

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**

**Analýza variability počtu kopií v genomu u pacientů s mentální  
retardací a/nebo poruchou autistického spektra**

Disertační práce

**Mgr. Zuzana Čapková**

**Olomouc 2020**

**Školitel: Mgr. Dita Vrbická, Ph.D.**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dity Vrbické, Ph.D. a že jsem všechny použité literární zdroje uvedla v seznamu literatury.

V Olomouci:

Mgr. Zuzana Čapková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní Mgr. Ditě Vrbické, Ph.D. a paní RNDr. Pavlíně Čapkové, Ph.D. za jejich odborné vedení, panu prof. MUDr. Martinu Procházkovi, Ph.D. a doc. MUDr. Marianu Hajdúchovi, Ph.D. za umožnění vzniku této práce, MUDr. Václavě Curtisové, MSc., MUDr. Josefu Srovnalovi, doc. MUDr. Aleně Šantavé, CSc., MUDr. Júlii Štellmachové a MUDr. Enkhjargalaně Mracké za klinické konzultace pacientů. Dále bych ráda poděkovala biologům Ústavu lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici Olomouc, Institutu molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého v Olomouci a společnosti Gennet s.r.o. za pomoc při řešení experimentální části dizertační práce. V neposlední řadě děkuji pracovníkům společnosti ACREA CR, spol. s r.o. za statistické zpracování získaných dat a grantovým agenturám za finanční podporu IGA — LF 2020\_018, IGA — LF 2020\_007, MZ ČR — RVO FNOL 00098892, ERDF — Project ENOCH No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868, TACR — TN01000013, MŠMT ČR — LM2018132, A-C-G-T (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_026/0008448) financovaného z EFRR.



## Abstrakt

Mentální retardace (MR) a poruchy autistického spektra (PAS) tvoří skupinu onemocnění, ve které se fenotyp i genotyp pacientů vzájemně překrývá a tím také ztěžuje interpretaci genetických nálezů.

V této práci byla provedena CNV analýza u dvou skupin pacientů (MR = 90 a PAS = 114) metodami aCGH, SNP aCGH popř. MLPA a MS MLPA. Rovněž byly sledovány jednotlivé klinické znaky pacientů (ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciální dysmorfické rysy, růstová restrikce, vrozené vývojové vady mozku, srdce, urogenitálního traktu, skeletu, hypotonie a hormonální poruchy). Význam a vztah klinických a genetických dat byl studován pomocí F-testu, T-testu, Fisherova exaktního testu a logistickou regresí.

Tato práce potvrdila častější výskyt PAS u mužů než u žen a zároveň vyloučila tento genderový rozdíl u pacientů s MR ( $p = 0,00001$  vs  $p > 0,0578$ ). Rovněž prokázala častější přítomnost komorbidních znaků u pacientů s MR než u pacientů s PAS ( $p = 0,0003$ ). Byla zjištěna vyšší četnost mikrocefalie, dysmorfie, vývojových vad srdce a skeletu u pacientů s MR, zatímco u pacientů s PAS byla častější přítomnost ADHD. CNV analýza prokázala významný rozdíl četnosti patogenních CNV mezi oběma skupinami ( $p = 0,004$ ). Zbylé varianty byly zastoupeny se shodnou četností. Faciální dysmorfické rysy významně zvyšovaly pravděpodobnost záchytu patogenní CNV v obou skupinách ( $p$  (MR) = 0,05,  $p$  (PAS) = 0,01). Významná byla také epilepsie u pacientů s PAS ( $p = 0,01$ ) a mikrocefalie u pacientů s MR ( $p = 0,01$ ). Makrocefalie byla významným přispěvatelem nárůstu pravděpodobnosti záchytu patogenní CNV (25,0 %), avšak pouze v kombinaci s dalšími klinickými znaky. U pacientů s PAS bez makrocefalie, dysmorfie a epilepsie byla pravděpodobnost záchytu patogenní CNV 1 %. Ve skupině pacientů s PAS se opakovaně vyskytovaly CNV v oblastech 9p24.3 (*DOCK8*, *KANK1*), 2q37.1 (*DIS3L2*).

Tato práce prokázala rozdílný vztah některých klinických a genetických nálezů u obou skupin pacientů (MR i PAS) a poukázala na nutnost podrobné klinické stratifikace těchto pacientů. Dále poukazuje na nízkou účinnost CNV analýzy u pacientů s PAS bez makrocefalie, dysmorfie a epilepsie. Nakonec na základě klinické charakteristiky nositelů variant 9p24.3 a 2q37.1 odhadujeme, že by se mohlo jednat o nové CNV asociované s PAS, které jsou zatíženy neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou.

## Abstract

Intellectual disabilities (ID) and autism spectrum disorders (ASD) are phenotypically and genotypically overlapped group of diseases. However, this also complicates interpretation of genetic findings.

In this work, CNV analysis was performed in two groups of patients (ID = 90 and ASD = 114) by aCGH, SNP and CGH methods, respectively MLPA and MS MLPA. Individual clinical features were also observed in patients (ADHD, epilepsy, micro / macrocephaly, facial dysmorphic features, growth restriction, congenital malformations of the brain, heart, urogenital tract, skeleton, hypotension and hormonal disorders). The significance and relationship of clinical and genetic data was analyzed using F-test, T-test, Fisher's exact test and logistic regression.

This work confirmed a more frequent incidence of ASD in men than in women and also ruled out this gender difference in patients with ID ( $p = 0.00001$  vs  $p > 0.0578$ ). It also showed in comorbid features ( $p = 0.0003$ ). Higher rates of microcephaly, dysmorphia, heart and skeletal developmental defects were found in patients with ID, while ADHD was more common in patients with ASD. CNV analysis showed a significant difference in the frequency of pathogenic CNV between both groups ( $p = 0.004$ ). The remaining variants were represented with the same frequency. Facial dysmorphic features significantly increased the pathogenic CNV detection probability in both groups ( $p$  (ID) = 0.05,  $p$  (ASD) = 0.01). Epilepsy was also significant in patients with ASD ( $p = 0,01$ ) and microcephaly in patients with ID ( $p = 0,01$ ). Macrocephaly was a significant contributor to the increase in pathogenic CNV detection probability (25,0%), but only in combination with other clinical features. In patients with PAS without macrocephaly, dysmorphia, and epilepsy, the pathogenic CNV detection probability was 1%. CNV in 9p24.3 (*DOCK8*, *KANK1*), 2q37.1 (*DIS3L2*) were repeatedly occurred in patients with ASD.

This work demonstrated the different relationship of some clinical and genetic findings in both groups of patients (ID and ASD) and highlighted the necessity of clinical stratification in these patients. It also points to the low efficacy of CNV analysis in patients with PAS without macrocephaly, dysmorphia and epilepsy. Finally, we estimate that carriers of CNV 9p24.3 and 2q37.1 could be new CNV associated with PAS, which are accompanied by incomplete penetrance and variable expression based on the clinical characteristics of it.

## Obsah

1	Úvod .....	3
2	Poruchy autistického spektra (PAS) .....	3
2.1	Klinická definice PAS .....	3
2.2	Symptomatologie PAS .....	4
2.3	Příčiny PAS .....	6
2.4	Diferenciálně diagnostické omyly u PAS .....	8
3	Mentální retardace (MR) .....	8
3.1	Definice MR .....	8
3.2	Příčiny MR .....	9
4	Vybrané fenotypové znaky doprovázející MR a PAS .....	10
5	Genetické příčiny MR a PAS a jejich klinická diagnostika .....	12
5.1	Numerické chromozomální aberace .....	12
5.2	Strukturní chromozomální aberace .....	13
5.3	Monogenní aberace .....	15
5.4	Mozaicismus .....	16
5.5	Aberace mitochondriálního genomu .....	17
5.6	Možnosti genetické diagnostiky u pacientů s MR a/nebo PAS .....	18
6	Cíle práce .....	21
7	Materiál a metodika .....	22
7.1	Biologický materiál a charakteristika pacientů .....	22
7.2	Příprava MLPA .....	22
7.3	Příprava aCGH a SNP aCGH .....	24
7.4	Klinická interpretace nalezených CNV .....	28
7.5	Statistická analýza klinických a genetických nálezů .....	28
8	Výsledky .....	29
8.1	Výsledky analýzy klinických dat pacientů s MR a/nebo PAS .....	29
8.2	Výsledky CNV analýzy pacientů s MR a/nebo PAS .....	30
8.3	Výsledky korelace klinických a genetických dat u pacientů s MR a PAS .....	43
9	Diskuze .....	54
10	Závěr .....	59
11	Seznam publikovaných prací .....	60
12	Seznam tabulek .....	61

13	Seznam obrázků .....	62
14	Seznam rovnic .....	62
15	Seznam příloh .....	63
16	Seznam zkratk.....	63
17	Použitá literatura.....	63
18	Přílohy.....	86



# 1 Úvod

Mentální retardace (MR) a poruchy autistického spektra (PAS) tvoří skupinu onemocnění, ve které se fenotyp i genotyp pacientů vzájemně překrývá (Kruszka et al 2019). Avšak ukazuje se, že se etiologie obou onemocnění liší. Zatím co MR může vznikat environmentálně i geneticky zhruba stejně často, u PAS se předpokládá, že vzniká převážně na základě genetické aberace (Winnepeninckx et al., 2013, Leblond et al., 2012). U geneticky podmíněné MR také pozorujeme obvykle jednu aberaci většího charakteru, která pokrývá až několik desítek genů, ale u PAS se předpokládá vliv mnoha genetických změn na různých místech, jejichž kombinace přispívá k rozvoji abnormálního fenotypu (Mundhofir F. E. et al., 2012, Leblond et al., 2012, Costales et al., 2015, Smith et al., 1993). Oba klinické obrazy se navzájem překrývají a ovlivňují. Tím ztěžují přesné klinické vyšetření pacientů a tedy i korelaci genotypu a fenotypu pacientů (Kruszka et al 2019).

## 2 Poruchy autistického spektra (PAS)

### 2.1 Klinická definice PAS

Poruchy autistického spektra (PAS) tvoří fenotypově heterogenní skupinu neurovývojových onemocnění, která narušuje schopnosti sociální interakce, komunikace a představitosti. Pojem autismus byl poprvé použit psychiatrem Bleulerem E. v roce 1911 a označoval tak pacienty, kteří projevovali odpoutání od reality spolu s relativní nebo absolutní převahou vnitřního života. Tato skupina však zahrnovala i pacienty se schizofrenií (Polášková 2010, Evans 2013). Poprvé je autismus popisován jako samostatné onemocnění až psychiatry Kannerem L. a Aspergerem H. (Attwood 2005, Thorová 2006, Evans 2013).

Světová zdravotnická organizace (WHO) v desáté revizi Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) zahrnuje autismus a jemu podobná onemocnění do skupiny zvané Pervazivní vývojové poruchy (Pervasive developmental disorders, PDD) a dále je dělí do jednotlivých podskupin (Polášková 2010) (Tab. 1). Americká psychiatrická asociace tento model následuje a zahrnuje autistický syndrom a jeho podskupiny do čtvrté verze diagnostického a statistického manuálu

(DSM-IV)(Tsai et al 2019). Porovnání jednotlivých podskupin diagnostických manuálů MKN-10 a DSM-IV je znázorněno v tabulce 1. V roce 2013 je vydána nová verze DSM-V, která dříve oddělené kategorie autismu (autistická porucha, Aspergerův syndrom, dezintegrační porucha v dětství a jinak nespecifikované pervazivní vývojové poruchy) sloučila do jedné diagnózy - poruchy autistického spektra (PAS) (<https://www.autismspeaks.org/dsm-5-and-autism-frequently-asked-questions>).

**Tabulka 1:** Porovnání diagnostických manuálů DSM-IV a MKN10

DSM-IV	MKN-10
Autistická porucha	Dětský autismus
Aspergerův syndrom	Aspergerův syndrom
Dětská dezintegrační porucha	Jiné dezintegrační poruchy
Jinak nespecifikovaná pervazivní vývojová porucha	Atypický autismus
Rettův syndrom	Rettův syndrom
	Hyperaktivní porucha sdružená s mentální retardací a stereotypními pohyby
	Jiné pervazivní vývojové poruchy
	Pervazivní vývojová porucha nespecifikovaná

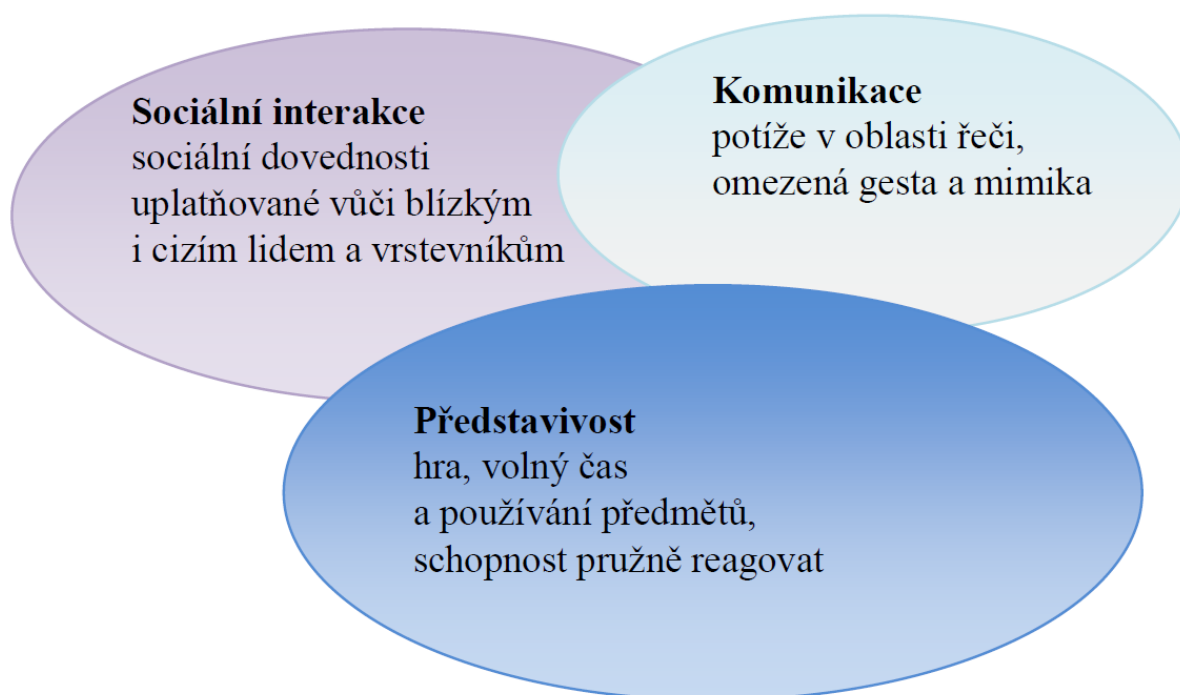
*DSM-Diagnostický a statistický manuál, MKN-Mezinárodní klasifikace nemocí*

## 2.2 Symptomatologie PAS

*„Autistický handicap má svoji podstatou blíží k slepotě či hluchotě než k plachosti nebo uzavřenosti.“ (Jelínková 2010)*

Pro diagnostiku PAS je nutná přítomnost postižení ve třech oblastech, a to omezení recipročních sociálních interakcí, omezení reciproční komunikace (verbální i neverbální) a omezení imaginace, které se projeví omezeným repertoárem chování. Tyto tři skupiny specifických symptomů, pakliže se objevují společně, jsou označovány jako „*Triáda symptomů*“ (Obr. 1) (Barendse et al. 2018, Shattuck et al 2007).

**Obrázek 1:** Triáda symptomů (převzato z Pastierikova 2013)



#### *Sociální interakce*

U člověka s PAS je sociální intelekt v hlubokém deficitu ve srovnání s mentálními schopnostmi. Ve většině případů jsou sociální vztahy iniciovány prostřednictvím zrakového kontaktu. Děti s PAS navazují zrakový kontakt s druhými lidmi ve stejné míře jako intaktní část populace, nikoli však v obvyklých chvílích během interakce. Výsledkem této poruchy je neschopnost reagovat na emoce druhých, porozumět nevhodnému chování, a tedy i nedostatkem empatie (Jelínková 2010, Tsai et al 2019, Thorová 2006).

#### *Komunikace*

Poruchy autistického spektra jsou primárně poruchami komunikace. Asi polovina dětí s PAS si nikdy neosvojí řeč na takové úrovni, aby sloužila ke komunikačním účelům. U dětí, které si řeč osvojí, zaznamenáváme nápadně odlišný vývoj řeči s mnoha abnormalitami. Porucha komunikace se u jednotlivých dětí s PAS velmi liší. Můžeme pozorovat např. echolálii, neologismy, idiosynkrazii, nebo poruchy v oblastech fonologie, sémantiky, syntaxe i gramatiky. Verbální komunikace osob s PAS je ovlivněna neschopností pochopit abstrakci

nebo význam symbolů. Velkou roli také hraje úroveň mentální retardace (Ben-David et al 2019, Jelínková 2010, Thorová 2006).

#### *Představivost*

Narušení představivosti (imaginace) u dětí s PAS vede ke stereotypnímu chování. Pro některé osoby s PAS jsou tyto projevy jedinou možností, jak ovládat svůj strach a úzkost z neznámé situace či z neznámého prostředí. Tato aktivita může často způsobit výrazné narušení normálního chodu domácnosti, důsledkem čehož může být až izolace rodiny od společnosti (Crespi et al. 2016, Jelínková 2010, Thorová 2006).

#### *Nespecifické symptomy*

Nespecifické symptomy můžeme pozorovat v oblasti motoriky (např. nesouhra ramen a nohou při chůzi) (Wilson et al 2018). Osoby s PAS bývají také citlivé na některé zvuky, barvy, dotyky či bolest. Příčinou je nedostatek komplexně zaměřené pozornosti. Uvádí se, že přibližně 40 % dětí s autismem je hypersenzitivních (Nakajima et al 2018).

## **2.3 Příčiny PAS**

Konkrétní specifická příčina autismu není doposud známa. Navzdory mnohým výzkumům zabývajícím se možnými příčinami jeho vzniku doposud nemůžeme mluvit o jednoznačné etiologii. Komplexnost a vysoká variabilita symptomů poruch autistického spektra se odráží ve velkém množství poruch s mnoha příčinami (Chaste et al. 2012).

#### *Abnormální vývoj mozku*

Abnormální vývoj mozku byl ve starších studiích pozorován zejména u předčasně narozených dětí. Tyto děti častěji vykazovaly poruchy z oblasti PAS než děti narozené v termínu (Kroupová 2010). Avšak přesná povaha abnormalit mozku není jasná. Studie ukázaly rozdílný vývoj v mnoha oblastech mozku, jako jsou čelní a spánkové laloky, mozeček a subkortikální amygdaly a oblasti hippocampu, u pacientů s PAS (Bernier et al. 2007, Billeci et al. 2019). Nedostatek důkazů, metodické výzvy a protichůdná zjištění dosud neumožňují vyvodit přesné závěry o konkrétních postižených oblastech mozku nebo o mechanismu vývoje, který vede k

pozorovaným abnormalitám. Jiné studie poukazují na možnou nekonektivitu mezi mozkovými oblastmi a uvnitř nich nebo se zaměřují na specifické typy neuronů (např. zrcadlové neurony) a jejich aktivace (Bernier et al 2007).

