómu“, alebo či sa vzťahujú na stratu jednej kópie génu *NF1* (ktorý leží v 17q11) v 12% populácii monozomických buniek. Boli popísaní pacienti s NF2, ktorí mali 6% alebo nižšiu mozaiku monozómie 22 (a génu *NF2* na 22q12) (Tsilchorozidou 2004). Okrem niekoľkých pacientov s kruhovým chromozómom 17 a diagnózou NF1 (Shashi 2003) bola v literatúre popísaná aj pacientka s touto aberáciou a diagnózou karcinómu prsníka a vaječníkov (Wiktor 1993). Podobne bolo niekoľko prípadov kruhového chromozómu 22 spojených s NF2 a zvýšeným rizikom vzniku rakoviny (Luciani 2003; Tsilchorozidou 2004). Rakovina bola tiež spojená s kruhovými chromozómami 11 a 13 (Tommerup 1992). Pokiaľ vylúčime nepravdepodobnú možnosť, že tieto zistenia sú iba súhrou náhod, môžu byť tieto fenotypy spôsobené stratou jednej kópie génu asociovaného s príslušným ochorením (*BRCA1*, *NF2*, *SNF5* alebo *CHEK2*, *WT1* a *RBI*) v monozomických bunkách vzniknutých nestabilitou kruhu. Vyriešenie problému so špecifickými príznakmi spojenými s konkrétnym kruhovým chromozómom je veľmi dôležité aj z klinického hľadiska. Naša pacientka môže mať podľa tejto úvahy zvýšené riziko rakoviny v dôsledku jej mozaikovej hemizygozity génov *TP53* a *BRCA1*, podobne ako pacienti s germinálnou mutáciou v týchto tumor-supresorových génoch (Havlovicova 2007).

Okrem NF1 bol našej pacientke 1 diagnostikovaný predovšetkým atypický autizmus a mentálna retardácia. Hoci tieto nálezy takisto môžu byť nešpecifické (lebo sú spojené aj s inými aberáciami), je zaujímavé, že niekoľko celogenómových štúdií poukázalo na rôzne oblasti chromozómu 17q a 17p, ako na potenciálne regióny, kde ležia gény zodpovedné za autizmus (Risch 1999; IMGSA 2001; Yonan 2003). Podobne boli aj u Aspergerovho syndrómu nájdené zlomy na 17p13 (Tentler 2003). U našej pacientky 1 však deletované úseky chromozómu 17 obsahovali príliš veľké množstvo génov na to, aby sme mohli priamo poukázať na jednotlivé gény potenciálne zapojené do jej fenotypu. Napriek tomu by mohol charakter niektorých deletovaných génov korešpondovať s niektorými príznakmi, vrátane autizmu.

Deletovaný lokus *DPH1/OVCA2* na 17p, ktorý bol inaktivovaný zlomom, nesie tumor-supresorový gén, podieľajúci sa na rozvoji rakoviny, najmä vaječníkov (Chen 2005). Inaktivácia jednej kópie tohto lokusu vo všetkých bunkách pacientky môže pre ňu predstavovať vyššie riziko rozvoja rakoviny v budúcnosti. Na 17q došlo k prerušeniu génu *CSNK1D*. Mutácie v tomto géne boli nájdené u autozomálne dominantného syndrómu FASPS (familial advanced sleep-phase syndrome) (Xu 2005). Naša pacientka nevykazovala žiadne abnormality v cirkadiánnom rytme alebo spánkových návykoch. Je ale možné, že missense mutácie popísané v literatúre pôsobia mechanizmom "gain-of-function", a znížené množstvo proteínu sa neprejaví (Havlovicova 2007).

Pacienti s deléciou zasahujúcou do oblasti Miller-Diekerovho lokusu na 17p13.3 majú lisencefáliu, viaceré dysmorfické črty, ťažkú mentálnu retardáciu a kratšiu dĺžku života. Pacienti ako naša pacientka 1, ktorí nemajú túto oblasť deletovanú, majú miernejší fenotyp s ľahkou mentálnou retardáciou, záchvatmi, retardáciou rastu, miernou dysmorfiou a zmenami v kožnej pigmentácii (Shashi 2003). Avšak niektoré gény z 17p13.3, vrátane tých, ktoré sú deletované u našej pacientky, môžu prispieť k ďalším klinickým príznakom Miller-Diekerovho syndrómu, vrátane dysmorfických črt tváre, pokiaľ sú deletované spolu s génom *LISI* (Cardoso 2003). Toto sa môže týkať aj génov *ABR*, *YWHAE*, *CRK*, *MYO1C*, *SKIP*, *PITPNA*, *SCARF1*, *PRPF8*, *SERPINF1* a ďalších (Cardoso 2003). Podľa funkčných štúdií sú niektoré z nich, napr. *YWHAE* (s jeho funkciou vo vývoji a migrácii neurónov), dobrými kandidátmi na vysvetlenie psychiatrických a neurologických príznakov pozorovaných u našej pacientky.

Ukazuje sa takisto, že heterozygotné delécie 17p13.3 distálne od a vrátane génu *ABR*, neboli spojené so žiadnym zjavným fenotypom (Martin 2002; Cardoso 2003). Tento región predstavuje približne jednu polovicu z 1,9 Mb delécie na 17p našej pacientky. Ďalší popísaní pacienti mali väčšie delécie 17p13.3 v dôsledku rôznych nebalancovaných translokácií a môžu teda predstavovať zložené fenotypy vzhľadom na aberáciu oboch zúčastnených chromozómov (Mutchinick 1999; Cardoso 2003). Rozsah delécie na 17p bol v jednom prípade podobný ako u našej pacientky a čiastočne sa prekrýval aj fenotyp (mentálna retardácia a dysmorfická tvár - vysoké čelo, bitemporálne zúženie, tenká horná pera) (Mutchinick 1999).

Boli popísaní aj dvaja pacienti s heterozygotnými deléciami terminálnej oblasti 17q. Prvý trpel miernou MR, kardiopatiou a extrémnou štíhlosťou (Rossi 2001). Druhý pacient s nevyváženou translokáciou t(12,17) mal ťažší fenotyp, ktorý zahŕňal autistické rysy, ale v tomto prípade mohli byť príznaky spôsobené ako monozómiou 17qter, tak aj trizómiou 12qter (de Vries 2003). Oblasť 17q deletovaná u našej pacientky nesie gén *RTN4RL1* exprimovaný v mozgu a potrebný pre vytváranie neurónových signalizačných komplexov a reguláciu regenerácie a plasticity axónov (Pignot 2003). Jeho paralógny gén *RTN4R* môže byť spojený so schizofréniou (Sinibaldi 2004). Terminálna oblasť 17q obsahuje aj gén *RAB40B* exprimovaný v mozgu a zapojený do bunkovej signalizácie, a gén *TBCD* exprimovaný v mozgu a spojený so syndrómom Gilles de la Tourette (Paschou 2004), ktorý sa fenotypicky dosť prekrýva s autizmom (Comings 1991).

Okrem možného negatívneho účinku haploinsuficiencie deletovaných génov alebo prípadných recesívnych mutácií odhalených v nedeletovanej alele sa do fenotypu pacientky 1 mohol zapojiť aj ďalší mechanizmus, imprinting. Pacientka je nositeľkou len jednej, maternálnej kópie génov z terminálnych oblastí chromozómu 17. Rio (2001) popísal maternálne imprintovaný región 17q25, ktorý sa prekrýva s našim, ale je výrazne väčší ako deletovaný segment našej pacientky. Medzi deletovanými génmi sme nenašli žiadne imprintované alebo potenciálne imprintované kandidátne gény, čiže tie môžu byť umiestnené proximálne od našej delécie.

Záverom k diskusii fenotypu a zasiahnutých génov pacientky 1 je možno povedať, že jej klinické a laboratórne nálezy naznačujú, že hoci niektoré pozorované fenotypové črty môžu byť nešpecifickým vyjadrením „syndrómu kruhového chromozómu“, jej diagnóza NF1 pravdepodobne špecificky súvisí s mozaikovou

monozómiou chromozómu 17 a stratou jednej kópie génu *NFI*. Tento mechanizmus, pri ktorom je nutné uvažovať o všetkých génoch lokalizovaných na chromozóme 17, môže hrať úlohu aj v rozvoji ďalších príznakov vrátane autizmu (Havlovicova 2007). A to samozrejme rozuzlenie genetickej podmienenosti jej fenotypu ďalej komplikuje.

Naša podrobná analýza ukázala podobne komplikované a neočakávané vzťahy aj u našej pacientky 2 so syndrómom fragilného chromozómu X a deléciou Xp. Najprv bola nálezom plnej mutácie v géne *FMRI* potvrdená jej diagnóza FXS. Defekt génu *FMRI* v rodine bol v súlade s výskytom POF alebo tremoru u niekoľkých príbuzných. Neočakávané odhalenie metylácie oboch aliel *FMRI* bolo potom vysvetlené nálezom delécie na Xp a preferenčnej inaktívácie paternálneho chromozómu X nesúceho normálnu alelu *FMRI*. To je v súlade s pozorovaniami iných, že prestavby chromozómu X môžu spôsobovať nevyváženú X-inaktíváciu (Wolff 2000). Tá je pravdepodobne spôsobená selekciou proti bunkám neexprimujúcim deletované gény.

Stav génu *FMRI* u tejto pacientky tak mohol pripomínať situáciu u mužských nositeľov plnej mutácie. Jedna z jej aliel *FMRI* bola umlčaná metyláciou vďaka expanzii repetície CGG a druhá (normálna) alela bola umlčaná nenáhodnou X-inaktíváciou. Klinický prejav FXS u žien je v porovnaní s mužmi obvykle menej závažný, ale 71% z nich má IQ pod 85, a 50% pod 70, v závislosti na stupni X-inaktívácie (de Vries 1996). Dievča s plnou mutáciou vo *FMRI* a inaktíváciou normálnej alely dôsledkom familiárneho posunu X-inaktívácie neznámej etiológie vykazovalo vo veku 16 rokov mnoho z príznakov FXS typických pre mužov, ako je dlhá úzka tvár, vyčnievajúce uši a čeľuste, hyperextenzibilita kĺbov, plachosť a ťažká mentálna retardácia (Heine-Suner 2003). Podobná korelácia medzi X-inaktíváciou a mentálnou retardáciou (ale nie ďalšími črtami FXS) bola pozorovaná u ženských jednovaječných dvojčiat s plnou mutáciou vo *FMRI* (Willemssen 2000). Naša pacientka mala iba miernu mentálnu retardáciu a žiadne fyzické vlastnosti typické pre chlapcov s FXS. Vývoj typických črt v tvári ale nastáva neskôr, až na začiatku puberty.

Aj fenotyp pacientky 2 mohlo ovplyvniť niekoľko ďalších genetických mechanizmov. Sama nevyváženosť X-inaktívácie by mohla odhaliť prípadné X-viazané recesívne mutácie, avšak pacientka nevykazovala žiadne príznaky iných známych X-viazaných porúch. Takisto delécia mnohých génov z oblasti Xp by mohla prispieť k fenotypu, hoci inaktívacia tohto chromozómu pravdepodobne obmedzuje jej vplyv.

Boli popísané viaceré ženy s deléciami v oblasti Xp, pričom väčšina z nich mala terminálne delécie (vrátane pseudoautozomálneho regiónu s génom *SHOX*, delécia ktorého spôsobuje nízky vzrast) a len malá časť mala intersticiálne delécie (James 1998; Ogata 2001; Lachlan 2006). U štyroch žien s deléciou čiastočne sa prekrývajúcou s deléciou u našej pacientky (ale tiež zahŕňajúcu časť z pseudoautozomálneho regiónu) sa zistila fenotypová variabilita nevysvetliteľná rôznou X-inaktiviáciou (Chocholska 2006). Niektoré klinické znaky ako strabizmus a široké ruky mala tiež naša pacientka. Iná pacientka trpiaca syndrómom MLS (microphthalmia with linear skin defects syndrome) mala 3 Mb deléciu plne obsiahnutú v delécii našej pacientky (Morleo 2005).