#### *Věk otce*

Jednou ze zvažovaných příčin PAS je i věk otce v době početí. Podle některých studií je vyšší věk otce rizikovým faktorem pro vznik PAS u potomka (Rodný 2006, Rieske et al. 2019). Zajímavý nález přinesla studie Rieske et al. 2019, která vyloučila věk matky jako rizikový faktor pro vznik PAS (Rieske et al. 2019).

#### *Další příčiny*

Další příčiny PAS se zdají být spíše jako tzv. „spouštěcí mechanismy“ (Polášková 2010). Řadí se mezi ně neurotoxiny prostředí (těžké kovy - olovo, rtuť, rozpouštědla - toluen), metabolické poruchy (metabolismus amino-, trikarboxylových kyselin atd.), endogenní disruptory (plastifikátory, pesticidy, povrchově aktivní látky, retardéry hoření atd.), narušení funkce štítné žlázy u matek v průběhu těhotenství, alergie a imunologické aberace (infekce, očkování) atd. (McCaulley 2019, Orozco et al. 2019, Fini et al. 2019, Ramaekers et al. 2019).

#### *Genetické příčiny PAS*

Dědičnost PAS v rámci rodin je podložena nejen mnohými psychiatrickými, ale i molekulárně genetickými studii rodin a dvojčat (Waye et al. 2018, Vorstman et al. 2017, Thorová 2006). Avšak vzhledem ke klinickému překryvu PAS s dalšími projevy jako jsou mentální retardace, hyperaktivita (ADHD), epilepsie, abnormální skeletární struktura, dysmorfické rysy obličeje a mnohé další zůstává vliv genetických změn na rozvoj tohoto onemocnění neznámý (Ruzzo et al 2019, Guo et al 2018, Ivanov et al 2015).

V současné době odborníci soudí, že se dědí určitý typ kognitivní neschopnosti nebo sociálního deficitu, což za určitých okolností vede k plnému rozvinutí autistických symptomů (Vorstman et al. 2017). Podrobné poznatky genetiky z oblasti PAS budou shrnuty v pozdější kapitole č. 5.

## 2.4 Diferenciálně diagnostické omyly u PAS

Jeden z řady problémů, s nimiž se musíme v kontextu PAS vypořádat, představuje diagnostika a stanovení adekvátní diagnózy. Jen ojediněle lze narazit na pacienta bez dalších poruch, které zamlžují primární diagnózu (např. mentální retardace). Často jsou také pacienti s PAS chybně diagnostikováni jako schizofrenní, s poruchou osobnosti, schizotypní, obsedantně-kompulzivní, s bludy, mentální retardací, se sociálními fobiemi, poruchami chování, poruchou aktivity a pozornosti (lehká mozková dysfunkce, DMO) (Thorová 2006). Správná diagnóza je východiskem pro další intervenční kroky. Mezi nejčastěji využívané diagnostické metody v ČR patří Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Modified Checklist of Autism in Toddlers (M-CHAT), Autism Quotient (AQ) a Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Sharma et al 2018, Hosozawa et al 2020).

## 3 Mentální retardace (MR)

### 3.1 Definice MR

Mentální retardace (MR) je trvalé snížení inteligence v důsledku poškození mozku nebo nedostatečné funkce nervové soustavy (Švarcová-Slabinová, 2011). Pacienti s MR trpí různou měrou motorické, řečové, sociální a poznávací nedostatečnosti (Valenta *et al.*, 2012). Mentální retardace se může vyskytovat jako samostatné postižení jedince, nebo může být kombinována s jinými onemocněními a vadami (PAS, schizofrenie, parkinsonismus, ADHD, epilepsie, kongenitální malformace aj.) (Winnepeninckx *et al.*, 2013).

Při diagnostice MR se v současné době užívá Mezinárodní klasifikace nemocí 10. revize, zpracovaná Světovou zdravotnickou organizací. Ta rozděluje MR do šesti základních kategorií na základě inteligenčního kvocientu (IQ, Tab. 2) (Švarcová-Slabinová, 2011).

**Tabulka 2:** Kategorie mentální retardace podle MKN-10

Kategorie mentální retardace	IQ	Kód diagnózy podle MKN-10
Lehká mentální retardace	50 do 69	F70
Střední mentální retardace	35 do 49	F71
Těžká mentální retardace	20–34	F72
Hluboká mentální retardace	nižších než 20	F73
Jiná mentální retardace	nesnadné či nemožné stanovení z důvodu jiného postižení	F78
Nespecifická mentální retardace	neexistuje dostatek informací k zařazení do výše uvedených kategorií	F79

*IQ-inteligenční kvocient, MKN-Mezinárodní klasifikace nemocí 10. revize*

### 3.2 Příčiny MR

Příčina mentální retardace je odhalena pouze v polovině případů. Bylo odhadnuto, že vznik mentální retardace je v 50 % případů způsoben exogenními (získanými) vlivy a v 50 % případů vlivy endogenními (vrozenými) (Winnepenninckx *et al.*, 2013).

#### *Teratogenní vlivy v graviditě*

Organismus gravidní ženy může být v průběhu těhotenství vystaven nežádoucím vlivům (teratogenům), které mohou vést k abnormálnímu vývoji plodu a následně i dítěte. Plod vystavený některým infekcím (bakteriálním, virovým, parazitickým), neléčeným chronickým onemocněním (např. cukrovka typu 1, lupus, fenylketonurie) nebo parazitárním onemocněním, nedostatku některých vitamínů a dalších doplňků (draslíku, jódu, kyseliny listové), chemickým látkám (některým lékům, chemikáliím, drogám, alkoholu) nebo fyzikálním jevům (ionizující záření, teplota nad 38 °C) má zvýšené riziko mentální retardace často doprovázené dalšími poruchami chování, abnormálním vývojem lebky a skeletu, dysmorfickými rysy obličeje, nízkou porodní hmotností, špatným prospíváním atd. (Procházka M. *et al* 2018).

### *Perinatální příčina MR*

Mezi perinatální příčiny mentální retardace patří zejména předčasný porod a přidušení novorozence v porodních cestách (porodní asfyxie). Předčasný porod může nastat vlivem vícečetného těhotenství, nitroděložní infekce, poruchou funkce placenty nebo anomálií plodu. Jistou roli však hrají i genetické vlohky a také celá řada dalších důvodů. U takto narozených dětí s klesajícím „gestačním“ věkem roste pravděpodobnost výskytu mentální retardace. Předčasný porod může být také příčinou porodní asfyxie. Tento jev vede k nedostatku okysličení většiny orgánů plodu (mozek, srdce, plíce, játra, střeva, ledviny) (Jasenská 2012).

### *Vnější příčiny MR po narození dítěte*

Onemocnění, traumata nebo nedostatečná výživa dítěte po narození mohou vést k MR. Onemocnění může vznikat na podkladě infekčních onemocnění zasahujících mozek, jako jsou meningitida, encefalitida atd. V pozdějším věku může být onemocnění vyvoláno Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou, alkoholovou a epileptickou demencí nebo schizofrenií. Dalšími příčinami mohou být poškození mozku způsobená traumatem, nádorovou lézí nebo krvácením. Mentální retardace může zejména u dětí vzniknout i nedostatkem některých složek v potravě (např. nedostatek jódu) (Matulay *et al.*, 1986; Winnepeninckx *et al.*, 2013).

### *Genetické příčiny MR*

Genetické příčiny mentální retardace zahrnují aberace chromozomálních, variabilita počtu kopií genomu (CNV), monogenní, polygenní nebo mitochondriální (Winnepeninckx *et al.*, 2013; Aloui *et al.*, 2017). Vzhledem ke klinickému i genetickému překryvu PAS a MR jsou tyto poznatky shrnuty v pozdější kapitole č. 5.

## **4 Vybrané fenotypové znaky doprovázející MR a PAS**

Poruchy autistického spektra a mentální retardace se často překrývají a sdílí některé další fenotypové znaky (komorbidní znaky). Komorbidní znaky mohou být, stejně jako samotná MR



a/nebo PAS, pozorovány v populaci izolovaně bez dalších klinicky významných poruch, nebo současně u jednoho pacienta (Kruszka et al 2019). Mezi společné komorbidní znaky patří:

#### *Faciální dysmorfické rysy*

Faciální dysmorfické rysy jsou jedním z nejčastějších znaků u pacientů s MR a/nebo PAS. Do této skupiny patří abnormality např.: očních štěrbin, nadočnicových oblouků, nosu, rtů, nosoretní rýhy, uší, čelistí, tvaru obličeje a vlasové linie. Faciální dysmorfické rysy jsou popisovány u celé řady genetických aberací (chromozomálních aberací, mikrodelečních/mikroduplikačních syndromů, sekvenčních a metylačních změn), které bývají často doprovázeny PAS a/nebo MR (Kruszka et al 2019, Cunningham et al 2007).

#### *Defekt lebky*

Defekt lebky je důležitým klinickým znakem, a to zejména díky svému vlivu na vývoj mozku (Cunningham et al 2007). Mikrocefalie (obvod lebky < 2SD) je často spojena s přítomností MR u dětí a je často doprovázena genetickou aberací většího rozsahu jako jsou například CNV (copy number variant) (Arroyo 2018). Zatímco makrocefalie (obvod lebky > 2SD) je spojována s určitými podtypy autismu a za její genetickou příčinu je často považována pouze malá sekvenční změna v různých genech (jako např. *PAK1*, *PI3K*, *ZBTB7A* atd.) (Albores-Gallo et al 2017).

#### *Vývojové vady mozku*

Vývoj lidského mozku je složitý a přesně regulovaný proces. Abnormality těchto vývojových procesů mohou vést k závažným malformacím a dysfunkcím mozku. Vývojové vady mozku vznikají převážně geneticky, avšak výjimku tvoří nadměrné požívání alkoholu, drogová závislost, věk, zánětlivá onemocnění a/nebo cukrovka u matky v době těhotenství (Jiang et al 2019, Martinez-Morga et al 2016).

#### *Hyperaktivita (ADHD) a epilepsie*

ADHD a epilepsie jsou znaky vyskytující se velmi často u pacientů s MR a/nebo PAS. Avšak jejich genetická diagnostika je do velké míry závislá na dalších doprovodných znacích. V případě izolovaného výskytu ADHD nebo epilepsie zůstává celá řada pacientů bez odhalení příčiny vzniku (Bădescu et al 2016, Borlot et al 2017).

### *Ostatní*

Vývojové vady srdce a urogenitálního traktu nebo růstová restrikce jsou u pacientů s MR a/nebo PAS méně časté. Na druhou stranu tyto vrozené vady jsou obvykle součástí popsanych genetických syndromů (Downův syndrom, Di Georgův syndrom, syndrom Fragilního X, syndrom Noonanové atd.), které zahrnují mentální retardaci a u řady z nich byla prokázána vyšší frekvence výskytu PAS (Bean et al 2017, Richards et al 2015).

## **5 Genetické příčiny MR a PAS a jejich klinická diagnostika**

Oba klinické obrazy (MR i PAS) mohou vznikat na základě genetických aberací. S postupně se vyvíjejícími metodami genetické analýzy jsou u pacientů s MR a/nebo PAS odhalovány genetické aberace různého rozsahu (chromozomální, monogenní) nebo poruchy epigenetické kontroly.

### **5.1 Numerické chromozomální aberace**

Numerické chromozomální aberace jsou změny počtu chromozomů proti obvyklému stavu (46, XX, 46, XY) (Procházka et al., 2018). Života schopné jsou pouze početní změny chromozomů 13, 18, 21, X a Y. Trizomie chromozomu 21 (Downův syndrom) je jednou z nejčastějších genetických příčin mentální retardace, která je zároveň doprovázena zvýšeným rizikem výskytu PAS (19 %) (Richards et al 2015). Početní změny zbylých autozomů (chromozom 13 a 18) nelze pokládat za příčinu MR, vzhledem ke krátkému průměrnému přežití těchto pacientů (Mundhofir F. E. et al., 2012, Samango-Sprouse C. et al., 2018, Kazemi M. et al., 2016, Aloui M. et al., 2017). Na druhou stranu numerické změny gonozomů X a Y mohou doprovázet mírné změny chování. V některých případech lze pozorovat mírnou formu MR a/nebo agresivní chování zapříčiněné karyotypem 46, XYY (Aloui M. et al., 2017). U pacientů s karyotypem 47, XXY bylo pozorováno až 14% riziko rozvoje PAS (van Rijn et al., 2015). Avšak ve většině případů není změna počtu chromozomů X a /nebo Y doprovázena MR ani PAS (Samango-Sprouse C. et al., 2018).

## 5.2 Strukturální chromozomální aberace

Strukturální chromozomální změny jsou nejčastěji způsobeny zlomem na chromozomech, které jsou následovány ztrátou/ziskem (delece/amplifikace) nebo přesunem (translokací) genomického materiálu. Některé tyto změny se jeví jako neškodné, jiné jsou asociovány s rozvojem onemocnění. Klinický dopad těchto změn je závislý na umístění zlomu a na velikosti segmentu, který byl takto zasažen (Procházka et al., 2018).

Strukturální změny chromozomů velkého rozsahu ( $\geq 5\text{Mb}$ ) lze pozorovat pod mikroskopem metodou konvenčního karyotypu (Procházka et al., 2018). Příkladem jsou syndromy Cri-du-chat a Wolf-Hirschhorn, u kterých dochází ke ztrátě celého krátkého ramene chromozomu 5 nebo 4. Oba syndromy jsou příčinou mentální retardace a faciálních dysmorfických rysů, avšak onemocnění PAS u nich není popisováno (Espirito et al., 2016, Battaglia et al., 2015).

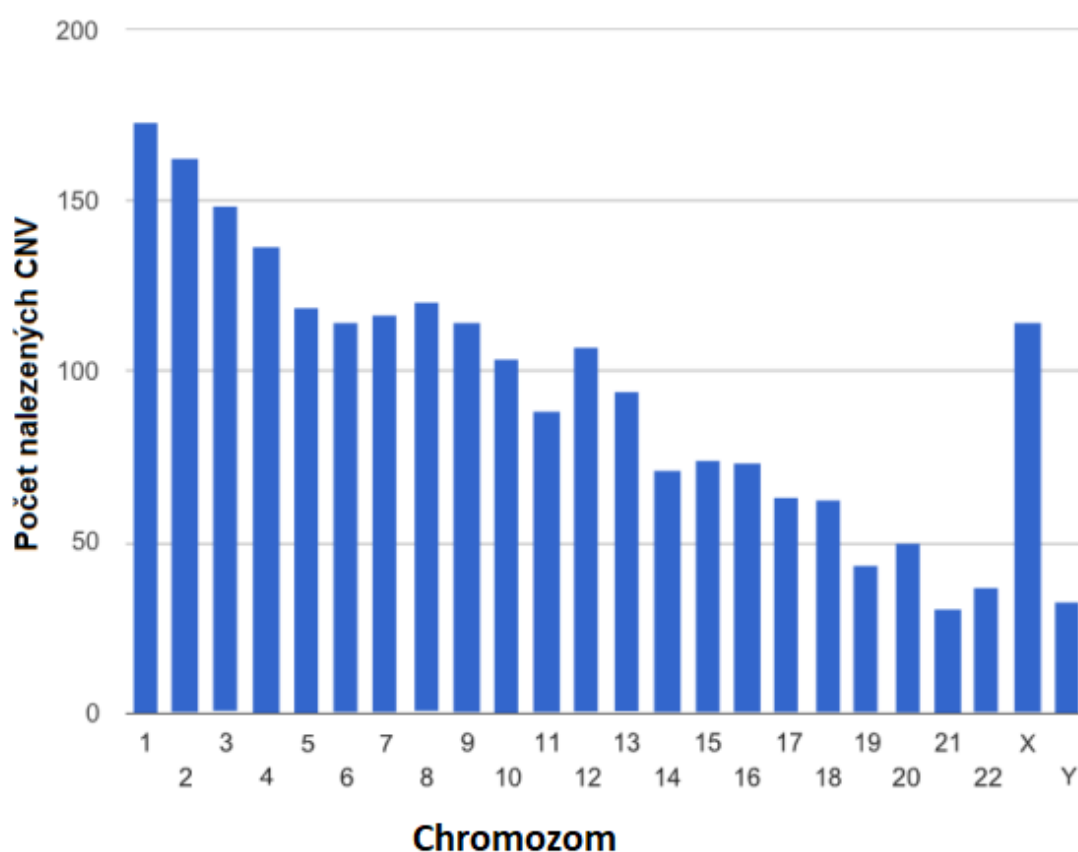
Strukturální chromozomální změny menší než 5 Mb se nazývají variabilita počtu kopií genomu (copy number variant, CNV). Tyto změny hrají významnou roli při vzniku MR a/nebo PAS. V současnosti jsou některé CNV asociovány se syndromy, které zahrnují MR, jako jsou Di Georgův syndrom (delece 22q11.2), Williamsův-Baurenův syndrom (delece 7q11.23), Phelanův-McDermidův syndrom (delece 22q13), Smithův-Magenisův syndrom (delece 17p11.2). Tyto syndromy jsou také doprovázeny zvýšeným rizikem PAS (Tab. 3) (Richards et al., 2015, Costales et al., 2015, Smith et al., 1993). Avšak literatura popisuje i mnoho dalších CNV v oblastech 1q21.1, 1q43q44, 1p36, 1q22q23.1, 2p16.1-p15, 4p16.3, 9q34.3, 9p, 10q26, 16p11.2, Xp11.23-p11.22, Xp11.22-p11.23, Xq28 nebo Xp22.12 (<http://autism.mindspec.org>, Obr. 2). Závažnost klinického dopadu těchto změn je zatížena jevy neúplné penetrance a variabilní expresivity. Ačkoliv vzniklo mnoho studií zabývajících se analýzou CNV u pacientů s MR a/nebo PAS, nepodařilo se objasnit význam všech nalezených CNV ani mechanismus neúplné penetrance a variabilní expresivity (Sanders et al., 2015, Borlot et al., 2017).

**Tabulka 3** Výskyt PAS u pacientů s vybranými syndromy podmíněnými CNV

Název syndomu	Incidence #	Aberovaná oblast genomu	Procentuální zastoupení PAS (%)
Williamsův	1 : 7 500	7q11.23	7,0 - 12,0
DiGeorgův	1 : 4 000	22q11.2	10,0 - 40,0
Phelanův-McDermidův	1 : 8 000-15 000	22q13	75,0
Smithův-Magenisův	1 : 25 000	17p11.2	50,0 - 75,0
Praderův-Williho	1 : 10 000	15q11-13	12,3 - 25,3
Angelmanův	1 : 12 000	<i>UBE3A</i>	1,9 - 34,0

# *ghr.nlm.nih.gov* (12.5.2020)

**Obrázek 2:** Diagram rozložení nalezených CNV u pacientů s MR a/nebo PAS (převzato a upraveno z [http://autism.mindspec.org/autdb/CNV\\_Stats.do](http://autism.mindspec.org/autdb/CNV_Stats.do))



Na vzniku MR a/nebo PAS se rovněž podílí, kromě běžných ztrát a získů genomického materiálu, i genomický imprinting (umličování genů). Jedná se o mechanismus regulace genové exprese. Jedním z hlavních procesů imprintingu je metylace cytosinu v DNA (deoxyribonukleová kyselina) (Procházka et al., 2018). Poruchou mechanismu metylace DNA nebo zděděním dvou homologních alel od jednoho rodiče (uniparentální disomie, UPD) dojde k umlčení genů v imprintované oblasti. Tento stav vyvolává onemocnění stejně, jako by byla oblast deletována (Kubota 2018). Angelmanův (AS), Praderův-Williho (PWS), Beckwithův-Wiedemannův (BWS) a Silverův-Russellův syndrom (SRS) jsou doprovázeny MR a mohou vznikat na podkladě prosté delece, UPD i poruchy mechanismu metylace DNA (Baker et al 2018, Kent et al 2008). AS a PWS jsou navíc asociovány s rozvojem autismu (Vardi et al 2012, Wang et al., 2020, Richards et al., 2015, Tab. 3). Nedávné studie považují změnu metylace DNA za možnou příčinu vzniku MR a/nebo PAS, ale i za vysvětlení nárůstu frekvence těchto onemocnění v populaci (Kubota 2018, Weaver et al 2004, McGowan et al 2009).

### 5.3 Monogenní aberace

Mentální retardace na rozdíl od poruchy autistického spektra může vznikat změnou jen jediného genu (monogenní příčina). Avšak i tato onemocnění mají zvýšené riziko výskytu PAS. Mezi nejčastější monogenní příčiny MR patří aberace genu *FMR1* (Syndrom Fragilního X) a *MECP2* (Rettův syndrom) následované *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1* (Noonanův syndrom), *NF1* (Neurofibromatóza), *TSC1*, *TSC2* (Tuberózní skleróza) a *CHD7* (CHARGE syndrom), které často doprovází onemocnění autistického spektra (Richards et al 2015, Tab. 4). Vzácnějšími monogenně podmíněnými onemocněními doprovázenými PAS jsou Cornelia de Lange, Pittův-Hopkinsův a Cohenův syndrom (*NIPBL*, *TCF4*, *COH1*) (Richards et al 2015, Watkins et al 2019). Samotná porucha autistického spektra pravděpodobně nevzniká monogenně, ale souhrou genetických změn malého účinku (multiple hit model) (Leblond et al., 2012).

**Tabulka 4:** Výskyt PAS u pacientů s vybranými syndromy podmíněnými monogeně

Název syndromu	Incidence #	Gen	Procentuální zastoupení PAS (%)
Fragilní X	1 : 4 000**	<i>FMR1</i>	22,2 - 50,0
Rettův	1 : 9 000	<i>MECP2</i>	19,0 -61,0*
Noonanové	1 : 1 000	<i>PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1</i>	15,0 - 30,0
Neurofibromatóza typu 1	1 : 3 000	<i>NF1</i>	13,0 -29,0
Tuberézní skleróza	1 : 6 000	<i>TSC1, TSC2</i>	36,0 - 61,0
CHARGE	1 : 8 500	<i>CHD7</i>	9,0 - 68,0
Cornelie de Langeové	1 : 10 000	<i>NIPBL</i>	43,0 -75,0
Pitt-Hopkins	celosvětově 500	<i>TCF4</i>	34,7 - 91,6
Cohenův	celosvětově 1000	<i>COH1</i>	48,9 -68,9

\* u dívek, \*\*u chlapců, # *ghr.nlm.nih.gov* (12.5.2020)

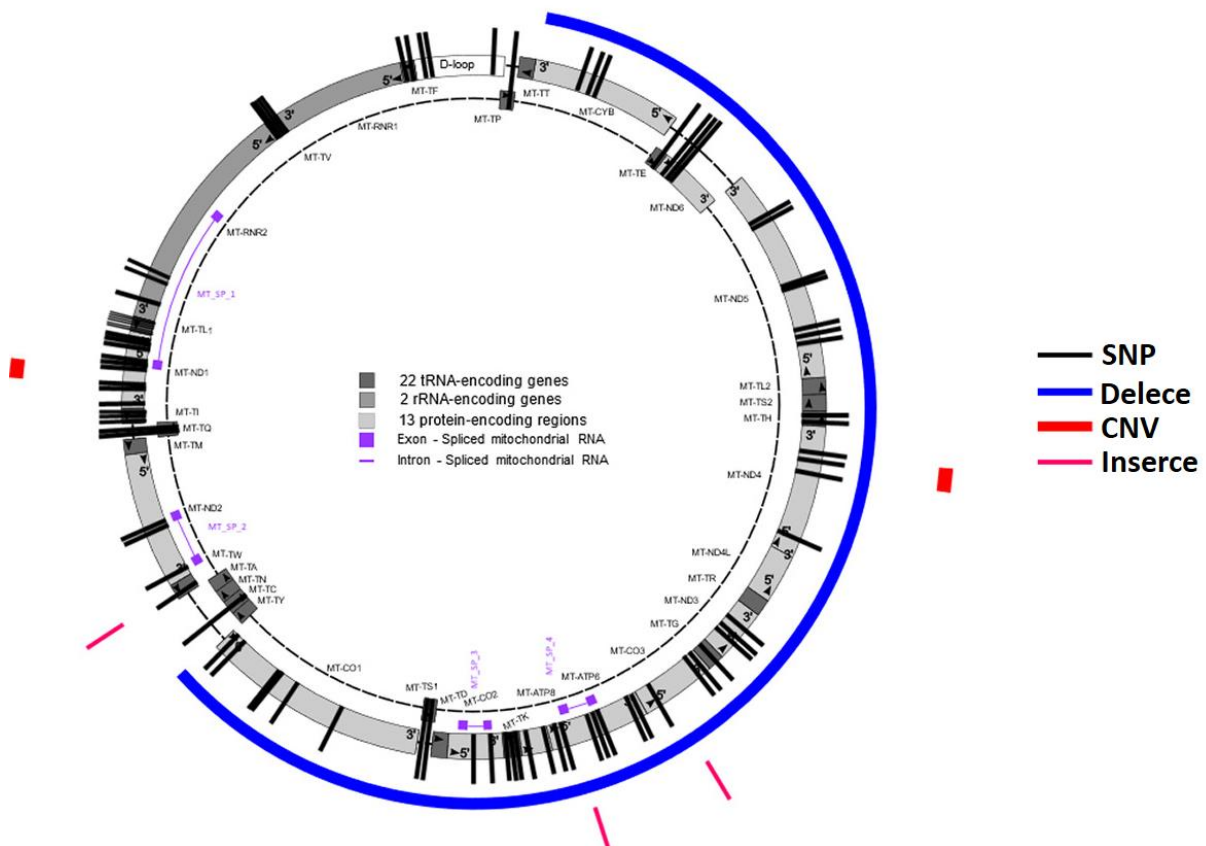
## 5.4 Mozaicismus

Přítomnost dvou buněčných linií s různou genetickou výbavou u jednoho jedince (mosaicismus) je popisována jako příčina změněných forem známých syndromů (Procházka et al., 2018). Příkladem je zejména trizomie chromozomu 21, která vzniká v 1-2 % na podkladě zárodečného mozaicismu. Pacienti s tímto typem změny mají mírnější projevy Downova syndromu (Papavassiliou et al., 2015). Navíc onemocnění doprovázená MR s dominantní dědičností se mohou u pacientů projevit na základě přítomnosti mozaicistní formy aberace u některého z rodičů, který je však klinicky bez příznaků. Příkladem je deficit *GATAD2B* (*GATA* zinc finger domain-containing 2B) nebo Wiedemannův-Steinerův syndrom, které jsou doprovázeny MR, faciálními dysmorfiiemi a dalšími klinickými projevy (Kaur et al., 2019, Baer et al., 2018). Mozaicismus je také asociován s abnormálním vývojem mozku. Ukazuje se, že je jednou z příčin poruchy migrace neuronů. Kromě toho přispívá k neurovývojovým onemocněním bez viditelných lézí, včetně epileptických encefalopatií, mentálního postižení a poruch autistického spektra a může tak přispívat k široké škále neuropsychiatrických onemocnění (D´Gama et al., 2018).

## 5.5 Aberace mitochondriálního genomu

Aberace mitochondriální DNA (mtDNA) mohou změnit normální energetický metabolismus v mozku, což přispívá k vývoji onemocnění doprovázených MR a/nebo PAS (Cruz et al., 2019). Mezi mitochondriální choroby patří zejména Leighova choroba (LCh), Mitochondriální encefalomyopatie s laktátovou acidózou a iktu podobné epizody (MELAS), MERRF (myoklonická epilepsie s potrhanými červenými svalovými vlákny) a samotná porucha autistického spektra (PAS) (Altmann et al., 2016, Finsterer et al., 2016, Lake et al., 2016, Wang et al., 2016). Navíc jsou aberace mtDNA pozorovány i u ADHD, Rettova syndromu, bipolární poruchy, demence, Pearsonova nebo Wolfranova syndromu a mnoha dalších asociovaných MR a/nebo PAS (Cruz et al., 2019). Mezi nejčastější aberace patří SNP (79 %, Single Nucleotide Polymorphisms), které se nachází zejména v proteinkódujících regionech mtDNA, následované delecemi, které jsou pozorovány v 15 % případů (Obr. 3. Cruz et al., 2019).

**Obrázek 3:** Rozložení aberací mtDNA (převzato z Cruz et al., 2019)



## 5.6 Možnosti genetické diagnostiky u pacientů s MR a/nebo PAS

Stanovení genetických aberací u pacientů s MR a/nebo PAS se odvíjí od principu a rozlišovací schopnosti jednotlivých metod (Wayhelova et al., 2019, Procházka et al., 2018).

Stanovení karyotypu běžně disponuje rozlišením aberace větší než 5 Mb. Tato metoda může odhalit chromozomální změnu až u 6 % pacientů s MR a/nebo PAS (Wayhelova et al., 2019). Výhodou této metody je komplexní pohled na strukturu chromozomů, který umožňuje kromě nebalancovaných změn i záchyt balancovaných translokací (Procházka et al., 2018). Tyto balancované translokace obvykle nepostihují své nositele, ale zvyšují pravděpodobnost chromozomální aberace u potomka takového nosiče. Příkladem je t(21;21) u jednoho z rodičů představuje 100% šanci Downova syndromu u potomka nebo t(14;21) má 25% šanci potomka s trizomií 21 (Yan et al., 2017, Honda et al., 2000). Nevýhodou této metody je její malé rozlišení, které neumožňuje stanovení syndromů podmíněných menšími změnami ( $\leq 5$  Mb) jako například CNV (copy number variant) nebo sekvenční změny genomu (Wayhelova et al., 2019). Hybridizací barevně značených sond ke specificky určeným místům chromozomů (fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH) lze stanovit mozaicistní formy aberací nebo některé známé deleční syndromy, které mají rozsah řádově v desítkách kilobází a větší (např. Di Georgův syndrom). Avšak FISH neposkytuje analýzu celého genomu, nezachytí sekvenční změny ani neodliší tandemově duplikovaný úsek chromozomu (Procházka et al., 2018).

Většího rozlišení ( $\leq 5$  Mb) lze dosáhnout s použitím molekulárně genetických metod. Nejrozšířenější metodou pro stanovení CNV je čipová technologie aCGH (Array comparative genomic hybridization), která sleduje celý genom najednou včetně mozaik. U pacientů s MR a/nebo PAS je záchytnost duplikací a delecí 3 – 10x vyšší než u stanovení konvenčním karyotypem (Wayhelova et al., 2019). Další často používanou metodou při vyšetřování pacientů s MR a/nebo PAS je SNP aCGH (Single nucleotide polymorphism aCGH), která umožňuje i stanovení UPD a polyploidii (Riggs et al., 2020, Adang et al., 2017, Chien et al. 2010, Bergbaum et al., 2016). Ačkoliv CNV analýzu lze provést i metodami MLPA a MS MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification, methyl specific MLPA), nejsou tyto techniky vhodné k záchytu mozaicistních forem aberací na rozdíl od aCGH nebo SNP aCGH. Navíc vyšetřování metodami MLPA a MS MLPA je cílené a neposkytuje informaci o zbylých oblastech genomu (Capkova et al., 2019, Loghmani et al., 2014). Vyšetření přítomnosti CNV je dnes indikováno na základě mezinárodních doporučení (Ho et al., 2016, Kearney et al., 2011)



u všech pacientů s MR a/nebo PAS po vyloučení chromozomálních aberací konvenčním karyotypem a po vyloučení mutací v genu *FMR1* (syndrom Fragilního X), které se sledují fragmentační analýzou a sekvenačními metodami (Richards et al., 2015, Ho et al., 2016, Kearney et al., 2011). Avšak metody CNV analýzy (aCGH, SNP aCGH, MLPA, MS MLPA) neodhalí balancované translokace a sekvenční změny u monogenních onemocnění (Riggs et al., 2020, Adang et al., 2017, Chien et al. 2010, Bergbaum et al., 2016). Navíc odhalují i CNV, jejichž klinická interpretace je zatížena jevy neúplné penetrance a variabilní expresivity (Sanders et al., 2015, Borlot et al., 2017).

Aberace genomu menší než 10 kb, které doprovází MR a /nebo PAS, jsou stanovovány pomocí sekvenačních technik (Sangerovo sekvenování a Masivně paralelní sekvenování / Next generation sequencing). Sangerovo sekvenování je v praxi aplikováno zejména u dobře popsaných syndromů (Rettův syndrom, tuberózní skleróza, neurofibromatóza typu 1) (Lallar et al., 2018, Suspitsin et al., 2018, Zhang et al., 2015). Avšak tato metoda není schopna odhalit minoritní mozaicistní formy aberací. Masivně paralelní sekvenování / Next generation sequencing (MPS / NGS) je díky své kapacitě schopno vyšetřit více vybraných genů v jediném experimentu (panelové sekvenování) včetně stanovení mozaicistních forem aberací, příkladem je syndrom Noonanové (*PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*) nebo vybrané série genů asociovaných s rozvojem MR (Tafazoli et al., 2018, Erger et al., 2019). U pacientů s autismem bez dalších klinických znaků (MR, epilepsie, faciální dysmorfické rysy aj.) je vzhledem k nedostatku rigorózních dat panelové sekvenování prováděno jen na výzkumné úrovni (Sanders et al., 2017).

MPS lze také využít k analýze všech kódujících regionů DNA (celoexomové sekvenování/whole exome sequencing, WES) nebo i celého lidského genomu (celogenomové sekvenování/whole genome sequencing, WGS) (LaDuca et al. 2017, Voelkerding et al., 2009). Avšak záchytnost těchto přístupů je omezená na současnou znalost nalezených nukleotidových změn a genů, ve kterých se nachází (LaDuca et al. 2017, Sanders et al., 2017). WES a WGS vyžadují další nástroje k objasnění klinické interpretace nálezů (analýza TRIO, expresní a funkční studie, CRISPR atd.) a v klinické praxi se běžně neprovádí (Hu et al., 2009, Menashe et al., 2013, Yu et al., 2020).

Vedle změn DNA a chromozomů předpokládají současné studie velký vliv epigenetických mechanismů (modifikace histonů, metylace DNA a mikroRNA) na vznik MR a/nebo PAS. Klinicky se analyzuje pouze metylace DNA metodami SNP aCGH popř. lokus specifickými metodami (MS MLPA, metylačně senzitivní PCR, restriční štěpení). Stanovovány jsou zejména

Praderův-Williho nebo Angelmanův syndrom a UPD. Zbylé mechanismy epigenetické regulace exprese genů jsou založeny na různých principech a vzhledem k nedostatku klinických dat se v praxi zatím nepoužívají (např. imunoprecipitační čipové technologie, CHIP-on-chip). (Fazzari et al., 2010). Obdobnou situace je i u mtDNA. Klinicky jsou analyzovány pouze dobře popsané syndromy jako jsou Leighova choroba LCh, MELAS a MERRF (Finsterer et al., 2016, Lake et al., 2016, Wang et al., 2016).

## 6 Cíle práce

- I. Analýza klinických dat pacientů s mentální retardací (MR) a poruchou autistického spektra (PAS).
- II. CNV analýza pacientů s mentální retardací (MR) a poruchou autistického spektra (PAS).
- III. CNV analýza u pacientů s MR a PAS metodami MLPA, MS MLPA, aCGH a SNP aCGH.
- IV. Vyhodnocení dat získaných CNV analýzou.
- V. Porovnání dosažených výsledků CNV analýzy mezi MR a PAS.
- VI. Korelace klinických a genetických dat u pacientů s mentální retardací (MR) a poruchou autistického spektra (PAS).
- VII. Stanovení významu vybraných klinických znaků na výsledky CNV pro skupiny pacientů s PAS a MR.
- VIII. Analýza klinického obrazu pacientů s opakujícími se variantami neznámého významu.

## **7 Materiál a metodika**

### **7.1 Biologický materiál a charakteristika pacientů**

Tato práce se věnuje klinické a genetické analýze pacientů s MR a/nebo PAS, kteří byli konzultováni klinickými genetiky na Ústavu lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Olomouci v letech 2012-2018. Diagnóza MR a/nebo PAS u pacientů byla provedena psychiatricky, pedo-psychiatricky, psychologicky, neurologicky a pediately, kteří při jejím stanovování postupovali podle platných doporučení svých odborných společností. U pacientů s MR byla navíc vyloučena nejčastější metabolická onemocnění. Na základě diagnózy byli pacienti doporučeni ke genetickému testování. Dle platných doporučení Společnosti lékařské genetiky a genomiky byl u pacientů s MR a/nebo PAS stanoven karyotyp a provedena analýza syndromu Fragilního X. Bylo vybráno celkem 204 pacientů s MR a/nebo PAS, u kterých byla obě vyšetření negativní. U těchto pacientů byla retrospektivně provedena analýza CNV metodami MLPA, MS MLPA, aCGH, a SNP aCGH z uskladněné izolované DNA za informovaného souhlasu zákonných zástupců pacientů (IS, Příloha č. 1) a souhlasu Etické komise Univerzity Palackého Olomouc a Fakultní nemocnice v Olomouci (IRB číslo 96/17). Výsledná skupina pacientů (204) zahrnovala 90 pacientů s MR (51 mužů, 39 žen) ve věku 5-35 let a 114 pacientů s PAS (78 mužů, 36 žen) ve věku 3-18 let. Skupina pacientů s PAS zahrnovala 96 pacientů s mentální retardací.

### **7.2 Příprava MLPA**

Pro analýzu MLPA bylo použito 5  $\mu$ l izolované DNA o koncentraci 15 ng/ $\mu$ l, která byla denaturována 5 min při 98 °C a následně ochlazena na 25 °C. Při této teplotě byly přidány 3  $\mu$ l směsi probe mixu (Tab. 5) a MLPA Salsa Pufu (1:1). Výsledný mix byl opět krátce denaturován (1 min, 95 °C) a přiveden k hybridizační teplotě 60 °C. Hybridizace probíhala přes noc (16-20 hod.). Hybridizovaná směs byla následně ochlazena na 54 °C a bylo k ní přidáno 32  $\mu$ l Ligačního mixu (Tab. 6). Výsledná směs byla ponechána při teplotě 54 °C 15 min a následně byla aktivita ligázy ukončena denaturací při teplotě 98 °C po dobu 5 min. Po ochlazení směsi na 20 °C bylo přidáno 10  $\mu$ l PCR mixu (Tab. 7). PCR reakce byla provedena dle teplotního schématu v tabulce 8. Výsledné produkty byly separovány pomocí kapilární elektroforézy v

přístroji ABI 3130 s filtrem G5, kapilárami o délce 36 cm a plněné polymerem POP7<sup>TM</sup> (Tab. 9). Výsledky byly analyzovány softwarem Coffalyser (dostupný z Coffalyser.Net).