Delécia u našej pacientky 2 obsahovala 6 génov podliehajúcich X-inaktiviácii, ktoré spôsobujú X-viazané dominantné poruchy (*HCCS* - MLS, *NHS* - Nance-Horanov syndróm, *CDKL5* - predčasná infantilná epileptická encefalopatia 2, *PDHAI* – deficit pyruvát dekarboxylázy, *RPS6KA3* - Coffin-Lowryho syndróm, *PHEX* - hypofosfatemická rachitída). Možno je ešte viac zaujímavé, že delécia obsahovala asi 20 génov, u ktorých sa potvrdilo (alebo je podozrenie), že unikajú X-inaktiviácii (Carrel 2005; Carrel 2006; Wang 2006). Pacientka 2 by teda mohla trpieť ich zníženou génovou dávkou. Medzi tieto gény patrí aj gén *OFDI*, ktorý je zodpovedný za X-viazaný dominantný oral-facial-digital syndróm typu 1. Podobne ako iné ženy s veľkými deléciami Xp (James 1998; Ogata 2001; Lachlan 2006), ani naša pacientka nevykazovala žiadne príznaky týchto porúch. Hoci niektoré z týchto ochorení sú spôsobené stratovými mutáciami, ich symptómy u žien môžu byť ovplyvnené vzájomnou súhrou medzi zvyškovou expresiou skráteneho či zmeneného proteínu, rôznymi X-inaktivačnými vzorcami indukovanými rozličnými genetickými defektmi, variabilnou X-inaktiviáciou podľa obdobia vývinu a podľa typu buniek a prítomnosťou línií, kde sú práve tieto mutované alely aktívne v tkanivách dôležitých pre vývin (James 1998; Ferrante 2001; Wimplinger 2006).

Chromozomálne prestavby môžu viesť aj k pozičnému efektu, a jeden zlom u našej pacientky 2 bol umiestnený v blízkosti génov *NLGN4* a *VCX3A*, ktoré sú spájané s autizmom a mentálnou retardáciou (Macarov 2007; Zhang 2009). Vzhľadom na inaktiviáciu deletovaného chromozómu X to ale nemusí mať žiadny význam. Napokon by okrem toho mohol vo fenotype pacientky zohrávať úlohu aj genomický imprinting, keďže jej paternálny chromozóm X bol takmer kompletne inaktivovaný.



Záverom k diskusii fenotypu a zasiahnutých génov pacientky 2 je možno povedať, že hoci by sa u nej mohol očakávať komplexný fenotyp v dôsledku súčasného výskytu dvoch defektov na oboch jej chromozómoch X, nevyvážená X-inaktivácia pravdepodobne viedla iba k miernemu klinickému obrazu, obmedzenému hlavne na jej pozoruhodný behaviorálny fenotyp. Autizmus je často spojený s FXS, najmä u chlapcov, ale aj u dievčat. Prevalencia sa pohybuje od 26% chlapcov a 6% dievčat s FXS (a diagnózou autizmu podľa škály CARS) (Hatton 2006), po 18% mužov a 10% žien s FXS (s použitím ADOS-G a ADI-R) (Clifford 2007). Väčšina príznakov u našej pacientky 2 je teda pravdepodobne výsledkom defektu *FMR1*.

V záujme maximálnej objektívnosti treba zdôrazniť, že nie je nespochybniteľný dôkaz kauzality nájdených genetických defektov pre autizmus a mentálnu retardáciu u našich pacientok. Keďže sú tieto fenotypy v populácii relatívne časté, mohli by byť spôsobené inými faktormi (aj vonkajšími) a ich výskyt spolu s genetickým defektom by mohol predstavovať iba náhodnú koincidiu. V tejto práci predkladáme dôvody, prečo považujeme nájdené defekty za kauzálne. Podporu kauzality by mohlo poskytnúť nájdenie ďalších podobných prípadov (preto naše pozorovania publikujeme), spoločné dedenie genotypov a fenotypov v rodinách našich pacientok (nepravdepodobné ak sú to *de novo* aberácie) alebo funkčné štúdie individuálnych génov (náročné a nie plne reflektujúce komplexnosť genetických defektov).

Naše analýzy dovoľujú aj špekulácie ohľadne mechanizmu vzniku študovaných aberácií. Obecne môžu chromozomálne prestavby vzniknúť dvomi základnými spôsobmi: nealelickou homologickou rekombináciou (non-allelic homologous recombination, NAHR) a nehomologickým spájaním koncov (non-homologous end joining, NHEJ) (Lupski 2005). Hlavným rozdielom medzi nimi je prítomnosť podobných sekvencií (často repetícií) na zlomoch aberácie v prípade NAHR. Tieto repetície sú zároveň príčinou, že sa mechanizmus NAHR často podieľa na vzniku rekurentných prestavieb. Na vzniku unikátnych prestavieb sa môžu rovnako podieľať NAHR aj NHEJ (Lupski 2005). Niektorí autori diskutujú aj o rôznych sekvenčných motívoch v okolí zlomov chromozomálnych prestavieb, ako napríklad segmentoch bohatých na puríny a pyrimidíny (Abeysinghe 2003). Problém týchto motívov je v tom, že sú často mnohonásobne degenerované, a je možné ich nájsť v akejkoľvek oblasti genómu, vrátane susedstva delečných alebo translokačných zlomov.