**Tabulka 5:** Seznam použitých MLPA SALSA probemixů

Název probemixu	Číslo produktu	Poznámka
Subtelomery 1	P036	Příloha č. 2
Subtelomery 2B	P070	Příloha č. 3
Mentální retardace, X vázaná	P106	Příloha č. 4
Mikrodeleční syndromy 1A	P245	Příloha č. 5
Mikrodeleční syndromy 2	P297	Příloha č. 6
Autismus 1	P343	Příloha č. 7

**Tabulka 6:** Složení Ligačního mixu na přípravu jedné reakce

Reagencie	Objem
H <sub>2</sub> O (v PCR čistotě)	25 µl
Ligase pufr A	3 µl
Ligase pufr B	3 µl
Ligase-65 enzym	1 µl
Celkem	30 µl

**Tabulka 7:** Složení PCR mixu na přípravu jedné reakce

Reagencie	Objem
H <sub>2</sub> O (v PCR čistotě)	7,5 µl
SALSA PCR primer mix	2,0 µl
SALSA polymeráza	0,5 µl
Celkem	10,0 µl

**Tabulka 8:** Teplotní profil PCR reakce

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	30 s	35x
60 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	20 min	1x
15 °C	neomezeno	1x

**Tabulka 9:** Nastavení separačních podmínek v přístroji ABI 3130

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Teplota při separaci vzorku	60 °C
Elektrické napětí při nástřiku vzorku	1,2 kV
Doba nástřiku vzorku	12 s
Elektrické napětí separace vzorku	15 kV
Čas separace vzorku	1 000 s

### 7.3 Příprava aCGH a SNP aCGH

Analýza aCGH a SNP aCGH byla provedena u 175 vzorků uskladněné DNA. Vzorky byly analyzovány za pomoci aCGH a SNP aCGH technologií od tří výrobců (Agilent Technologies, Illumina, Affymetrix). Platforma od společnosti Illumina byla použita v laboratořích společnosti Gennet, s.r.o. (Praha) s přístrojem CytoSNP-12 (Illumina, San Diego, CA, USA), Affymetrix byl použit na pracovišti Ústavu molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého v Olomouci (ÚMTM) za použití Cytoscan HD (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) a Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis (Agilent, Santa Clara, CA, USA) byl použit na pracovišti Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc (ÚLG). Externí pracoviště ÚMTM a Gennet, s.r.o. postupovali podle pokynů výrobce (dostupné z [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com), [www.illumina.com](http://www.illumina.com)) a k vyvolání CNV byly použity programy Illumina KaryoStudio 1.3 (Genome Studio v2011.1) a CHAS v1.2.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

#### *Příprava Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis*

##### 1) Přečištění DNA

25 µg vyizolované DNA bylo doplněno fosfátovým pufrem (PBS, pH 7,4) na celkový objem 220 µl v 1,5ml zkumavce. Ke směsi bylo přidáno 20 µl proteinasy K a 4 µl RNasy A (100 mg/ml). Směs byla promíchána a inkubována 2 min při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 200 µl AL pufru a opět byla směs inkubována 10 min při 56 °C. Po inkubaci byl přidán 100% EtOH

o objemu 200  $\mu$ l. Obsah zkumavky byl přenesen do DNeasy Mini Spin Column a centrifugován 1 min při 6000 g. DNA zadržaná na kolonce byla promyta 500  $\mu$ l AW1 pufru a 500  $\mu$ l AW2. Přečištěná DNA byla eluována 400  $\mu$ l AE pufru do čisté 1,5ml zkumavky 1 min při 6000 g.

## 2) Kontrola množství a kvality gDNA

Množství gDNA bylo měřeno pomocí Qubit BR assay. Celá assay byla inkubována na pokojovou teplotu 1 hod. před použitím. Pracovní roztok byl připraven v poměru 1:199 (Qubit dsDNA BR reagent : Qubit dsDNA BR buffer) pro každý vzorek a pro dva kalibrační standardy. Do 0,5ml zkumavek (Mikrozkumavky na Qubit 0,5ml) bylo přidáno 190  $\mu$ l pracovního roztoku a 10  $\mu$ l vzorku gDNA (popř. kalibračního standardu). Směs byla promíchána, krátce stočena a ponechána ve tmě 2 min při laboratorní teplotě. Po kalibraci měřicího přístroje (Qubit) pomocí dvou kalibračních standardů byly vzorky změřené a koncentrace byla zapsána. Kvalita gDNA byla ověřena pomocí UV-VIS Spektrofotometrie. gDNA splňovala minimální požadavky na čistotu (tj.  $A_{260}/A_{280} = 1,8-2$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 1$ ) (Agilent).

## 3) Značení gDNA

Značení gDNA bylo připraveno na množství 8 vzorků (8-pack). Vzorky byly doplněny PCR clear vodou na výsledný objem 13  $\mu$ l s maximálně 500 ng gDNA. Do každého vzorku byly přidány Random primery o objemu 2,5  $\mu$ l. Směs s random primery byla denaturována při 98 °C po dobu 10 min a následně byla ochlazená na 4 °C. K denaturovaným vzorkům bylo následně přidáno 9,5  $\mu$ l Labeling Master Mix pro Cy-5 (Tab. 10). Komerčně dodávané gDNA byly použity jako negativní reference, ke kterým byl po přidání random primerů a denaturaci přidán Labeling Master Mix pro Cy-3 (Tab. 11). Vzorky i negativní reference doplněné o Labeling Master Mix byly inkubovány 20 hod při 37° C a následně 10 min při 65 °C. Výsledné produkty byly ochlazeny na 4 °C.

**Tabulka 10:** Příprava Labeling Master Mix pro Cy-5 pro vzorky

Reagencie	pro 8-pack	
	1 reakce (μl)	8 reakcí (μl)
5x Reakční pufr	5	42,5
10x dNTPs	2,5	21,25
Cyanine 5-dUTP	1,5	12,75
Exo (-) Klenow	0,5	4,25
Celkem	9,5	80,75

**Tabulka 11:** Příprava Labeling Master Mix pro Cy-3 pro negativní reference

Reagencie	pro 8-pack	
	1 reakce (μl)	8 reakcí (μl)
5x Reakční pufr	5,0	42,50
10x dNTPs	2,5	21,25
Cyanine 3-dUTP	1,5	12,75
Exo (-) Klenow	0,5	4,25
Celkem	9,5	80,75

## 4) Přechištění značené gDNA

Každá značená gDNA vzorku a negativní kontroly byla přechištěna pomocí kolonky, na kterou byla přenesena společně s 430 μl 1xTE o pH 8. Následně byla kolonka stočena 10 min 14 000 g v nové zkumavce o objemu 2ml. Značená gDNA zachycená na kolonce byla promyta dvakrát 480 μl 1xTE o pH 8. Promývání bylo provedeno za centrifugace o 14 000 g po dobu 30 min. Přechištěná značená gDNA byla eluována přetočením kolonky a stočením (1 min, 1 000 g ) do čisté zkumavky. Eluovaný objem se pohyboval v rozmezí 15-17 μl.

## 5) Měření specifické aktivity a výpočet výtěžku

K měření specifické aktivity značené gDNA vzorků a kontrol bylo provedeno přístrojem Nanodrop a měřicím modulem MicroArray Measurement. Jako blank sloužil roztok 1xTE o pH 8. Výpočet výtěžku byl proveden podle rovnic 1, 2 a 3. Do nové zkumavky bylo přidáno po 8 μl značené gDNA vzorku a negativní kontroly s podobným výtěžkem jako konkrétní vzorek, ke kterému byla přidána.



**Rovnice 1:** Výpočet stupně značení

$$\text{Stupeň značení}[\%] = \left( \frac{340 * \text{Koncentrace značené gDNA}[\text{pmol}/\mu\text{l}]}{1000 * \text{Koncentrace gDNA}[\text{ng}/\mu\text{l}]} \right) * 100$$

**Rovnice 2:** Výpočet specifické aktivity

$$\text{Specifická aktivita}[\text{pmol}/\mu\text{g}] = \frac{\text{Stupeň značení}[\%]}{0.034}$$

**Rovnice 3:** Výpočet výtěžku značení

$$\text{Výtěžek}[\mu\text{g}] = \frac{\text{Koncentrace gDNA}[\text{ng}/\mu\text{l}] * \text{Objem eluátu po přečištění}[\mu\text{l}]}{1000}$$

#### 6) Hybridizace značené gDNA

gDNA byly denaturovány s 29  $\mu\text{l}$  hybridizačního master mixu (Tab. 12) po dobu 3 min a teplotě 98 °C a po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Denaturovaný produkt byl při teplotě 37 °C napipetován do gasketu a přiklopen sklíčkem SurePrint G3 Human CGH Microarray 8x60K. Hybridizace značené gDNA na sklíčko se sondami probíhala 18 hod. při otáčkách 20 rpm, teplotě 67 °C.

**Tabulka 12:** Příprava hybridizačního mixu

Reagencie	8-pack ( $\mu\text{l}$ )
Cot-1 DNA	17,00
10xaCGH Blocking Agent	38,25
2x HI-RPM Hybridization Buffer	191,25
Celkem na 8 reakcí	246,5

#### 7) Promytí hybridizovaného sklíčka

K promytí hybridizovaného sklíčka byly použity Promývací pufr 1 o pokojové teplotě a Promývací pufr 2 vyhřátý na 37 °C. Každý pufr byl umístěn na magnetickou míchačku. Každý pufr promýval hybridizované sklíčko po dobu 5 min. Na konec bylo sklíčko okapáno do buničiny a uschováno do tmy při pokojové teplotě.

## 8) Scan hybridizovaného sklíčka a jeho digitální zpracování

Signály z hybridizovaného sklíčka byly scanovány přístrojem Agilent G2565CA Microarray Scanner System. a digitalizovány softwarem CytoGenomics (Agilent Technologies).

### *Uložení dat z aCGH a SNP aCGH analýz*

Výsledná data ze všech tří pracovišť byla na základě mezinárodních doporučení umístěna do veřejně přístupného úložiště Gene Expression Omnibus (GEO) v anonymní podobě pod značkou GSE132453 společně s MIAME (Minimum Information about a Microarray Experiment).

## **7.4 Klinická interpretace nalezených CNV**

Klinická interpretace nalezených CNV byla provedena podle mezinárodních doporučení (Kearney et al., 2011, Schaefer & Mendelsohn, 2013) za použití nejvýznamnějších genetických databází: The International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA), Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER), Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Database of genomic variants (DGV) a ClinVar databáze spravované Mezinárodním centrem pro biotechnologická data (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

## **7.5 Statistická analýza klinických a genetických nálezů**

Ke stanovení rozdílů četností u pozorovaných klinických znaků, které se v celém souboru vyskytovaly s četností vyšší než 4, mezi oběma skupinami pacientů bylo využito Fisherova exaktního testu. Ke stanovení rozdílů distribuce nalezených CNV mezi skupinami pacientů s MR a PAS byl použit F-test a Studentův T-test (na hladině významnosti  $\alpha=0.05$ ). Ke stanovení významu komorbidních znaků (ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciální dysmorfické rysy, růstová restrikce, VVV srdce, mozku a urogenitálního traktu) na pravděpodobnost zachycení patogenní varianty byl použit Fisherův exaktní test. Vliv nejvýznamnějších

komorbidních znaků na pravděpodobnost záchytu patogenní varianty byl analyzován pomocí logistické regrese pro jednotlivé skupiny pacientů zvlášť. Logistická regrese byla zpracovaná analytickou společností ACREA (Praha).

## **8 Výsledky**

### **8.1 Výsledky analýzy klinických dat pacientů s MR a/nebo PAS**

V této studii bylo analyzováno 204 pacientů s MR (90) a PAS (114). Poměr 51 mužů a 39 žen ve skupině pacientů s MR nevykazoval statisticky významný rozdíl mezi pohlavími ( $p > 0,05$ ). Avšak ve skupině pacientů s PAS bylo signifikantně více mužů než žen ( $p = 0,00001$ , 78 mužů vs 36 žen). U celého souboru pacientů byly pozorovány komorbidní znaky: ADHD (60), epilepsie (22), mikro/makrocefalie (11/23), faciální dysmorfické rysy (43), růstová restrikce (16), vrozené vývojové vady (VVV) mozku (10), srdce (9), urogenitálního traktu (4), skeletu (10), hypotonie (8) a hormonální poruchy (5). Dále se v souboru vyskytovaly s četností menší než 4: kožní defekty, slepota, hluchota (nebo nedoslýchavost) a hyper/hypo sensitivita. Ve skupině MR byl významně nižší počet pacientů bez komorbidit než u pacientů s PAS ( $p = 0,0003$ , 17 vs 49). Při analýze jednotlivých komorbidních znaků byla prokázána vyšší četnost mikrocefalie, dysmorfických rysů obličeje, vývojových vad srdce a skeletu u pacientů s MR, zatímco u pacientů s PAS byla častější přítomnost ADHD. Počet pacientů s ostatními komorbiditami se mezi oběma skupinami významně nelišil. Výsledky analýzy klinických obrazů pacientů s MR a PAS shrnuje tabulka 13.

**Tabulka 13:** Výsledky analýzy klinických obrazů pacientů s MR a PAS a jejich porovnání metodou Fisherova exaktního testu

Komorbidní znak	Počet pacientů ze skupiny MR (N = 90)	Počet pacientů ze skupiny PAS (N = 114)	Dosažená p hodnota
ADHD	17 (18,9 %)	43 (37,7 %)	$p = 0,003$
Epilepsie	14 (15,6 %)	8 (7,0 %)	ns
Mikrocefálie	18 (20,0 %)	5 (4,4 %)	$p = 0,001$
Makrocefálie	7 (7,8 %)	4 (3,5 %)	ns
Dysmorfie obličeje	29 (32,0 %)	14 (12,3 %)	$p = 0,001$
VVV mozku	7 (7,8 %)	3 (2,6 %)	ns
VVV srdce	8 (8,9 %)	1 (0,9 %)	$p = 0,011$
VVV urogenitálního traktu	3 (3,3 %)	1 (0,9 %)	ns
VVV skeletu	9 (0,1 %)	1 (0,9 %)	$p = 0,005$
Hypotonie	4 (4,4 %)	4 (3,5 %)	ns
Růstová restrikce	10 (11,1 %)	6 (5,3 %)	ns
Hormonální defekty	3 (3,3 %)	2 (1,8 %)	ns

*ADHD-hyperaktivita, VVV-vrozené vývojové vady, MR-pacienti s mentální retardací, PAS-pacienti s poruchou autistického spektra, ns-not significant*

## 8.2 Výsledky CNV analýzy pacientů s MR a/nebo PAS

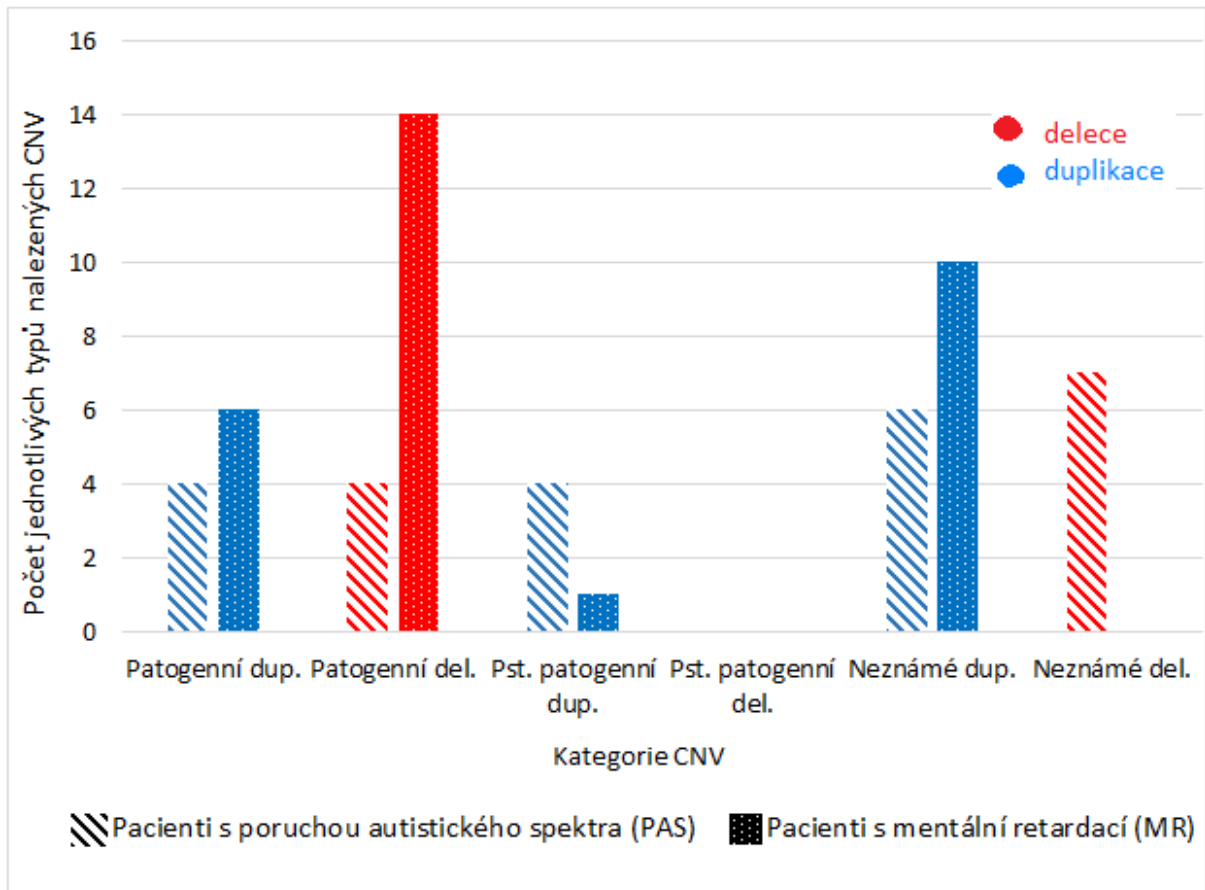
CNV analýza byla provedena na souboru 204 vyizolovaných DNA od pacientů s MR a PAS. Metoda MLPA byla provedena u všech vzorků k rychlému screeningu vybraných oblastí genomu asociovaných se vznikem MR a PAS. Metody aCGH a SNP aCGH byly provedeny u 108 pacientů s PAS a u 67 pacientů s MR. Celkem bylo 26 pacientů nositelů patogenní CNV (MR = 18, PAS = 8), 4 pacienti byli nositeli pravděpodobně patogenní CNV (MR = 1, PAS = 3) a 25 pacientů neslo CNV s neznámým významem (MR = 12, PAS = 13). V celém souboru bylo zachyceno celkem 150 benigních a pravděpodobně benigních CNV, avšak pouze u 106 pacientů (MR = 35, PAS = 71) bylo zachyceno 96 benigních a pravděpodobně benigních CNV (MR = 45, PAS = 51) bez koincidence dalších CNV zbylých kategorií. U 23 pacientů (MR = 23, PAS = 6) byla vyloučena přítomnost patogenní CNV metodou MLPA. Počet nalezených CNV metodami aCGH a SNP aCGH pro jednotlivé skupiny a kategorie je znázorněn v tabulce 14 a obrázku 3.

**Tabulka 14:** Počet zachycených CNV u 175 pacientů metodami *aCGH* a *SNP aCGH*

Kategorie CNV	Typ CNV	Počet CNV u PAS	Počet CNV u MR
Patogenní CNV	dup.	4	6
	del.	4	14
Pravděpodobně patogenní	dup.	4	1
	del.	0	0
Neznámá CNV	dup.	6	10
	del.	7	0
Pravděpodobně benigní a benigní	dup. a del.	81	66

*CNV-copy number variant, PAS-pacienti s poruchou autistického spektra, MR-pacienti s mentální retardací, dup.-duplikace, del.-delece*

**Obrázek 4:** Distribuce jednotlivých typů a kategorií CNV mezi skupinami pacientů s PAS a MR



*Pst.-pravděpodobně, dup.-duplikace, del.-delece, CNV- copy number variant*

### Patogenní CNV

Metodami MLPA, MS MLPA, aCGH a SNP aCGH bylo zachyceno 28 patogenních variant (MR = 20, PAS = 8) u 26 pacientů (MR = 18, PAS = 8). U skupiny MR je významně vyšší zastoupení pacientů s patogenní CNV než u skupiny PAS ( $p = 0,004$ ). Celkem bylo zachyceno 10 duplikací (MR = 6, PAS = 4) a 18 delecí (MR = 14, PAS = 4). U dvou pacientů ze skupiny MR se vyskytovaly dvě patogenní varianty najednou; duplikace 1q21.1 a delece 7q11.23, duplikace 14q31.3 a delece 12p13.33. T test prokázal rozdílnou distribuci patogenních CNV mezi skupinami pacientů s PAS a MR ( $t=0,014$ ). Přehled zachycených patogenních CNV je znázorněn v tabulce 15 a obrázku 4.

**Tabulka 15:** Přehled zachycených patogenních CNV 1. část

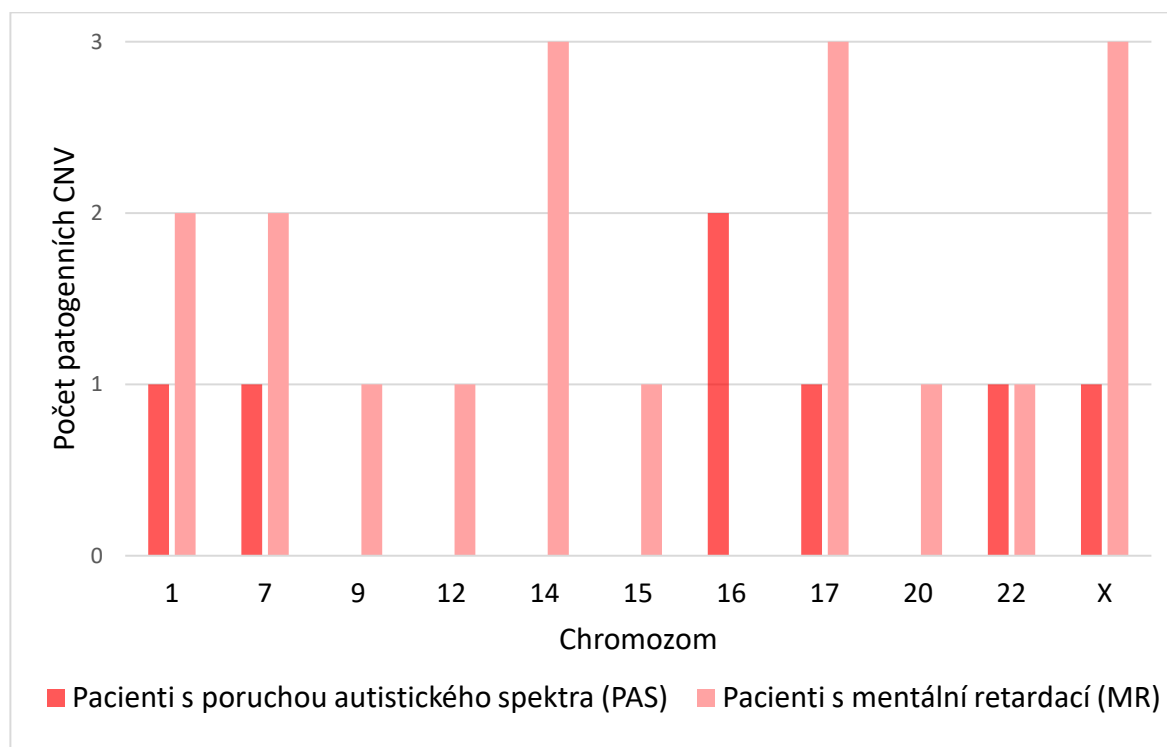
Cytoband	Typ CNV	Původ	Skupina	Koordináta		Velikost (kb)	Klinický obraz
1q21.1	dup.	<i>de novo</i>	PAS	146476526	147825662	1300	epilepsie
		nz	MR	146501348	147752568	1251	
1q21.1	del.	pat	MR	145372549	145888926	516	ADHD, dysmorfie obličeje, VVV srdce a urogenitálního traktu
7q33q36	del.	nz	MR	136289656	148069342	11780	dysmorfie obličeje, growth defects
7q11.23	del.	nz	PAS	72701018	74143060	1442	dysmorfie obličeje
7q11.23	del.	nz	MR	72722981	74138121	1415	
9q	del.	nz*	MR	140623027	140838033	215	epilepsie, mikrocefalie
12p13.33	del.	nz	MR	1	5168849	5169	dysmorfie obličeje, mikrocefalie
14q31.3	dup.	nz	MR	86991381	107283504	20292	dysmorfie obličeje, mikrocefalie
14q31.3-q32.12	del.	<i>de novo</i>	MR	87390293	92177983	4788	dysmorfie obličeje
		<i>de novo</i>	MR	87390293	92177983	4788	dysmorfie obličeje

**Tabulka 16:** Přehled zachycených patogenních CNV 2. část

Cytoband	Typ CNV	Původ	Skupina	Koordináta		Velikost (kb)	Klinický obraz
14q31.3-q32.12	dup.	nz	MR	91474831	107282437	15808	VVV mozku, růstová restrikce
15q13.3	del.	mat	MR	30955149	32515681	1561	
		nz	MR	30954726	32899558	1945	dysmorfie obličeje, mikrocefalie
16p11.2-p12.2	del.	pat	PAS	29600878	30177240	576	ADHD
16p11.2	dup.	mat	PAS	29673954	30332581	659	epilepsie
16p11.2		pat	PAS	29600878	30177240	576	ADHD, dysmorfie obličeje
17q12	del.	nz	PAS	34437481	36244332	1807	ADHD, epilepsie, dysmorfie obličeje
17p13.3	dup.	nz	MR	880450	1610585	730	dysmorfie obličeje
17q21.31	del.	<i>de novo</i>	MR	43675458	44212416	537	epilepsie, dysmorfie obličeje
17q11.2q12	dup.	nz	MR	26807734	29840418	3033	mikrocefálie, růstová restrikce
20q13.33	del.	nz	MR	61323418	62909908	1586	dysmorfie obličeje, mikrocefálie
22q11	del.	nz	MR	18844632	21068659	2224	ADHD, epilepsie, dysmorfie obličeje
		<i>de novo</i>	PAS	20733667	21460220	727	dysmorfie obličeje
Xq21.1-q21.31**	del.	mat	MR	81324685	86231162	4906	ADHD
Xp22.11	dup.	nz	MR	23034085	28429500	751	
Xp21.2-p21.1	del.	nz	MR	29698622	34735336	5036	mikrocefálie
Xp11.22**	dup.	<i>de novo</i>	PAS	53449448	53459046	9598	ADHD, makrocefálie

\*vyloučen maternální původ, \*\*mužské pohlaví, pat-paternální, mat-maternální, nz-neznámý, dup.-duplikace, del.-delece, CNV-copy number variant, PAS-pacienti s poruchou autistického spektra, MR-pacienti s mentální retardací, ADHD-hyperaktivita, VVV-vrozená vývojová vada

**Obrázek 5:** Distribuce patogenních CNV na jednotlivých chromozomech pro jednotlivé skupiny pacientů



*CNV-copy number variant*

#### *Pravděpodobně patogenní CNV*

Metodami MLPA, MS MLPA, aCGH a SNP aCGH bylo zachyceno 5 pravděpodobně patogenních variant (MR = 1, PAS = 4) u 4 pacientů (MR = 1, PAS = 2). V této kategorii byly zachyceny pouze duplikace. Ve skupině PAS byly duplikovány oblasti chromozomů 3, 20 a X a u pacientky s MR se duplikace nacházela na chromozomu 3 (3p26.3). Duplikace oblasti chromozomu 3, 20 a X se vyskytovaly společně u jednoho pacienta s PAS (3q24, 20q13.32, Xq27.1-q27.3), druhá pacientka byla nositelem pouze jedné duplikace na X chromozomu (Xp11.4) (Tab. 16). Duplikace zasáhly 24 OMIM protein kódujících genů. 2 z těchto genů byly popsány v databázi SFARI a zároveň bylo jejich skóre  $\leq 3$  (*CNTN4* a *CNTN6*). Dva geny jsou popisovány v databázi OMIM jako příčina onemocnění s klinickým obrazem, který zahrnuje poruchy chování a/nebo poškození centrální nervové soustavy (CNS) a zároveň se jedná o dědičnost autozomálně dominantní (*GNAS*, *ZIC1*). Gen *TSPAN7* je popisován jako příčina mentální retardace, X-vázané (MIM:300210) s X vázanou recesivní dědičností. Duplikace *TSPAN7* byla zachycena u pacientky s PAS (Tab. 17). U 5 genů jsou popsány patogenní a/nebo pravděpodobně patogenní změnou



menšího rozsahu (< 50 pb) dle databáze ClinVar. Tyto změny jsou zároveň asociovány s autistickým chováním, mentální retardací a/nebo malformací mozku (*CNTN6*, *GNAS*, *SOX3*, *TSPAN7* a *ZIC1*) (Tab. 18). Geny *ATP11C* a *F9* mohou být poškozeny patogenními a pravděpodobně patogenními změnami, které jsou menší než 50 pb, avšak tyto změny nejsou asociovány s poruchou chování a/nebo poruchou CNS (Příloha č. 8).

**Tabulka 17:** Přehled klinických obrazů pacientů s pravděpodobně patogenními CNV

Skupina	Cytoband	Zasažené OMIM geny	OMIM číslo asociovaného onemocnění* (typ dědičnosti)	Pohlaví	Původ	Klinický obraz
MR	3p26.3	<i>CNTN4</i>	-	F	mat.	mikrocefálie
		<i>CNTN6</i>	-			
PAS	3q24	<i>ZIC1</i>	616602 (AD)	M	<i>de novo</i>	makrocefálie, ADHD
		<i>ZIC4</i>	-			
	20q13.32	<i>GNAS</i>	103580 (AD), 612462 (AD), 612463 (AD)			
		<i>ATP11C</i>	-			
	Xq27.1-q27.3	<i>CDR1</i>	-			
		<i>F9</i>	-			
		<i>LDOC1</i>	-			
		<i>MAGEC1, -2, -3</i>	-			
		<i>MCF2</i>	-			
		<i>SLITRK4</i>	-			
<i>SOX3</i>		300123 (-)				
<i>SPANXA1, -A2, -B1, -B2, -C, -D, -N3, -N</i>	-					
PAS	Xp11.4	<i>TSPAN7</i>	300210 (XLR)	F	nz.	-

\* *onemocnění asociované s genem a zahrnující se změnami chování, vývojovým poškozením nervové soustavy a/nebo mozku, OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man databáze, SFARI-Simons Foundation Autism Research Initiative, AD-autozomálně dominantní, XLR-X vázaná recesivní, nz.-neznámý, F-žena, M-muž, MR-pacienti s mentální retardací, PAS-pacienti s poruchou autistického spektra*

**Tabulka 18:** Přehled pravděpodobně patogenních CNV a jejich nejvýznamnějších genů

Skupina	Cytoband	Koordináta		Zasažené OMIM geny	SFARI skóre	OMIM číslo asociovaného onemocnění* (typ dědičnosti)
MR	3p26.3	1356628	2231148	<i>CNTN4</i>	2	-
				<i>CNTN6</i>	3	-
PAS	3q24	147104045	147134057	<i>ZIC1</i>	-	616602 (AD)
				<i>ZIC4</i>	-	-
	Xq27.1-q27.3	138614319	143156110	<i>GNAS</i>	4	103580 (AD), 612462 (AD), 612463 (AD)
				<i>ATP11C</i>	-	-
				<i>CDR1</i>	-	-
				<i>F9</i>	4	-
				<i>LDOC1</i>	-	-
				<i>MAGEC1, -2, -3</i>	-	-
				<i>MCF2</i>	-	-
				<i>SLITRK4</i>	-	-
<i>SOX3</i>	-	300123 (-)				
<i>SPANXA1, -A2, -B1, -B2, -C, -D, -N3, -N</i>	-	-				
PAS	Xp11.4	38486618	38634614	<i>TSPAN7</i>	4	300210 (XLR)

\* onemocnění asociované s genem a zahrnující se změnami chování, vývojovým poškozením nervové soustavy a/nebo mozku, OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man databáze, SFARI-Simons Foundation Autism Research Initiative, AD-autozomálně dominantní, XLR-X vázaná, MR-pacienti s mentální retardací, PAS- pacienti s poruchou autistického spektra recesivní

**Tabulka 19:** Přehled popsany patogenních a pravděpodobně patogenních změn menších než 50 pb v databázi CVlinVar v genech zasažených pravděpodobně patogenní CNV

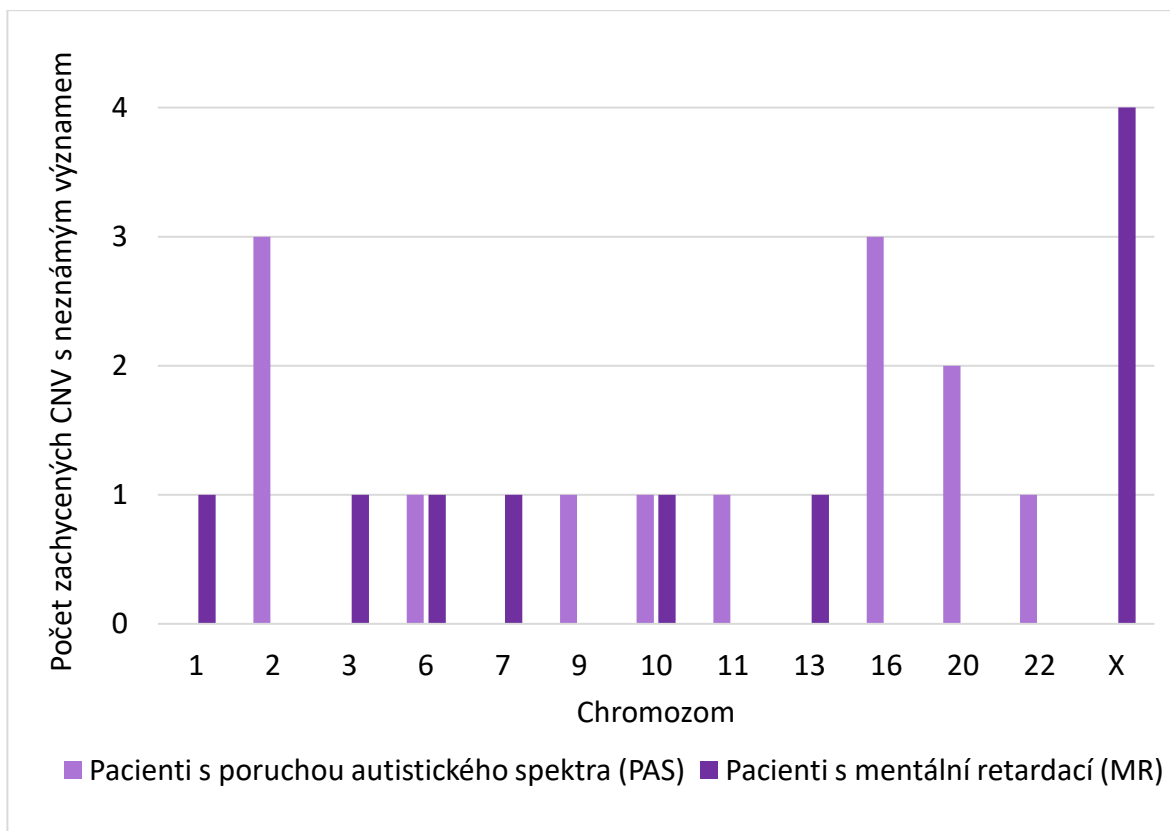
Skupina	Cytoband	Zasažené OMIM geny	RPKM průměr ± směrodatná odchylka**	Popsané změny < 50pb ** (chr:koordináta dle GRCh37)	
				Patogenní	Pst. patogenní
MR	3p26.3	<i>CNTN4</i>	2,036 ± 0,909	-	-
		<i>CNTN6</i>	0,934 ± 0,273	-	3: 1337396
PAS	3q24	<i>ZIC1</i>	3,107 ± 1,685	3: 147131157, 3: 147131159, 3: 147131192 3: 147131198	3: 147130414
		<i>ZIC4</i>	0,770 ± 0,555	-	-
	20q13.32	<i>GNAS</i>	137,233 ± 12,670	Ad. 1	Ad. 2
	Xq27.1-q27.3	<i>ATP11C</i>	1,062 ± 0,318	-	Ad. 3
		<i>CDR1</i>	-	-	-
		<i>F9</i>	0	Ad. 4	Ad. 5
		<i>LDOC1</i>	-	-	-
		<i>MAGEC1, -2, -3</i>	0	-	-
		<i>MCF2</i>	2,063 ± 0,423	-	-
		<i>SLITRK4</i>	4,300 ± 2,537	-	-
		<i>SOX3</i>	-	-	X: 139586777
<i>SPANXA1, -A2, -B1, -B2, -C, -D, -N3, -N</i>	0	-	-		
PAS	Xp11.4	<i>TSPAN7</i>	306,560 ± 91,345	X: 38540512	-

\*\*dle databáze ClinVar, Ad. 1-5- změny genů menší než 50 pb shrnuté v Příloze č. 8, RPKM-normalizovaná jednotka exprese transkriptu, OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man databáze, MR-pacienti s mentální retardací, PAS- pacienti s poruchou autistického spektra recesivní, pb- pár bází, Pst.- pravděpodobně

#### Neznámé CNV

CNV analýza zachytila 23 variant s klinicky nejasným významem. 11 pacientů s MR bylo nositeli 10 duplikací na chromozomech 1, 3, 6, 7, 10, 13 a X. U 16 pacientů s PAS bylo zachyceno 13 neznámých CNV (6 duplikací, 7 delecí) na chromozomech 2, 6, 9, 10, 11, 16, 20 a 22. Distribuce neznámých variant byla mezi jednotlivými skupinami shodná ( $t = 0,64$ ) (Obr. 5).

**Obrázek 6:** Distribuce CNV s neznámým významem pro jednotlivé skupiny pacientů



*CNV- copy number variant*

Neznámé varianty ve skupině MR byly v 46 % (5/11) případech doprovázeny další genetickou aberací, která částečně nebo zcela vysvětlovala klinický obraz pacientů. Neznámé varianty zasahující geny *FH* a *TWIST1* asociované s onemocněním doprovázeným mentální retardací (MIM 606812, 617746) byly u pacientů doprovázeny patogenní delecí 15q13.3 (Tab. 19). Ve zbylých 6 případech neznámé CNV zasahovaly do 9 OMIM protein kódujících genů, z nichž je pouze gen *SHOX* evidován v databázi SFARI (skóre 2) (Tab. 20).