Kruhové chromozómy vznikajú dvoma hlavnými mechanizmami: vyššie opísaným postupom so zlomami na oboch ramienkach a následným spojením oboch koncov (čo je spojené so stratou genetického materiálu), alebo spojením oboch telomér za účasti telomerických alebo subtelomerických repetícií (s vytvorením kompletného kruhu) (Sigurdardottir 1999). Jedna novšia štúdia predpokladá, že vytváranie kruhového chromozómu prebieha cez dicentrické intermediáty za účasti vnútorných invertovaných duplikácií a terminálnych delécií (Knijnenburg 2007). Kruhový chromozóm 17 u našej pacientky 1 neobsahuje invertované duplikácie, a preto jeho vznik prostredníctvom dicentrického intermediátu je nepravdepodobný. Podobne ako u iných nerekurentných aberácií sa ani u pacientky 1 nenašli žiadne dôkazy pre priame zapojenie repetíc (low-copy alebo rozptýlených repetícií triedy SINE, LINE, LTR alebo DNA transpozónov) do vzniku zlomov. Repetície môžu byť často lokalizované v širšom okolí aberácie (Le Guedard 2007), ale nie je isté, či sa tieto vzdialené repetície podieľajú na rekombinácii. Našli sme krátku mikrohomológiu 3 bp (GGA) v spojení 17p-17q, rovnako ako aj u blízkej *de novo* 1 kb delécie (GCC), podobne ako to bolo u iných prestavieb, napr. v duplikáciách génu *PLP1* (Woodward 2005), v deléciách *DMD* (McNaughton 1998; Toffolatti 2002; Sironi 2003), *GLRA1* (Becker 2006), *PCDH15* (Le Guedard 2007) alebo u recipročnej translokácie (Gribble 2007). Táto mikrohomológia môže byť znakom nepresného mechanizmu NHEJ, podobne ako *de novo* 1 kb delécia nájdená u spojenia 17p-17q. Táto delécia je veľmi zaujímavá aj prakticky. Takáto nenápadná prestavba môže ľahko uniknúť detekcii, ale môže ovplyvniť ďalšie gény a prispieť k fenotypu pacienta. Z technického hľadiska sa tak môžu vysvetliť zlyhania pokusov preklenúť metódou PCR aj dobre zmapované delečné zlomy u niektorých pacientov, ktoré sú popísané v publikáciách (Woodward 2005; Le Guedard 2007). Zároveň to môže naznačiť komplexnejšiu štruktúru prestavby, podobne ako aj v našom prípade.

Mechanizmus NHEJ sa pravdepodobne podieľal aj na vzniku veľkej delécie Xp u pacientky 2. Svedčili pre to opäť charakteristické molekulárne črty vrátane absencie homológie a podobných repetíc na delečných zlomoch, ako aj tri nukleotidy pridané v rámci nepresnosti v spojení zlomov. V oblasti Xp22.31 boli popísané rekurentné delécie spôsobujúce ichtyózu a mentálnu retardáciu zapríčinené NAHR medzi low-copy repetíciami (Van Esch 2005). Delécia našej pacientky 2 tieto repetície nevyužíva, a možno aj preto je unikátna.

## 6. ZÁVER

Táto práca je zameraná na problematiku autizmu, ktorý postihuje 1/150 až 1/1000 detí a je charakterizovaný poruchami v sociálnom správaní, komunikácii a obmedzenými záujmami. Je to ochorenie s preukázaným výrazným genetickým komponentom, ale doteraz neobjasnenou etiológiou. V súčasnosti prebieha veľa štúdií snažiacich sa prispieť k pochopeniu tejto komplexnej poruchy. V oblasti molekulárnej genetiky sa tieto štúdie zameriavajú na génové a chromozomálne defekty a rôzne genetické a epigenetické mechanizmy, ktoré by mohli hrať úlohu v patogenéze autizmu.

V našej práci sme sa pokúsili zreplikovať nájdenú asociáciu rizikovej alely *ADA\*2* u pacientov s autizmom na súbore 385 českých detí, ktorý bol väčší ako boli súbory pôvodne publikované a so zameraním na jednotlivé endofenotypy (podtypy autizmu, stupne mentálnej retardácie a komorbidity). Naše výsledky asociáciu autizmu s alelou *ADA\*2* nepotvrdili ani v kompletnom súbore, ani v žiadnej jeho podmnožine.

Jedným z opakovaných nálezov u časti pacientov s autizmom sú aj chromozomálne zmeny. Prevedli sme detailné analýzy prestavieb chromozómov 17 a X u dvoch pacientok s autizmom. Tieto štúdie predstavujú pred pár rokmi nemysliteľné prepojenie klasickej cytogenetiky s molekulárnou genetikou na úrovni sekvencie DNA. Ako prví na svete sme popísali detailnú štruktúru ľudského kruhového chromozómu. Molekulárna charakterizácia genetických defektov u pacientok nám umožnila špekulovať o vplyve zúčastnených génov na ich fenotypy. Oba tieto pilotné projekty sa sústredili na relatívne veľké aberácie postihujúce niekoľko desiatok génov, čo nám neumožnilo dokázať kauzalitu individuálnych génov. Dôkladná analýza ale odкрыla obrovskú a nečakanú komplexnosť oboch prípadov, ktorá zahŕňala okrem iného aj mozaicismus alebo nevyváženú X-inaktiváciu.

Práca takisto jasne ukázala potenciál nových metód. Array-CGH o vysokom rozlíšení je nesmierne účinným prístupom ku klonovaniu zlomov v chromozomálnych prestavbách so zmenou množstva genetického materiálu, v modifikácii array-painting i v balancovaných prestavbách. Podrobná analýza umožňuje identifikáciu postihnutých génov, koreláciu ich možného vzťahu s fenotypom pacientov a špekulácie o mechanizmoch vedúcich k prestavbe.

## 7. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN. 2003. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 22:229-244.
- Abrahams BS, Geschwind DH. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9:341-355.
- Akbarian S, Huang HS. 2009. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry* 65:198-203.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51:1229-1239.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT a ďalší. 1999. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* 83:322-325.
- APA. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E a ďalší. 2002. A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet* 71:777-790.
- Bailey A, Bolton P, Butler L, Le Couteur A, Murphy M a ďalší. 1993. Prevalence of the fragile X anomaly amongst autistic twins and singletons. *J Child Psychol Psychiatry* 34:673-688.
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E a ďalší. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25:63-77.
- Bailey A, Palferman S, Heavey L, Le Couteur A. 1998. Autism: the phenotype in relatives. *J Autism Dev Disord* 28:369-392.
- Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T a ďalší. 2006. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). *Lancet* 368:210-215.
- Barbarese WJ, Katusic SK, Colligan RC, Weaver AL, Jacobsen SJ. 2005. The incidence of autism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1997: results from a population-based study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 159:37-44.
- Battistuzzi G, Iudicone P, Santolamazza P, Petrucci R. 1981. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. *Ann Hum Genet* 45:15-19.
- Bauman ML, Kemper TL. 2005. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 23:183-187.
- Benvenuto A, Moavero R, Alessandrelli R, Manzi B, Curatolo P. 2009. Syndromic autism: causes and pathogenetic pathways. *World J Pediatr* 5:169-176.

- Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M a d'alší. 2001. Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics* 108:1155-1161.
- Bilder D, Pinborough-Zimmerman J, Miller J, McMahon W. 2009. Prenatal, perinatal, and neonatal factors associated with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 123:1293-1300.
- Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M a d'alší. 2001. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. *Neurogenetics* 3:111-113.
- Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI a d'alší. 2009. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. *PLoS Genet* 5:e1000536.
- Burgess NK, Sweeten TL, McMahon WM, Fujinami RS. 2006. Hyperserotoninemia and altered immunity in autism. *J Autism Dev Disord* 36:697-704.
- Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C a d'alší. 2006. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16834-16839.
- Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, Persico AM, Levitt P. 2008. Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Res* 1:159-168.
- Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J a d'alší. 2003. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* 72:918-930.
- Carrel L, Willard HF. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400-404.
- Carrel L, Park C, Tyekucheva S, Dunn J, Chiaromonte F a d'alší. 2006. Genomic environment predicts expression patterns on the human inactive X chromosome. *PLoS Genet* 2:e151.
- Casanova MF. 2007. The neuropathology of autism. *Brain Pathol* 17:422-433.
- Castermans D, Wilquet V, Steyaert J, Van de Ven W, Fryns JP a d'alší. 2004. Chromosomal anomalies in individuals with autism: a strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism* 8:141-161.
- Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK a d'alší. 2007. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *J Autism Dev Disord* 37:738-747.
- Comings DE, Comings BG. 1991. Clinical and genetic relationships between autism-pervasive developmental disorder and Tourette syndrome: a study of 19 cases. *Am J Med Genet* 39:180-191.
- Conroy J, Meally E, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M a d'alší. 2004. Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. *Mol Psychiatry* 9:587-593.

- Constantino JN, Lajonchere C, Lutz M, Gray T, Abbacchi A a d'alší. 2006. Autistic social impairment in the siblings of children with pervasive developmental disorders. *Am J Psychiatry* 163:294-296.
- Cook EH, Jr., Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S a d'alší. 1997. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* 2:247-250.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL. 2001. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 3:359-371.
- Croen LA, Grether JK, Hoogstrate J, Selvin S. 2002. The changing prevalence of autism in California. *J Autism Dev Disord* 32:207-215.
- de Krom M, Staal WG, Ophoff RA, Hendriks J, Buitelaar J a d'alší. 2009. A common variant in DRD3 receptor is associated with autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 65:625-630.
- de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ a d'alší. 1996. Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 58:1025-1032.
- de Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40:385-398.
- Dutta S, Sinha S, Ghosh S, Chatterjee A, Ahmed S a d'alší. 2008. Genetic analysis of reelin gene (RELN) SNPs: no association with autism spectrum disorder in the Indian population. *Neurosci Lett* 441:56-60.
- Endo A, Uesato T, Minato M, Takada M, Takahashi S a d'alší. 1999. Ring chromosome 17 syndrome with monosomy 17 mosaicism: case report and literature review. *Acta Paediatr* 88:1040-1043.
- Evans HK, Wylie AA, Murphy SK, Jirtle RL. 2001. The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11.2. *Genomics* 77:99-104.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K a d'alší. 2008. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res* 99:56-70.
- Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Abu-Odeh D, Mori S a d'alší. 2009a. Abnormal expression of myelination genes and alterations in white matter fractional anisotropy following prenatal viral influenza infection at E16 in mice. *Schizophr Res* 112:46-53.
- Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Huang H, Oishi K a d'alší. 2009b. Prenatal viral infection of mice at E16 causes changes in gene expression in hippocampi of the offspring. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:648-653.
- Ferrante MI, Giorgio G, Feather SA, Bulfone A, Wright V a d'alší. 2001. Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* 68:569-576.
- Folstein S, Rutter M. 1977. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 18:297-321.
- Fombonne E. 1998. The epidemiology of child and adolescent psychiatric disorders: recent developments and issues. *Epidemiol Psichiatr Soc* 7:161-166.

- Fombonne E. 2002. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 2:S4-6.
- Fombonne E. 2005. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 66 Suppl 10:3-8.
- Fombonne E, Zakarian R, Bennett A, Meng L, McLean-Heywood D. 2006. Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations. *Pediatrics* 118:e139-150.
- Fombonne E. 2009. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res* 65:591-598.
- Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J a d'alší. 1997. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 52:283-294.
- Freitag CM. 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 12:2-22.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS a d'alší. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-1058.
- Geschwind DH, Sowinski J, Lord C, Iversen P, Shestack J a d'alší. 2001. The autism genetic resource exchange: a resource for the study of autism and related neuropsychiatric conditions. *Am J Hum Genet* 69:463-466.
- Gillberg C, Wing L. 1999. Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatr Scand* 99:399-406.
- Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, Zeijlon L. 2006. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* 36:429-435.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE a d'alší. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459:569-573.
- Goldberg J, Szatmari P, Nahmias C. 1999. Imaging of autism: lessons from the past to guide studies in the future. *Can J Psychiatry* 44:793-801.
- Gribble SM, Kalaitzopoulos D, Burford DC, Prigmore E, Selzer RR a d'alší. 2007. Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing. *J Med Genet* 44:51-58.
- Guhathakurta S, Singh AS, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S a d'alší. 2009. Analysis of serotonin receptor 2A gene (HTR2A): Association study with autism spectrum disorder in the Indian population and investigation of the gene expression in peripheral blood leukocytes. *Neurochem Int*.
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J a d'alší. 1997. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278:51-57.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R a d'alší. 2001. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57:127-130.