**Tabulka 20:** Přehled zachycených CNV s neznámým významem a klinické obrazy ve skupině MR

Chr.	Cytoband	Dědičnost	Koordináty (GRCh37)		Velikost (kb)	Další nálezy	Klinický obraz
1	q43	nz.*	241458102	241706533	248	delece 15q13.2	Hormonální defekt
3	q12.2	nz.	100340054	100442497	102	-	Faciální dysmorfické rysy, mikrocefalie
6	q26	nz.	162722510	162912832	190	-	ADHD, VVV srdce, VVV skeletu, mikrocefalie, růstová restrikce, nedoslýchavost
7	p21.1	nz.	19156027	19218229	62	delece 15q13.2	Faciální dysmorfické rysy, mikrocefalie
10	q11.21	nz.	42826698	43377068	550	-	-
13	q31.1-q31.3	nz.	84554714	91748060	7193	mutace v COL4A4	ADHD
X	p22.2	pat.	13969904	14167680	198	-	Makrocefalie
	q23	nz.	112944254	113080119	136	duplikace 17q11.2q12	Růstová restrikce
		nz.	115408912	116197910	789	-	Růstová restrikce
	p22.33	nz.	422642	613567	191	-	Růstová restrikce
	q26.2	nz.	130817312	130980665	163	mutace v <i>BTD</i> genu	Epilepsie, hormonální defekt

\*matka vyloučena, pat.- paternálně kb- kilobáze, ADHD- hyperaktivita, VVV- vrozená vývojová vada

**Tabulka 21:** Přehled genů zasažených neznámými CNV variantami u skupiny MR

Cytoband	Další nálezy	Zasažené OMIM geny	SFARI skóre	OMIM číslo asociovaného onemocnění* (typ dědičnosti)
duplikace 1q43	delece 15q13.2	<i>FH, KMO, RGS7</i>	<i>RGS7</i> (4)	<i>FH</i> (606812, AR)
duplikace 3q12.2	-	<i>GPR128, TFG</i>	-	-
duplikace 6q26	-	<i>PARK2</i>	-	-
duplikace 7p21.1	delece 15q13.2	<i>FERD3L, TWIST1</i>	-	<i>TWIST1</i> (617746, AD)
duplikace 10q11.21	-	<i>BMS1, ZNF33B</i>	-	-
duplikace 13q31.1q31.3	mutace v <i>COL4A4</i>	<i>SLITRK5, SLITRK6</i>	<i>SLITRK5</i> (-)	-
duplikace Xp22.2	-	<i>GEMIN8</i>	-	-
duplikace Xq23	duplikace 17q11.2q12	-	-	-
	-	<i>CT83, SLC6A14</i>	-	-
duplikace Xp22.33	-	<i>SHOX</i>	<i>SHOX</i> (2)	-
duplikace Xq26.2	mutace v <i>BTD</i> genu	-	-	-

\* onemocnění asociované s genem a zahrnující se změnami chování, vývojovým poškozením nervové soustavy a/nebo mozku, OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man databáze, SFARI-Simons Foundation Autism Research Initiative, AR-autozomálně recesivní, AD-autozomálně dominantní

Neznámé varianty ve skupině PAS nebyly doprovázeny variantami s pravděpodobně patogenním nebo patogenním významem (Tab. 21). Ve skupině PAS byly zachyceny neznámé varianty, které se v souboru opakovaly: dva pacienti byli nositeli duplikace 2q37.1 zasahující gen *DIS3L2*, tři pacienti byli nositeli duplikace genu *DOCK8* (9p24.3). V souboru PAS varianty s neznámým významem celkem zasáhly 33 OMIM protein kódujících genů, z nichž 6 bylo popsáno v databázi SFARI se skóre ≤ 3 (*CTNNA3, DOCK8, MACROD2, PLCB1, PRODH* a *RBFOX1*) a 7 bylo asociováno s onemocněním doprovázejícím poruchu chování a/nebo malformace mozku s autozomálně recesivní dědičností (*CCDC115, DIS3L2, NPHP1, ORC6, PLCB1, PRODH, UQCRC2*) (Tab. 22).

**Tabulka 22:** Přehled zachycených CNV s neznámým významem a klinické obrazy ve skupině pacientů s PAS

Chr.	Cytoband	Typ CNV	Dědičnost	Koordináty (GRCh37)		Velikost (kb)	Klinický obraz
2	q37.1	dup.	pat.	233195538	233318065	123	mikrocefalie, dymorfie
			nz.	233195538	233311912	116	dysmorfie
	p21.1	dup.	nz.	130190035	131440471	1250	
	q13	del.	mat.	110874326	111365996	492	
6	q26	del.	pat.	162631070	162982289	351	hypotonie
9	p24.3	dup.	nz.	203861 516412	398865 664333	195	ADHD
			nz.	1	271132	271	
			pat.	271533	440683	170	makrocefalie
10	q21.3	del.	nz.	68312378	68445989	134	ADHD
11	q13.3	dup.	nz.	68414037	68734892	321	epilepsie
16	q11.2	dup.	nz.	46600773	46830637	230	ADHD
	p12.2	del.	nz.	21761404	22710614	949	mikrocefalie, epilepsie
	p13.3	del.	nz.	7212403	7459701	247	
20	p12.3	del.	nz.	8089954	8586513	497	mikrocefalie, epilepsie
	p12.1	del.	nz.	14806577	15042599	236	makrocefalie
22	q11.21	dup.	pat.	18916842	19024659	108	

*pat.-paternálně, mat.-maternálně, dup.-duplikace, del.-delece, kb-kilobáze, ADHD-hyperaktivita*

**Tabulka 23:** Přehled genů zasažených neznámými CNV variantami u skupiny PAS

Cytoband	Zasažené OMIM geny	SFARI skóre	OMIM číslo asociovaného onemocnění* (typ dědičnosti)
Duplikace 2q37.1	<i>ALPP, ALPPL2, DIS3L2</i>	-	<i>DIS3L2</i> (267000, AR)
Duplikace 2p21.1	<i>CCDC115, CFC1, IMP4, MZT2B, PTPN18, RAB6C, SMPD4</i>	-	<i>CCDC115</i> (616828, AR)
Delece 2q13	<i>NPHP1, RGPD6</i>	-	<i>NPHP1</i> (609583, AR)
Delece 6q26	<i>PARK2</i>	-	-
Duplikace 9p24.3	<i>DOCK8</i>	<i>DOCK8</i> (2)	-
	<i>DOCK8</i>		-
	<i>DOCK8</i>		-
Delece 10q21.3	<i>CTNNA3</i>	<i>CTNNA3</i> (3)	-
Duplikace 11q13.3	<i>CPT1A, GAL, IGHMBP2, MRPL21, MTL5</i>	-	-
Duplikace 16q11.2	<i>MYLK3, ORC6, SHCBP1, VPS35</i>	-	<i>ORC6</i> (613803, AR)
Delece 16p12.2	<i>CDR2, EEF2K, OTOA, POLR3E</i>	-	<i>UQCRC2</i> (615160, AR)
Delece 16p13.3	<i>RBFOX1</i>	<i>RBFOX1</i> (2)	-
Delece 20p12.3	<i>PLCB1</i>	<i>PLCB1</i> (2)	<i>PLCB1</i> (613722, AR)
Delece 20p12.1	<i>MACROD2</i>	<i>MACROD2</i> (2)	-
Duplikace 22q11.21	<i>DGCR2, PRODH</i>	<i>PRODH</i> (2,S)	<i>PRODH</i> (239500, AR)

\* onemocnění asociované s genem a zahrnující se změnami chování, vývojovým poškozením nervové soustavy a/nebo mozku, OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man databáze, SFARI-Simons Foundation Autism Research Initiative, AR-autozomálně recesivní

Neznámé varianty také postihly geny, které jsou v databázi OMIM asociovány s parkinsonismem, schizofrenií, epilepsií, záchvaty a poruchami motoriky (*CPT1A, GAL, IGHMBP2, PARK2, PRODH, TFG, VPS35*).

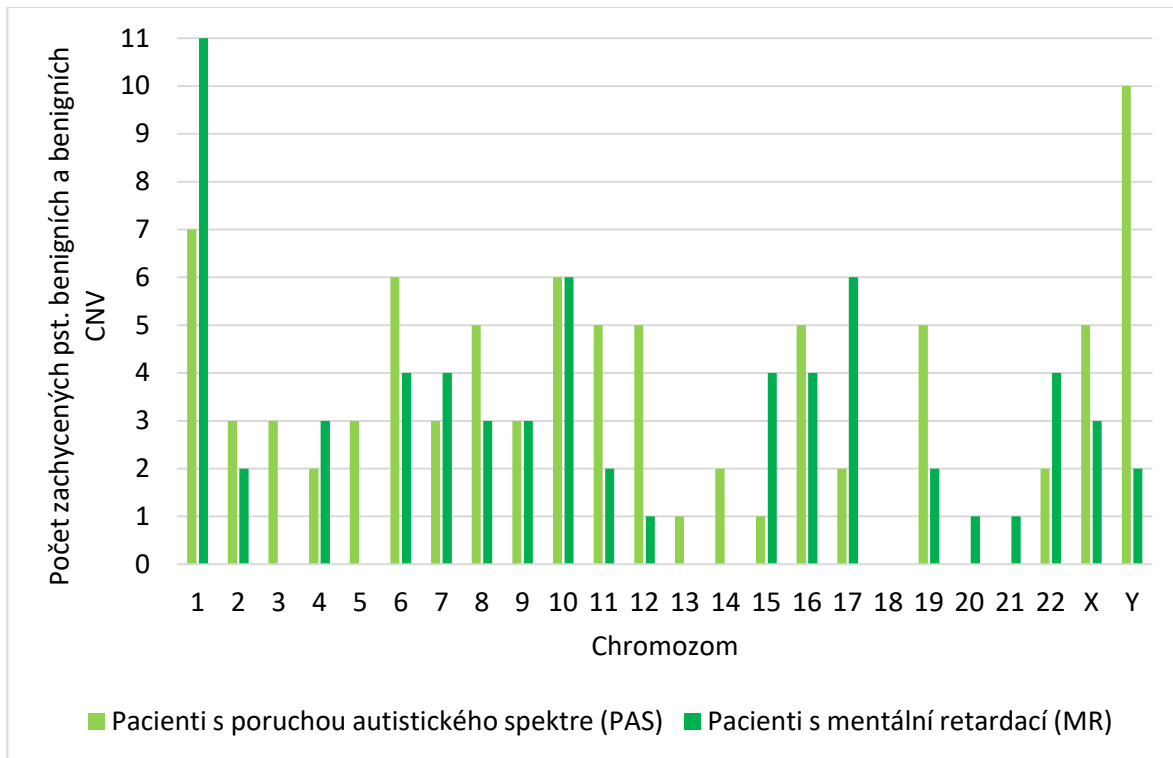
#### *Benigní a pravděpodobně benigní CNV*

Celkem bylo zachyceno 150 benigních a pravděpodobně benigních variant (MR = 66, PAS = 84) u 175 pacientů (MR = 67, PAS = 108). Tyto varianty se nacházely na všech chromozomech



s výjimkou chromozomu 18 (Obr. 6). Jejich distribuce byla mezi skupinami MR a PAS stejná ( $t=0,30$ ).

**Obrázek 7:** Distribuce CNV s pravděpodobně benigním a benigním významem pro jednotlivé skupiny pacientů



CNV- copy number variant

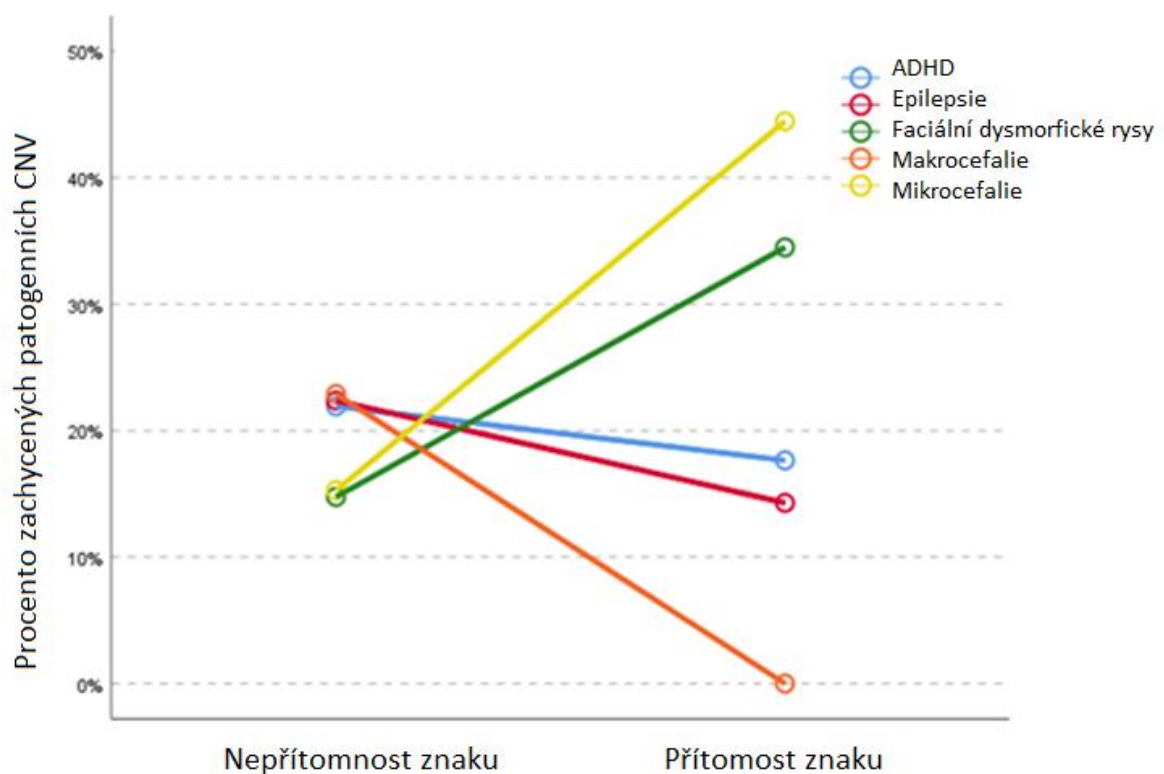
### 8.3 Výsledky korelace klinických a genetických dat u pacientů s MR a PAS

*Stanovení významu vybraných komorbidních znaků na záchyt patogenní CNV pro skupiny pacientů s PAS a MR*

CNV analýza ukázala významný rozdíl v četnosti i distribuci patogenních variant mezi skupinami MR a PAS ( $p = 0,004$ ,  $t = 0,014$ ). Metodami Fisherova exaktního testu a logistickou regresí byl analyzován vliv komorbidních znaků (ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciální dysmorfické rysy, VVV srdce, mozku, urogenitálního traktu) na pravděpodobnost nálezu patogenní varianty pro obě skupiny pacientů. Faciální dysmorfické rysy byly významné pro obě skupiny ( $p$  (MR)= 0,05;  $p$  (PAS) = 0,01 (Obr. 7, 8), avšak pravděpodobnost záchytu patogenní

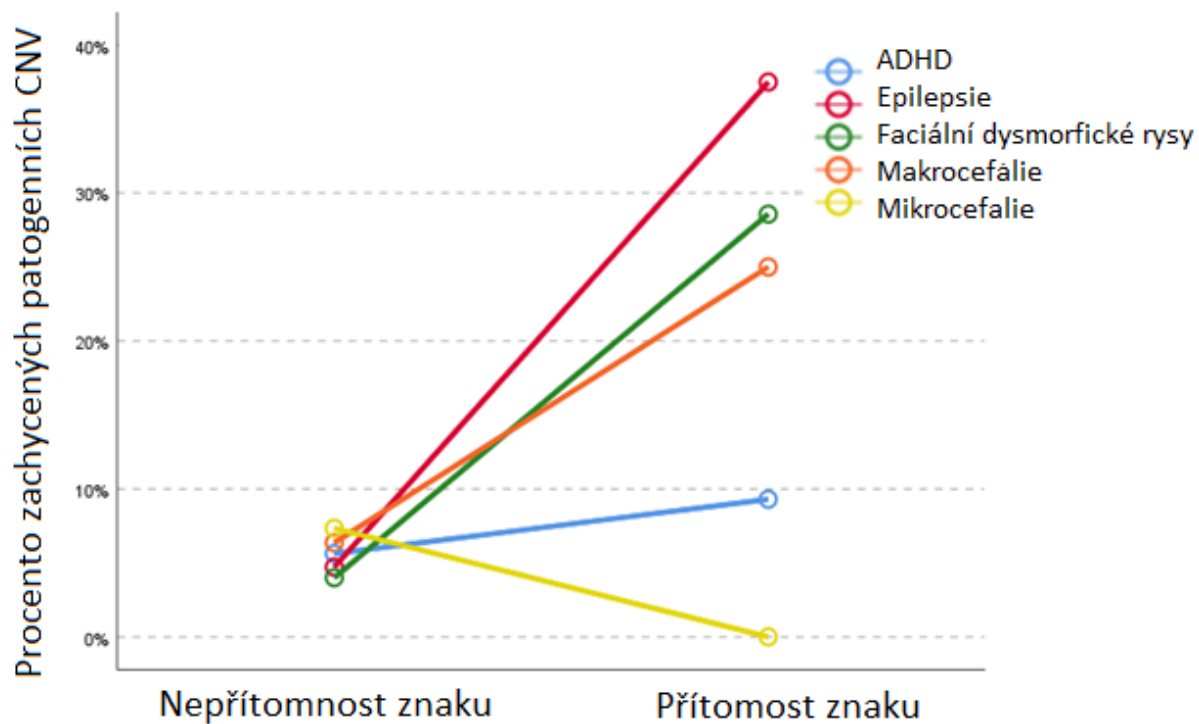
varianty byla u pacientů s dysmorfii a s MR téměř dvojnásobná než u pacientů s dysmorfii a PAS (MR=44,4 %, PAS=23,7 %). Pacienti ze skupiny MR, u kterých byla pozorována mikrocefalie, měli nejvyšší pravděpodobnost záchytu patogenní varianty ( $p = 0,01$ ). Ve skupině pacientů s PAS byla pro pravděpodobnost záchytu patogenní varianty významná epilepsie ( $p = 0,01$ ) (Obr. 8). Pacienti s PAS a epilepsií mají dvojnásobně vyšší pravděpodobnost výskytu patogenní varianty než pacienti s MR a epilepsií (29,6 % vs 14,0 %) (Obr. 9). PAS pacienti s makrocefalií měli zvýšené procento patogenních CNV, které nedosáhlo statistické významnosti ( $p = 0,26$ ). Přesto byla makrocefalie zařazena do modelu logistické regrese, ve kterém byla dosažená pravděpodobnost výskytu patogenní CNV u pacientů s PAS 25 %. Pacienti s PAS, kteří nemají makrocefalii, faciální dysmorfické rysy nebo epilepsii, mají pravděpodobnost záchytu patogenní CNV 1 % (Obr. 10). Zbylé komorbidní znaky (ADHD, VVV srdce, mozku, urogenitálního traktu a růstová restrikce) nebyly významné.

**Obrázek 8:** Závislost přítomnosti/nepřítomnosti ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciálních dysmorfických rysů a patogenní CNV ve skupině pacientů s MR



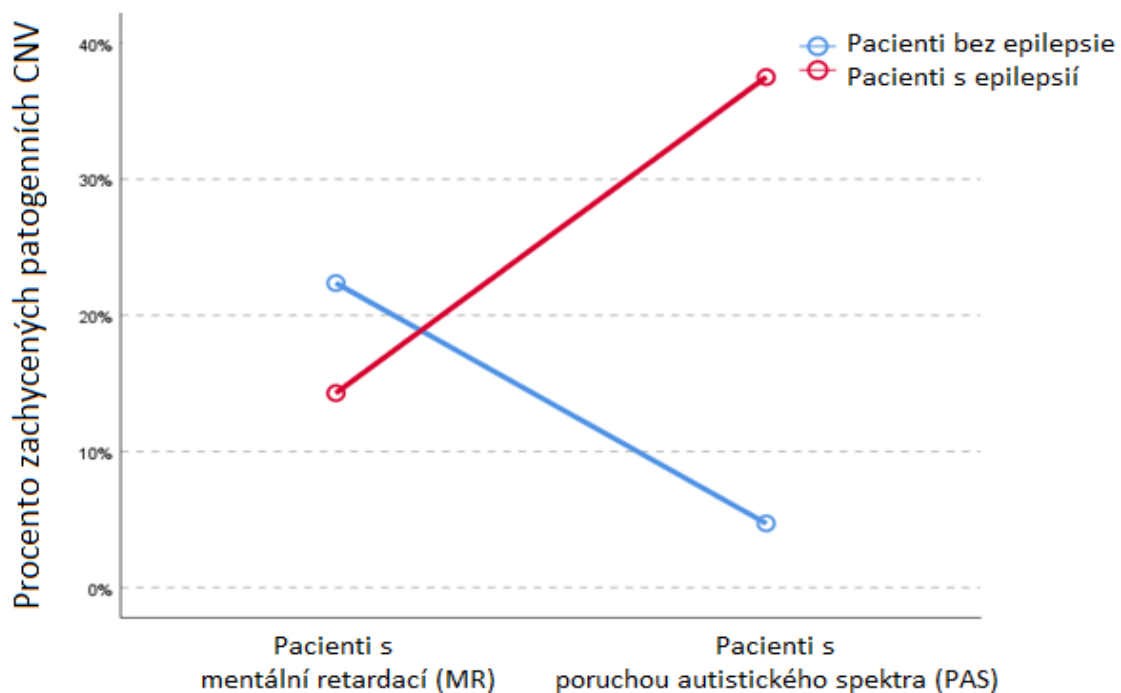
*ADHD-hyperaktivita, CNV-copy number variant*

**Obrázek 9:** Závislost přítomnosti/nepřítomnosti ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciálních dysmorfických rysů a patogenní CNV ve skupině pacientů s PAS

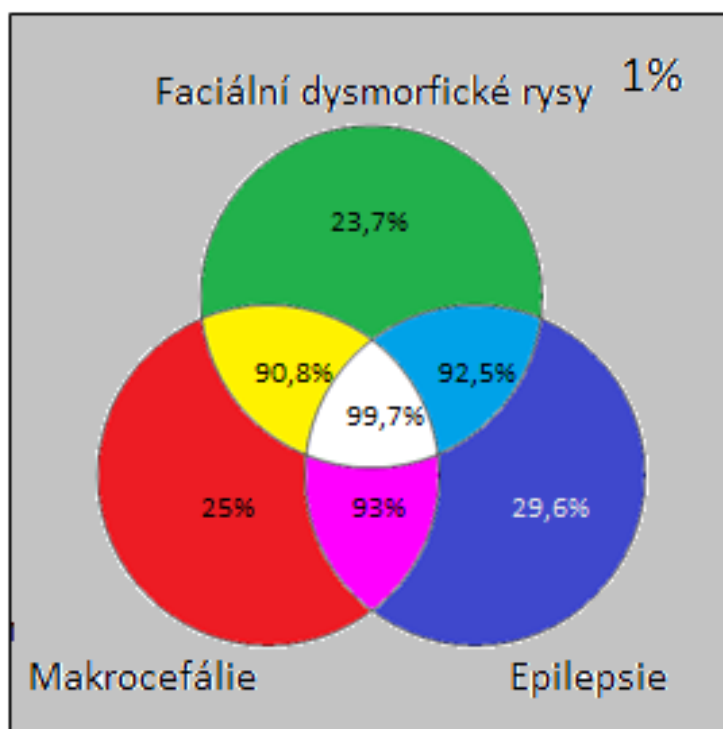


*ADHD-hyperaktivita, CNV-copy number variant*

**Obrázek 10:** Porovnání přítomnosti patogenních CNV u pacientů s epilepsií mezi skupinami MR a PAS



**Obrázek 11:** Pravděpodobnost záchytu patogenní CNV ve skupině pacientů s PAS a s faciálními dysmorfickými rysy, epilepsií, makrocefálií nebo jejich kombinací



## *Analýza klinického obrazu pacientů s opakujícími se variantami neznámého významu*

Ve skupině PAS byly zachyceny neznámé varianty, které se v souboru opakovaly u nepříbuzných pacientů: dva pacienti byli nositeli duplikace 2q37.1 zasahující gen *DIS3L2*, tři pacienti byli nositeli duplikace genu *DOCK8* a *KANK1* (9p24.3).

### *Pacienti s duplikací 2q37.1*

#### *Proband 1*

Pacientka 1 s duplikací 2q37.1 byla narozena z druhé gravidity nepříbuzných rodičů ve věku 28 let (matka i otec). Její porod byl indukován ve 42. týdnu těhotenství. Během porodu došlo k peripartální asfyxii. Pacientka nebyla kříšena. Její porodní váha byla 2300 g a poporodní adaptace proběhla zvykle. Kolem 1 roku jejího života nezvládala chůzi a nemluvila, avšak dle praktického lékaře pro děti a dorost byl její psychomotorický vývoj v pásmu normy. Dívka byla ve 3 letech odeslána k psychologickému vyšetření, kde byl její stav uzavřen jako symetrické opoždění psychického i motorického vývoje. V devíti letech byla u dívky dětským psychiatrem diagnostikována porucha autistického spektra. Ve věku 11 let a 3 měsíců byla dívka 129 cm vysoká (< 3 %), vážila 25 kg (< 3 %, BMI=15,02) a měla obvod hlavy 47 cm (< 3 %). Její hlava byla plagiocfalická, obličej vykazoval mírnou dysmorfii (širší kořen nosu, větší odstáté uši) a v dutině ústní byla větší mezera mezi horními řezáky a gotické patro. Dívka byla vyšetřena metodami EEG, CT, MRI s negativním výsledkem. Dále u ní byly vyloučeny poruchy v metabolismu aminokyselin a mastných kyselin a organické acidurie. Od 6 let je dívka dispenzarizována na oční klinice pro strabismus convergens concomitans.

#### *Proband 2*

Pacient 2 pocházel z druhé gravidity nepříbuzných rodičů ve věku 34 let (matka) a 32 let (otec). Porod proběhl plánovaně císařským řezem ve 39. týdnu těhotenství. Jeho porodní hmotnost 4475 g a délka 50 cm. Adaptace po porodu probíhala normálně. Ve dvou letech byl na žádost praktického lékaře pro děti a dorost vyšetřen pedopsychiatrem pro mentální retardaci a známky chování typické pro autismus (automatismy, nemluvil). Ve věku dvou let dosáhl pacient výšky 88 cm (40 %), vážil 12 kg (23 %, BMI = 15,5) a měl obvod hlavy 49 cm (34 %). Tvar hlavy pacienta byl normální, obličej však vykazoval mírnou dysmorfii (širší kořen

nosu). Vyšetřením na ORL se vyloučila sluchová vada. Dále byly vyloučeny poruchy metabolismu aminokyselin a mastných kyselin a organické acidurie.

### Souhrn klinických a genetických nálezů u pacientů s duplikací 2q37.1

Pacienti 1, 2 byli nositeli duplikace 2q37.1, která nebyla doprovázena dalšími patogenními a/nebo pravděpodobně patogenními CNV. U obou pacientů byla vyloučena přítomnost chromozomálních aberací metodou G-pruhování a expanze trinukleotidů CCG v promotoru *FMR1* (Syndrom Fragilního X). Podrobné porovnání jejich klinických a genetických nálezů je shrnuto v tabulce 21 a znázorněno na obrázku 12. Pacientka 1 zdědili duplikaci 2q37.1 od otce, zatím co u druhého pacienta byl původ varianty neznámý.

**Tabulka 24:** Porovnání klinických a genetických nálezů pacientů s duplikací 9p24.3

Sledovaný parametr	Proband 1	Proband 2
Výška	<3%	40%
Obvod hlavy	<3%	34%
Hmotnost	<3%	23%
BMI	15,02	15,5
Přítomnost mentální insuficience	ano	ano
Komorbidní znaky	mikrocefalie, dysmorfie	dysmorfie
Koordináta	233195538-233318065	233195538-233311912
Velikost	123 kb	116 kb
Duplikované kódující geny	<i>ALPP, ALPPL2, DIS3L2</i>	<i>ALPP, ALPPL2, DIS3L2</i>

*BMI-body mass index*

**Obrázek 12:** Grafické znázornění duplikace 2q37.1 u probanda 1 a probanda 2

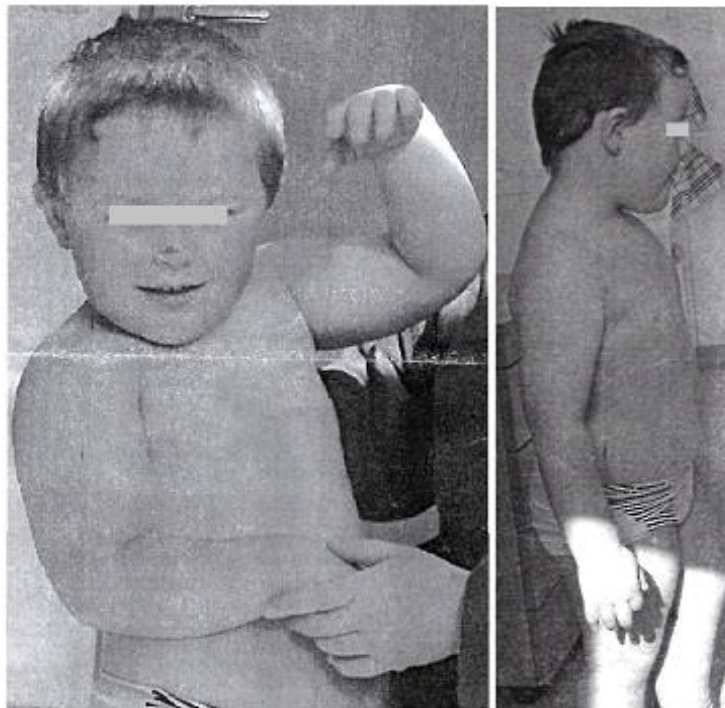


## *Pacienti s duplikací 9p24.3*

### *Proband 3*

Proband 3 byl prvním dítětem (třetí těhotenství matky) nepříbuzných rodičů ve věku 34 let (matka) a 31 let (otec). Matka byla léčena pro epilepsii. Těhotenství probíhalo bez komplikací; porod byl spontánní v 36. týdnu těhotenství; porodní hmotnost 2500 g, délka 48 cm. Vývojové milníky byly dosaženy normálně až do 18. měsíce, kdy bylo pozorováno zpoždění řeči, hyperaktivita a porucha spánku. Poruchy sluchu a ADHD byly diagnostikovány ve věku 3 let. Ve 4 letech byl podroben genetickému testování pro poškození sluchu, ADHD a obezitu. Diagnóza PAS s mírným mentálním poškozením byla potvrzena psychiatrem ve věku 5 let. Parametry růstu ve věku 7 let byly následující: výška 116 cm (vzhledem k věku 3 %), hmotnost 38,6 kg (> 97 % vzhledem k věku), BMI 28,7 (obezita), obvod hlavy 54 cm (88 % vzhledem k věku) (Obr. 13). Kromě sluchového postižení byl chlapec léčen na astma bronchiale a orchiektomie byla provedena ve věku 1 roku. Chlapec byl bez dysmorfických rysů.

**Obrázek 13:** Fotografie probanda 3



### Sourozenec probanda 3

Chlapec má dvě starší sestry. Nejstarší sestra (jiný otec) je zdravá (22 let). Na základě jejího dobrého zdraví a jiného otce nebyla geneticky analyzována. Druhá sestra (stejného otce jako proband 1) se narodila se ve 38. týdnu těhotenství, její porodní hmotnost byla 2300 g, délka byla 50 cm a byla kojena do 2 měsíců. Kromě dyslalie byl její psychomotorický vývoj až 4 let normální. Porucha pozornosti, hyperaktivita a kompulzivní chování byly diagnostikovány psychiatrem ve věku 4 let. Ve svých 11 letech má následující parametry: 136 cm výška (4 % vzhledem k věku), 45,5 kg hmotnost (> 97% vzhledem k věku), BMI 25 (s nadváhou) a obvod hlavy 53 cm (50% vzhledem k věku) (Obr. 5).

**Obrázek 14:** Fotografie sestry probanda 3





#### *Proband 4*

Chlapec byl prvním dítětem (druhé těhotenství matky) nepříbuzných rodičů ve věku 29 let (matka) a 38 let (otec). Matka má latentní tetanii, nemedikuje. Otec byl léčen pro Crohnovu poruchu. Matka zažila synkopy a čichovou auru během III. trimestru těhotenství, zvažována epilepsie (čichová aura, synkopa bez křečí). Porod byl v 37. týdnu těhotenství proveden císařským řezem (indikace matky); porodní hmotnost 2950 g, délka 50 cm. Až do 15 měsíců se vyvíjel normálně. Následně bylo pozorováno zpoždění řeči, stereotypní pohyby, negativistické a agresivní chování a hyperaktivita. Diagnóza PAS s ADHD byla potvrzena psychiatrem ve věku 3 let a byl postoupen ke genetickému poradenství. Parametry růstu ve věku 3,5 roku byly následující: výška 102 cm (50 %), hmotnost 16 kg (50 %), BMI 15,4 (normální hmotnost), obvod hlavy 53 cm (> 97%).

#### *Proband 5*

Proband 5 je z první gravidity nepříbuzných rodičů ve věku 30 let (matka) a 31 let (otec). Chlapec se narodil z násobné gravidity jako "gemeli B". Gemeli A spontánně odumřelo v děloze. Porod byl spontánní, bez komplikací. Adaptace novorozence byla v normě. Ve 13. měsíci byl chlapec předán do péče neurologa pro opoždění ve všech vývojových složkách. Jeho vývoj odpovídal počátku III. trimenonu ve 13. měsíci. Ve 4 letech a 6 měsících bylo pozorováno významné harmonické opoždění vývoje při mentální retardaci, lehká paleocerebelární afazie a inkontinence III. stupně. Dále byly pozorovány autistické rysy, jako jsou absence řeči, porozumění sdělení a sociálního kontaktu. Chlapec měl v tomto věku hmotnost 14 kg (3 %) a obvod lbi 50 cm (25 %). U probanda 5 nebyly pozorovány dysmorfické rysy obličeje ani další komorbidní znaky. Dále byl dispenzarizován na urologii pro operaci retence varlete a na ortopedii pro plochou nohu.

#### *Souhrn klinických a genetických nálezů u pacientů s duplikací 9p24.3*

Pacienti 3, 4 a 5 byli nositeli duplikace 9p24.3, která nebyla doprovázena dalšími patogenními a/nebo pravděpodobně patogenními CNV. U všech tří pacientů byla vyloučena přítomnost chromozomálních aberací metodou G-pruhování a expanze trinukleotidů CGG v promotoru *FMR1* genu (Syndrom Fragilního X). U pacienta 3 a jeho sestry a u pacienta 4 byl dále vyloučen Prader-Willy syndrom metodou metyl-specifická MLPA (ME028, C1). Podrobné porovnání

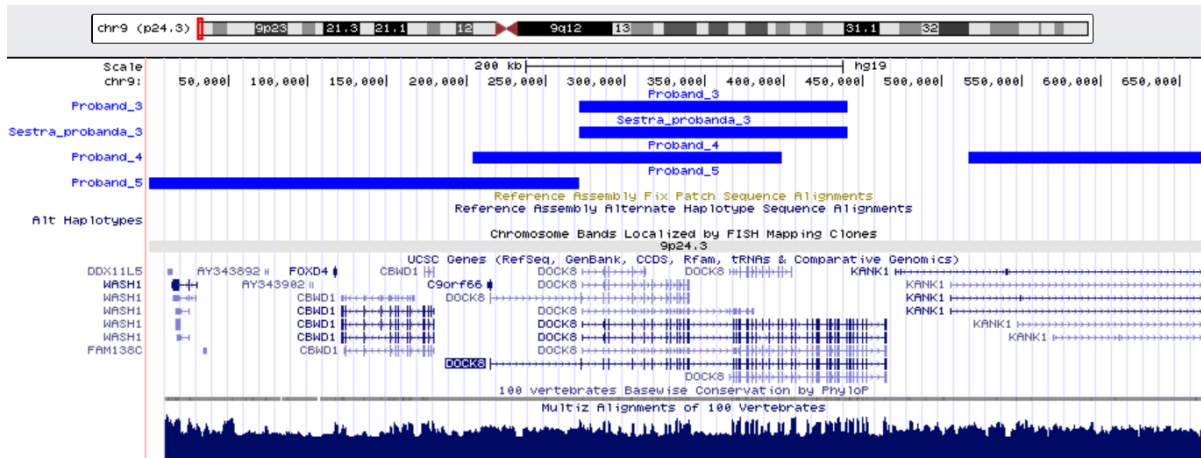
jejich klinických a genetických nálezů je shrnuto v tabulce 24 a graficky znázorněno na obrázku 15. Proband 3 a jeho sestra zdělili duplikaci *DOCK8* od otce u probandů 4 a 5 byl původ varianty neznámý. U pacienta 4 byla zachycena kromě duplikace *DOCK8* i mozaika duplikace chromozom 9:203861-1735677 o velikosti 1532 kb. Tato mozaika zahrnuje protein kódující geny *DOCK8*, *DMRT1*, *DMRT2*, *DMRT3* a *KANK1* a nekódující geny *C9orf66*, *RN7SL412P*, *RNU6-1327P*, *RNU6-1073P*, *RPS27AP14*, *RNA5SP279*.

**Tabulka 25:** Porovnání klinických a genetických nálezů pacientů s duplikací 9p24.3

Sledovaný parametr	Proband 3	Sestra probanda 3	Proband 4	Proband 5
Výška	3%	4%	50%	-
Obvod hlavy	88%	50%	> 97%	25%
Hmotnost	> 97%	> 97%	50%	3%
BMI	28,7	25,0	15,4	-
Přítomnost mentální insuficience	ano	ano	ano	ano
Komorbidní znaky	ADHD, sluchové postižení	ADHD	ADHD, makrocefalie	ne
Koordináta (GRCh37)	271533-440683	271533-440683	203861-398865 516412-664333	1-271132
Velikost	169 kb	169 kb	195, 148 kb	271 kb
Duplikované kódující geny	<i>DOCK8</i>	<i>DOCK8</i>	<i>DOCK8</i> , <i>KANK1</i>	<i>DOCK8</i> , <i>CBWD1</i> , <i>FOXD4</i>
Duplikované exony genu <i>DOCK8</i>	2-43	2-43	1-26	1-2

*BMI-body mass index, ADHD-hyperaktivita, - údaj není k dispozici*

**Obrázek 15:** Grafické znázornění duplikace 9p24.3 u probanda 3, sestry probanda 3, probanda 4 a probanda 5



## 9 Diskuze

Poruchy autistického spektra (PAS) a mentální retardace (MR) jsou geneticky podmíněná neurovývojová onemocnění, která jsou často doprovázena dysmorfii obličeje, mikro / makrocefalií, epilepsií, ADHD, vývojovými a/nebo růstovými defekty aj. Obě onemocnění jsou klinicky variabilní a navzájem se fenotypově i genotypově překrývají. Tato onemocnění mohou vznikat i na základě genomických aberací, které lze zachytit pomocí nástrojů klinické genetiky. Avšak účinnost těchto metod je závislá na jejich designu i na konkrétním fenotypu pacientů. (Whittington et al., 2018; Li a kol., 2018; Mülle a kol., 2014, Bourgeron, 2016; Schaefer, 2016; Quintela a kol., 2017). Cílem této práce byla CNV analýza u pacientů s MR a/nebo PAS a následná korelace výsledků s konkrétním fenotypem pacientů.