- Hagerman RJ, Ono MY, Hagerman PJ. 2005. Recent advances in fragile X: a model for autism and neurodegeneration. *Curr Opin Psychiatry* 18:490-496.
- Hatton DD, Sideris J, Skinner M, Mankowski J, Bailey DB, Jr. a d'alší. 2006. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am J Med Genet A* 140A:1804-1813.
- Havlovicova M, Novotna D, Kocarek E, Novotna K, Bendova S a d'alší. 2007. A girl with neurofibromatosis type 1, atypical autism and mosaic ring chromosome 17. *Am J Med Genet A* 143:76-81.
- Hayward BE, Kamiya M, Strain L, Moran V, Campbell R a d'alší. 1998. The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10038-10043.
- Heine-Suner D, Torres-Juan L, Morla M, Busquets X, Barcelo F a d'alší. 2003. Fragile-X syndrome and skewed X-chromosome inactivation within a family: a female member with complete inactivation of the functional X chromosome. *Am J Med Genet A* 122A:108-114.
- Hettinger JA, Liu X, Holden JJ. 2008. The G22A polymorphism of the ADA gene and susceptibility to autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 38:14-19.
- Hirschhorn R, Yang DR, Israni A. 1994. An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme): occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann Hum Genet* 58:1-9.
- Honda H, Shimizu Y, Imai M, Nitto Y. 2005. Cumulative incidence of childhood autism: a total population study of better accuracy and precision. *Dev Med Child Neurol* 47:10-18.
- Hrdlicka M, Komarek V. 2004. Dětský autismus: přehled současných poznatků. Praha: Portál.
- Huang CH, Santangelo SL. 2008. Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:903-913.
- Hughes JR. 2007. Autism: the first firm finding = underconnectivity? *Epilepsy Behav* 11:20-24.
- Chakrabarti S, Fombonne E. 2005. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry* 162:1133-1141.
- Chen CM, Behringer RR. 2005. OVCA1: tumor suppressor gene. *Curr Opin Genet Dev* 15:49-54.
- Chocholska S, Rossier E, Barbi G, Kehrer-Sawatzki H. 2006. Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *Am J Med Genet A* 140:604-610.
- Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S a d'alší. 2008. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 63:1111-1117.
- Icasiano F, Hewson P, Machet P, Cooper C, Marshall A. 2004. Childhood autism spectrum disorder in the Barwon region: a community based study. *J Paediatr Child Health* 40:696-701.



- IMGSAC. 2001. A genomewide screen for autism: strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet* 69:570-581.
- Jackson PB, Boccuto L, Skinner C, Collins JS, Neri G a d'alší. 2009. Further evidence that the rs1858830 C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Res* 2:232-236.
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V a d'alší. 2006. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* 43:843-849.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. 2007. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* 6:45-55.
- James RS, Coppin B, Dalton P, Dennis NR, Mitchell C a d'alší. 1998. A study of females with deletions of the short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 102:507-516.
- Kakinuma H, Sato H. 2008. Copy-number variations associated with autism spectrum disorder. *Pharmacogenomics* 9:1143-1154.
- Kanner L. 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2:217-250
- Kent WJ. 2002. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12:656-664.
- Kielinen M, Linna SL, Moilanen I. 2000. Autism in Northern Finland. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 9:162-167.
- Kim SJ, Cox N, Courchesne R, Lord C, Corsello C a d'alší. 2002. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. *Mol Psychiatry* 7:278-288.
- Klauck SM, Poustka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A. 1997. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum Mol Genet* 6:2233-2238.
- Knight SJ, Flint J. 2000. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37:401-409.
- Knijnenburg J, van Haeringen A, Hansson KB, Lankester A, Smit MJ a d'alší. 2007. Ring chromosome formation as a novel escape mechanism in patients with inverted duplication and terminal deletion. *Eur J Hum Genet* 15:548-555.
- Kosztolanyi G. 1987. Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75:174-179.
- Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C a d'alší. 2008. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 17:628-638.
- Kumar RA, Christian SL. 2009. Genetics of autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:188-197.
- Lachlan KL, Youings S, Costa T, Jacobs PA, Thomas NS. 2006. A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet* 118:640-651.

- Lauritsen MB, Pedersen CB, Mortensen PB. 2004. The incidence and prevalence of pervasive developmental disorders: a Danish population-based study. *Psychol Med* 34:1339-1346.
- Le Guedard S, Faugere V, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. 2007. Large genomic rearrangements within the PCDH15 gene are a significant cause of USH1F syndrome. *Mol Vis* 13:102-107.
- Li H, Li Y, Shao J, Li R, Qin Y a d'alší. 2008. The association analysis of RELN and GRM8 genes with autistic spectrum disorder in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:194-200.
- Li J, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich L, Spiker D a d'alší. 2004. Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 126B:51-57.
- Li SY, Chen YC, Lai TJ, Hsu CY, Wang YC. 1993. Molecular and cytogenetic analyses of autism in Taiwan. *Hum Genet* 92:441-445.
- Lingam R, Simmons A, Andrews N, Miller E, Stowe J a d'alší. 2003. Prevalence of autism and parentally reported triggers in a north east London population. *Arch Dis Child* 88:666-670.
- Liu J, Nyholt DR, Magnussen P, Parano E, Pavone P a d'alší. 2001. A genomewide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 69:327-340.
- Liu XQ, Paterson AD, Szatmari P. 2008. Genome-wide linkage analyses of quantitative and categorical autism subphenotypes. *Biol Psychiatry* 64:561-570.
- Longo D, Schuler-Faccini L, Brandalize AP, dos Santos Riesgo R, Bau CH. 2009. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Res* 1267:9-17.
- Lopez-Rangel E, Lewis ME. 2006. Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* 69:21-22.
- Lord C, Rutter M, Le Couteur A. 1994. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 24:659-685.
- Losh M, Sullivan PF, Trembath D, Piven J. 2008. Current developments in the genetics of autism: from phenome to genome. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:829-837.
- Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A a d'alší. 2003. Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J Med Genet* 40:690-696.
- Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL. 2005. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 15:875-884.
- Lupski JR, Stankiewicz P. 2005. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 1:e49.

- Ma D, Salyakina D, Jaworski JM, Konidari I, Whitehead PL a d'alší. 2009. A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. *Ann Hum Genet* 73:263-273.
- Macarov M, Zeigler M, Newman JP, Strich D, Sury V a d'alší. 2007. Deletions of VCX-A and NLGN4: a variable phenotype including normal intellect. *J Intellect Disabil Res* 51:329-333.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L a d'alší. 2008. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82:477-488.
- Martin CL, Waggoner DJ, Wong A, Uhrig S, Roseberry JA a d'alší. 2002. "Molecular rulers" for calibrating phenotypic effects of telomere imbalance. *J Med Genet* 39:734-740.
- McNaughton JC, Cockburn DJ, Hughes G, Jones WA, Laing NG a d'alší. 1998. Is gene deletion in eukaryotes sequence-dependent? A study of nine deletion junctions and nineteen other deletion breakpoints in intron 7 of the human dystrophin gene. *Gene* 222:41-51.
- Miller MT, Stromland K, Ventura L, Johansson M, Bandim JM a d'alší. 2005. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. *Int J Dev Neurosci* 23:201-219.
- Minshew NJ, Williams DL. 2007. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol* 64:945-950.
- Morleo M, Pramparo T, Perone L, Gregato G, Le Caignec C a d'alší. 2005. Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization of 11 cases. *Am J Med Genet A* 137:190-198.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. 2004. The genetics of autism. *Pediatrics* 113:e472-486.
- Mutchinick OM, Shaffer LG, Kashork CD, Cervantes EI. 1999. Miller-Dieker syndrome and trisomy 5p in a child carrying a derivative chromosome with a microdeletion in 17p13.3 telomeric to the LIS1 and the D17S379 loci. *Am J Med Genet* 85:99-104.
- Nishiwaki T, Hirano M, Kumazawa M, Ueno S. 2005. Mosaicism and phenotype in ring chromosome 20 syndrome. *Acta Neurol Scand* 111:205-208.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. 2001. *Genetics in Medicine*. Philadelphia: Saunders: Thompson & Thompson. 350 p.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D a d'alší. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1097-1102.
- Ogata T, Muroya K, Matsuo N, Shinohara O, Yorifuji T a d'alší. 2001. Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5498-5508.
- Orsmond GI, Seltzer MM. 2007. Siblings of individuals with autism spectrum disorders across the life course. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13:313-320.
- Pardo CA, Eberhart CG. 2007. The neurobiology of autism. *Brain Pathol* 17:434-447.

- Paschou P, Feng Y, Pakstis AJ, Speed WC, DeMille MM a d'alší. 2004. Indications of linkage and association of Gilles de la Tourette syndrome in two independent family samples: 17q25 is a putative susceptibility region. *Am J Hum Genet* 75:545-560.
- Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R a d'alší. 2000. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: case-control and family-based association studies. *Am J Med Genet* 96:784-790.
- Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R a d'alší. 2001. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry* 6:150-159.
- Peters J, Beechey C. 2004. Identification and characterisation of imprinted genes in the mouse. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2:320-333.
- Petit P, Koulischer L. 1971. [Study of a 46,XX-46,XX,17r mosaicism]. *Ann Genet* 14:55-58.
- Pignot V, Hein AE, Barske C, Wiessner C, Walmsley AR a d'alší. 2003. Characterization of two novel proteins, NgrRH1 and NgrRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem* 85:717-728.
- Piven J, Palmer P, Jacobi D, Childress D, Arndt S. 1997. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry* 154:185-190.
- Powell JE, Edwards A, Edwards M, Pandit BS, Sungum-Paliwal SR a d'alší. 2000. Changes in the incidence of childhood autism and other autistic spectrum disorders in preschool children from two areas of the West Midlands, UK. *Dev Med Child Neurol* 42:624-628.
- Ramos N, Reichert JG, Corwin TE, Smith CJ, Silverman JM a d'alší. 2006. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol Psychiatry* 60:186-191.
- Rapin I, Tuchman RF. 2008. What is new in autism? *Curr Opin Neurol* 21:143-149.
- Raynham H, Gibbons R, Flint J, Higgs D. 1996. The genetic basis for mental retardation. *QJM* 89:169-175.
- Reddy KS. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet* 6:3.
- Rio M, Ozilou C, Cormier-Daire V, Turleau C, Prieur M a d'alší. 2001. Partial maternal heterodisomy of chromosome 17q25 in a case of severe mental retardation. *Hum Genet* 108:511-515.
- Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D a d'alší. 1999. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 65:493-507.
- Roohi J, Montagna C, Tegay DH, Palmer LE, DeVincent C a d'alší. 2009. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J Med Genet* 46:176-182.
- Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D a d'alší. 2001. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38:417-420.

- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberle I, Mandel JL. 1992. On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 43:197-207.
- Rutter M, Silberg J, O'Connor T, Simonoff E. 1999. Genetics and child psychiatry: II Empirical research findings. *J Child Psychol Psychiatry* 40:19-55.
- Saccucci P, Arpino C, Rizzo R, Gagliano A, Volzone A a d'alší. 2006. Association of adenosine deaminase polymorphism with mild mental retardation. *J Child Neurol* 21:753-756.
- Sadock BJ, Sadock VA. 1999. Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sakurai T, Reichert J, Hoffman EJ, Cai G, Jones HB a d'alší. 2008. A large-scale screen for coding variants in SERT/SLC6A4 in autism spectrum disorders. *Autism Res* 1:251-257.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C a d'alší. 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316:445-449.
- Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL a d'alší. 2002. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. *Am J Med Genet* 114:99-105.
- Shashi V, White JR, Pettenati MJ, Root SK, Bell WL. 2003. Ring chromosome 17: phenotype variation by deletion size. *Clin Genet* 64:361-365.
- Schanen NC. 2006. Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2:R138-150.
- Schinzel A, Niedrist D. 2001. Chromosome imbalances associated with epilepsy. *Am J Med Genet* 106:119-124.
- Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K. 1980. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord* 10:91-103.
- Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW a d'alší. 1999. Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet* 87:384-390.
- Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T a d'alší. 2008. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47:921-929.
- Sinibaldi L, De Luca A, Bellacchio E, Conti E, Pasini A a d'alší. 2004. Mutations of the Nogo-66 receptor (RTN4R) gene in schizophrenia. *Hum Mutat* 24:534-535.
- Sironi M, Pozzoli U, Cagliani R, Giorda R, Comi GP a d'alší. 2003. Relevance of sequence and structure elements for deletion events in the dystrophin gene major hot-spot. *Hum Genet* 112:272-288.
- Skaar DA, Shao Y, Haines JL, Stenger JE, Jaworski J a d'alší. 2005. Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Mol Psychiatry* 10:563-571.
- Smalley SL, Asarnow RF, Spence MA. 1988. Autism and genetics. A decade of research. *Arch Gen Psychiatry* 45:953-961.

- Sousa I, Clark TG, Toma C, Kobayashi K, Choma M a ďalší. 2009. MET and autism susceptibility: family and case-control studies. *Eur J Hum Genet* 17:749-758.
- Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC a ďalší. 1989. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry* 30:405-416.
- Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102, 1104.
- Stubbs G, Litt M, Lis E, Jackson R, Voth W a ďalší. 1982. Adenosine deaminase activity decreased in autism. *J Am Acad Child Psychiatry* 21:71-74.
- Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J a ďalší. 2007. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39:319-328.
- Takeuchi Y. 2008. [Neurotransmission in developmental disorders]. *No To Hattatsu* 40:451-455.
- Tentler D, Johannesson T, Johansson M, Rastam M, Gillberg C a ďalší. 2003. A candidate region for Asperger syndrome defined by two 17p breakpoints. *Eur J Hum Genet* 11:189-195.
- Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD, McPhaul MJ. 1989. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:327-331.
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, Danieli GA, Gualandi F a ďalší. 2002. Investigating the mechanism of chromosomal deletion: characterization of 39 deletion breakpoints in introns 47 and 48 of the human dystrophin gene. *Genomics* 80:523-530.
- Tommerup N, Lothe R. 1992. Constitutional ring chromosomes and tumour suppressor genes. *J Med Genet* 29:879-882.
- Tordjman S, Gutknecht L, Carlier M, Spitz E, Antoine C a ďalší. 2001. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry* 6:434-439.
- Tsilchorozidou T, Menko FH, Laloo F, Kidd A, De Silva R a ďalší. 2004. Constitutional rearrangements of chromosome 22 as a cause of neurofibromatosis 2. *J Med Genet* 41:529-534.
- Tuchman R, Rapin I. 2002. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol* 1:352-358.
- Van Esch H, Hollanders K, Badisco L, Melotte C, Van Hummelen P a ďalší. 2005. Deletion of VCX-A due to NAHR plays a major role in the occurrence of mental retardation in patients with X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 14:1795-1803.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP a ďalší. 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.
- Vincent JB, Konecki DS, Munstermann E, Bolton P, Poustka A a ďalší. 1996. Point mutation analysis of the FMR-1 gene in autism. *Mol Psychiatry* 1:227-231.

- Vincent JB, Melmer G, Bolton PF, Hodgkinson S, Holmes D a d'alší. 2005. Genetic linkage analysis of the X chromosome in autism, with emphasis on the fragile X region. *Psychiatr Genet* 15:83-90.
- Vogel F, Motulsky AG. 1997. *Human Genetics. Problems and Approaches*. Berlin: Springer.
- Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF a d'alší. 2006. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11:1, 18-28.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT a d'alší. 2009. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459:528-533.
- Wang Z, Willard HF, Mukherjee S, Furey TS. 2006. Evidence of influence of genomic DNA sequence on human X chromosome inactivation. *PLoS Comput Biol* 2:e113.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT a d'alší. 2008. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358:667-675.
- Weissmann J, Vollmer M, Pribilla O. 1982. Survey of the distribution of adenosine deaminase and superoxide dismutase markers in different populations. *Hum Hered* 32:344-356.
- WHO. 1992. *The tenth revision of the international classification of diseases and related health problems (ICD-10)*. Ženeva: World Health Organisation.
- Wiginton DA, Kaplan DJ, States JC, Akeson AL, Perme CM a d'alší. 1986. Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. *Biochemistry* 25:8234-8244.
- Wiktor A, Van Dyke DL, Weiss L. 1993. Characterization of a de novo 48,XX,+r(X),+r(17) by in situ hybridization in a patient with neurofibromatosis (NF1). *Am J Med Genet* 45:22-24.
- Willemsen R, Olmer R, De Diego Otero Y, Oostra BA. 2000. Twin sisters, monozygotic with the fragile X mutation, but with a different phenotype. *J Med Genet* 37:603-604.
- Williams K, Glasson EJ, Wray J, Tuck M, Helmer M a d'alší. 2005. Incidence of autism spectrum disorders in children in two Australian states. *Med J Aust* 182:108-111.
- Wimplinger I, Morleo M, Rosenberger G, Iaconis D, Orth U a d'alší. 2006. Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Am J Hum Genet* 79:878-889.
- Winter C, Reutiman TJ, Folsom TD, Sohr R, Wolf RJ a d'alší. 2008. Dopamine and serotonin levels following prenatal viral infection in mouse--implications for psychiatric disorders such as schizophrenia and autism. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:712-716.
- Wolff DJ, Schwartz S, Carrel L. 2000. Molecular determination of X inactivation pattern correlates with phenotype in women with a structurally abnormal X chromosome. *Genet Med* 2:136-141.
- Wong VC, Hui SL. 2008. Epidemiological study of autism spectrum disorder in China. *J Child Neurol* 23:67-72.

- Woodward KJ, Cundall M, Sperle K, Sistermans EA, Ross M a d'alší. 2005. Heterogeneous duplications in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination. *Am J Hum Genet* 77:966-987.
- Wu S, Guo Y, Jia M, Ruan Y, Shuang M a d'alší. 2005. Lack of evidence for association between the serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and autism in the Chinese trios. *Neurosci Lett* 381:1-5.
- Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC a d'alší. 2005. Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434:640-644.
- Yirmiya N, Pilowsky T, Nemanov L, Arbelle S, Feinsilver T a d'alší. 2001. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *Am J Med Genet* 105:381-386.
- Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ a d'alší. 2003. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 73:886-897.
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J a d'alší. 1991. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252:1179-1181.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A a d'alší. 2003. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112:317-327.
- Zhang C, Milunsky JM, Newton S, Ko J, Zhao G a d'alší. 2009. A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *J Neurosci* 29:10843-10854.
- Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E a d'alší. 2004. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254:143-147.