### *Analýza klinických dat získaných od pacientů s MR a/nebo PAS*

V této práci bylo zahrnuto 204 pacientů s MR a/nebo PAS, u kterých byla vyloučena aberace větší než 5 Mb a syndrom Fragilního X. Četnost dysmorfie obličeje, mikro / makrocefalie, ADHD, epilepsie, vývojových vad, růstových restrikcí, hormonálních defektů a hypotonie byla porovnávána mezi pacienty s MR a PAS. Tato analýza u některých znaků prokázala rozdílné zastoupení. Jedním z těchto znaků byly dysmorfie obličeje. Tento znak je popisován u geneticky podmíněných syndromů doprovázených intelektuálním opožděním jako např.: Alstromův, Cri-du-Chat, Sotosův nebo Williamsův syndrom (Greydanus et al 2005). Četnost dysmorfie obličeje v heterogenních skupinách pacientů s MR a PAS se mezi studiiemí různí (20 - 50 %)(Alazami et al 2015, Chaves et al 2019). V této práci byla dysmorfie obličeje pozorována v 32,0 % u MR a 12,3 % u PAS. Tato frekvence potvrzuje asociaci faciální dysmorfie s mentální retardací nikoliv však s autismem (32 % vs 12 %,  $p = 0,001$ ). U pacientů s autismem a bez intelektuálního opoždění nebyl tento znak pozorován. Aldridge a spol. uvádí, že dysmorfie obličeje u pacientů s PAS může naznačovat odlišnou etiologii onemocnění (Aldridge et al 2011).

V této práci byly pozorovány i kraniální malformace, jmenovitě mikrocefalie a makrocefalie. Mikrocefalie se vyskytovala u 18 pacientů s MR (20,0 %) a 5 pacientů s PAS (4,4 %) ( $p = 0,001$ ). Celosvětově se mikrocefalie vyskytuje u 1 - 3 % populace, 0,02 % u Evropanů (Maver et al 2019, Pirozzi et al 2018). U pacientů s neurovývojovými onemocněními je mikrocefalie pozorována

v 15 % případů (Pirozzi et al 2018). Starší studie uvádí, že se mikrocefalie vyskytuje se stejnou četností u pacientů s PAS i MR, avšak novější studie potvrzují přítomnost mikrocefalie u 15 % pacientů s MR zatím, co u pacientů s PAS je to jen okolo 3 %, srovnatelně s celosvětovou frekvencí (Stevenson 1997, Fombonne et al 1999, Watemberg et al 2002, Surén et al 2013). Opačná situace je v případě makrocefalie. Již dříve byla prokázána asociace tohoto znaku s rozvojem PAS (Guo et al 2018, Abghari et al 2019). Makrocefalie se může vyskytovat i u pacientů s MR, avšak tito pacienti často vykazují i autistické rysy (Horn et al 2019, Yasin 2019). Ačkoliv byla v této práci makrocefalie častější u pacientů s PAS než u pacientů s MR, tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti (8,7 % vs 3,5 %,  $p = ns$ ).

Rozdílně zastoupeným klinickým znakem mezi skupinami byla i ADHD (18,9 % vs 37,7 %,  $p = 0,003$ ). V populaci pacientů s mentální retardací se zastoupení ADHD pohybuje do 5 %, což odpovídá i celosvětovému výskytu (3 - 4 %) (Alazami et al 2015, Srinivas 2018). Zatím co u pacientů s autismem se tento znak vyskytuje ve 27 % (Lai et al 2019).

V této práci byl také pozorován častější výskyt VVV srdce a skeletu u pacientů s MR ( $p = 0,011$ ,  $p = 0,005$ ). Oba znaky jsou asociovány s mentální retardací zejména u již dříve popsáných syndromů jako jsou syndrom Cornelia de Langeové, Noonanové, Downův syndrom aj. (Pagnamenta et al. 2019, Boyle et al 2015, Antonarakis 2017).

V souboru se dále vyskytovaly kožní defekty, slepota, hluchota (nebo nedoslýchavost) a hyper/hypo sensitivita, které nebyly vzhledem k celkově nízké četnosti (menší než 4) porovnávány. Také nebyl prokázán rozdílný výskyt epilepsie, VVV mozku VVV urogenitálního traktu, růstové restrikce, hormonálních defektů a hypotonie.

#### *Korelace klinických a genetických dat získaných od pacientů s MR a PAS*

Dřívější genetické studie identifikovaly variabilitu počtu kopií genomu (CNV) jako jednu z možných příčin mentální retardace a/nebo autismu. U těchto pacientů je CNV analýza doporučena jako metoda první volby, i přestože reportované studie vztahovaly genetické výsledky k jedné heterogenní skupině pacientů s PAS, MR a dalšími doprovodnými klinickými znaky (Miller et al. 2010, Battaglia et al., 2013, de la Torre-Ubieta et al. 2016; Schaefer 2016; Merikangas et al. 2015). CNV analýza dokáže odhalit příčinu onemocnění u 8,7 % - 14,7 % pacientů s MR a u přibližně 7 % u pacientů s PAS, avšak výtěžnost tohoto testu je závislá na

fenotypu pacientů (Xu et al. 2018; Peycheva et al. 2018, Miller et al. 2010). Reportované CNV analýzy u pacientů s autismem obvykle zahrnují i mentální retardaci. V přítomnosti dalších klinických rysů (např. mikro / makrocefalie, dysmorfismus, vývojové a růstové defekty) se účinnost CNV analýzy zvyšuje až na 15 % - 20 %, 46 % v případě dysmorfie a/nebo mikrocefalie (Beaudet 2013, Miller et al. 2010, Jacquemont et al. 2006, Chan et al. 2018). Tato práce se zabývala CNV analýzou v každé skupině pacientů zvlášť (MR, PAS) a prokázala významný rozdíl v distribuci i četnosti patogenních CNV mezi skupinami MR a PAS ( $t = ,014$ ,  $p = ,004$ ). Ve skupině pacientů s autismem bylo pouze 14 % pacientů bez intelektuálního postižení. Po oddělení této podskupiny ze souboru pacientů s autismem klesla výsledná hodnota významnosti vůči skupině MR, u které nebylo pozorováno autistické chování na  $p$  hodnotu 0,02. Ve skupině pacientů s autismem a bez vad intelektu nebyly pozorovány klinicky významné CNV. Tyto výsledky naznačují, že nalezené patogenní CNV nevysvětlují vznik autismu. U obou skupin byl dále pozorován vliv klinických znaků (faciální dysmorfie obličeje, mikro / makrocefalie, ADHD epilepsie atd.) na výtěžnost CNV analýzy.

Dysmorfie obličeje zvyšuje pravděpodobnost detekce patogenních CNV u pacientů s MR i ASD. Avšak u skupiny MR je tato pravděpodobnost téměř dvojnásobná než u skupiny PAS (44,4 % u MR a 23,7 % u PAS,  $p = 0,05$ ).

Mikrocefalie a makrocefalie jsou také důležité klinické znaky pro nálezy patogenních CNV u pacientů s MR a/nebo PAS (Qiao 2009, Bernardini et al. 2010, Blanken et al. 2018; Klein et al. 2013). Společná segregace mikrocefalie a dysmorfie byla často spojena s přítomností patogenních CNV ve skupinách pacientů s MR (Qiao 2009; Bernardini et al. 2010). Zatímco makrocefalie může být spojena s určitými podtypy autismu mnohem menšími aberacemi na úrovni jednotlivých genů např. *CHD8*, *PTEN* aj. (Blanken et al. 2018; Klein et al 2013, Guo et al 2018, Abghari et al 2019). V souladu s dříve publikovanou literaturou analýza ukázala, že nejvýznamnějším prediktorem patogenní varianty u pacientů s MR je mikrocefalie. Naopak u makrocefalie se prediktivní hodnota nepodařila prokázat. I přestože podle Fisherova exaktního testu nebyla makrocefalie významná pro zachycení patogenní CNV, byla zařazena do modelu logistické regrese. Makrocefalie zvýšila pravděpodobnost detekce patogenní CNV u pacientů s PAS o 25 %. Důvodem diskrepance výsledků dvou statistických testů (Fisherův exaktní test a logistická regrese) je to, že izolovaná makrocefalie má nízkou prediktivní hodnotu, avšak při kombinaci s dalšími klinickými znaky by mohla výrazně zvýšit pravděpodobnost detekce patogenní varianty.

Jedním z významných prediktorů patogenní varianty u pacientů s PAS je epilepsie ( $p = 0,01$ ). Vyšší výskyt epilepsie u pacientů s PAS než u pacientů s MR byl již popsán v dřívějších pracích, 33,3 % u MR vs 60,3 % u PAS (Alazami et al 2015, Zhang et al 2019). Stále však existuje diskuse o souvislosti mezi autismem a epilepsií (Amiet et al., 2013; Lee et al 2015; Berg et al 2012). Nedávná populační studie zjistila, že 44 % pacientů s PAS má přidruženou epilepsii a u 54 % pacientů s epilepsií je pozorován autismus (Jokiranta et al. 2014). Role patogenních CNV v epilepsii byla již dříve popsána, avšak účinnost CNV analýzy u nesyndromické epilepsie je zhruba 1 % (Olson et al. 2014, Viscidi et al., 2013). Také tato práce prokázala, že epilepsie je významná pro patogenní nálezy CNV u pacientů s PAS, ale byla nevýznamná u pacientů s MR, přestože podíl pacientů s epilepsií byl v obou skupinách stejný. Tento výsledek naznačuje možnou společnou genetickou podstatu epilepsie a autismu.

Ačkoliv jsou u pacientů s PAS a MR popisovány i další klinické znaky (ADHD, vrozené vývojové vady srdce, urogenitálního traktu, mozku, růstové restriktce, hormonální defekty atd.) a řada z nich je součástí syndromů zahrnujících i PAS a MR, nebyla v této práci pozorována asociace mezi jejich výskytem a nálezem patogenní varianty (Whittington et al. 2018, Mulle et al. 2014, Bourgeron, 2016; Schaefer 2016; Quintela et al 2017). Lze tedy předpokládat, že tyto znaky nevznikají na základě stejných genetických změn jako MR a PAS. Avšak v této práci byly zachyceny i varianty, jejichž význam není klinicky popsán.

MR a/nebo PAS jsou indikačním kritériem k CNV analýzám, které umožňují studium genetických aberací u pacientů na úrovni několika tisíc nukleotidů. Avšak účinnost těchto metod je závislá na konkrétním klinickém obrazu pacientů. Přestože skupina pacientů s PAS zahrnovala 86 % pacientů s mentálním opožděním, tato práce prokázala rozdílnou úspěšnost CNV analýzy mezi oběma skupinami pacientů stejně jako rozdílný vliv faciálních dysmorfických rysů, mikrocefalie, makrocefalie a epilepsie na výtěžnost metody v obou skupinách. V této studii se také ukazuje, že u pacientů s PAS bez dysmorfie, kraniálních malformací a epilepsie je záchytnost CNV analýzy pouze 1 %. Odhadujeme, že v případě pacientů s vysokofunkčním autismem nebo Aspergerovým syndromem bude úspěšnost ještě menší.

Tato skutečnost je obecně v rozporu s přijatým doporučením CNV analýzy u pacientů s PAS a vyzdvihuje nutnost genetických metod s větším rozlišením (např. WES, WGS nebo panelové sekvenování).

## *Analýza klinického obrazu pacientů s opakujícími se variantami neznámého významu*

V této práci byly provedeny metody aCGH a SNP aCGH u 175 pacientů s MR a/nebo PAS. U tří pacientů (1,7 %) byla zachycena duplikace 9p24.3 zasahující geny *DOCK8* a *KANK1* a u dvou pacientů (1,1 %) byla pozorována duplikace genů *ALPP*, *ALPPL2* a *DIS3L2* v oblasti 2q37.1. V dostupných databázích jsou tyto duplikace klasifikovány jako neznámé nebo pravděpodobně benigní (DECIPHER, ISCA). Avšak některé publikace prokázaly asociaci duplikace 9p24.3 zahrnující geny *DOCK8* a *KANK1* nejen s PAS, ale i s některými dalšími neuropsychiatrickými poruchami (Glessner et al 2017). Duplikace 9p24.3 mají podobný charakter jako duplikace 15q11.2 a 16p11.2 (Green et al 2016, Niarchou et al 2019). Duplikace těchto tří oblastí jsou doprovázeny PAS, MR, dysmorfickými rysy, neúplnou penetrancí, variabilní expresivitou a mohou se vyskytovat i ve zdravé populaci (Vanzo et al 2019, Krgovic et al 2018, Al Ageeli et al 2014, Picinelli et al 2016, Green et al 2016, Niarchou et al 2019). Tato podobnost by mohla nasvědčovat i podobnému mechanismu účinku. Dopad duplikace 9p24.3 může být závislý na dávce exprese genů *DOCK8* a/nebo *KANK1* jak je popsáno u duplikace 15q11.2 (van der Zwaag et al 2009). Stále je také nejasný vliv druhé alely těchto genů. Literatura popisuje nukleotidové změny, které by mohli vést ke vzniku protektivní alely (Benítez-Burraco et al 2017, Lee et al 2015, Ulfarsson et al 2017). Duplikace, které překrývají pouze části těchto genů, by mohly způsobit posunu čtecího rámce. (Glessner et al 2017). Kromě toho jsou *DOCK8* a *KANK1* umístěny ve stejných topologicky asociovaných doménách s *BWD1*, *DMRT3*, *FOXD4*. Duplikace *DOCK8* a/nebo *KANK1* by mohly vést k deregulaci exprese těchto genů (Glessner et al 2017). V této práci byla u tří nepříbuzných pacientů s podobným klinickým obrazem zachycena duplikace zahrnující část genu *DOCK8*. U dvou pacientů duplikace nezasáhla gen *KANK1*. Jeden pacient nesl i mosaicistní duplikaci, která zahrnovala kromě *DOCK8* a *KANK1* i geny *DMRT1*, *DMRT2*, *DMRT3*. Tento pacient měl navíc i makrocefálii. Dřívější studie prokázala, že somatické změny mohou modulovat fenotypy onemocnění (Jing, 2014). Avšak žádná předchozí studie nepopsala makrocefálii u pacienta s duplikací v oblasti 9p24.3. U dvou pacientů s PAS byla také zachycena duplikace 2q37.1, která zahrnovala geny *ALPP*, *ALPPL2* a pouze část genu *DIS3L2*. Dysfunkce genu *DIS3L2* byla již dříve popsána jako příčina Perlmanova syndromu (MIM: 267000), který zahrnuje mimo jiné i opožděný mentální vývoj nebo agenezi *corpus callosum* (z OMIM, Astuti et al 2012). Obdobně jako u 9p24.3 se



tato duplikace vyskytuje i ve zdravé populaci (DECIPHER, ISCA). Avšak v databázi DECIPHER jsou popsáni nositelé duplikace 2q37.1 kteří vykazují MR, PAS, opožděný vývoj řeči, faciální dysmorfické rysy a obezitu. Mírnější projevy jsou v této databázi zachyceny u pacientů s duplikací genů *ALPP* a *ALPPL2*. Závažnější klinický obraz je popsán u pacientů, kteří nesou duplikaci zasahující pouze část genu *DIS3L2* (DECIPHER). Ovšem studie potvrzující vliv těchto genomických změn na rozvoj MR a/nebo PAS chybí. Ačkoliv je v této práci popsán záchyt duplikací v oblastech 9p24.3 a 2q37.1 u několika nepříbuzných pacientů, nelze vyloučit jinou genetickou příčinu obtíží u pacientů vzhledem k použitým metodám.

## 10 Závěr

Tato práce potvrdila významný dopad některých klinických znaků na úspěšnost CNV analýzy u pacientů s MR a/nebo PAS. Avšak upozorňuje na rozdílné výsledky mezi oběma skupinami navzdory velkému podílu pacientů s mentálním opožděním ve skupině pacientů s PAS. Pravděpodobnost záchytu CNV u pacientů s PAS bez dysmorfie, makrocefalie a epilepsie byla 1 %. Proto tato práce podtrhuje nutnost podrobnější genetické analýzy u těchto pacientů. Navíc provedené analýzy odhalily opakující se duplikace v oblasti 9p24.3 a 2q37.1 u nepříbuzných pacientů s obdobným klinickým obrazem. Na základě klinické charakteristiky nositelů těchto variant odhadujeme, že by se mohlo jednat o nové CNV asociované s PAS, které jsou zatíženy neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou.

## 11 Seznam publikovaných prací

### *Publikace*

ČAPKOVÁ, Z., P. ČAPKOVÁ, M. PROCHÁZKA, et al 2020. Klinický význam genetického testování u pacientů s poruchou autistického spektra. *Psychiatrie pro praxi*. **2020**(3). DOI: *in press*

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al. 2019. Differences in the importance of microcephaly, dysmorphism, and epilepsy in the detection of pathogenic CNVs in ID and ASD patients. *PeerJ* [online]. 7. DOI: 10.7717/peerj.7979

CAPKOVA, P., J. SROVNAL, Z. CAPKOVA, et al. 2019. MLPA is a practical and complementary alternative to CMA for diagnostic testing in patients with autism spectrum disorders and identifying new candidate CNVs associated with autism. **PeerJ** [online]. 6. DOI: 10.7717/peerj.6183

### *Přednáška*

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2017. Stanovení kandidátních genů hrající roli v nemocech autistického spektra pomocí SNP array. 21. *Celostátní konference DNA diagnostiky*. Plzeň

### *Postery*

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2020. Clinical significance of 2q37.1 duplication in patients with intellectual disability and facial dysmorphism. *European Society of Human Genetics Virtual Conference 2020*. Berlín

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2019. Genetická analýza sourozenců s ID/DD, ASD, ADHD a epilepsií. *Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP a 52. výroční cytogenetická konference*. Plzeň

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2019. Is 9p24.3 (DOCK8, KANK1) a new loci involved in dosage-sensitive pathway which can lead to ASD/ID? Lesson from recurrent duplications 15q11.2 and 16p11.2. 23. *Celostátní konference DNA diagnostiky*. Brno

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2018. Phelan-McDermid syndrom. *Celostátní konference genetických laborantů a sester*. Ostrava

CAPKOVA, Z., P. CAPKOVA, J. SROVNAL, et al 2018. Determination of prospective genes for autism spectrum disorders using microarray. *European Society of Human Genetics Conference 2018*. Miláno

## 12 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Porovnání diagnostických manuálů DSM-IV a MKN10 .....	4
<b>Tabulka 2:</b> Kategorie mentální retardace podle MKN-10.....	9
<b>Tabulka 3</b> Výskyt PAS u pacientů s vybranými syndromy podmíněnými CNV .....	14
<b>Tabulka 4:</b> Výskyt PAS u pacientů s vybranými syndromy podmíněnými monogenně.....	16
<b>Tabulka 5:</b> Seznam použitých MLPA SALSA probemixů.....	23
<b>Tabulka 6:</b> Složení Ligačního mixu na přípravu jedné reakce .....	23
<b>Tabulka 7:</b> Složení PCR mixu na přípravu jedné reakce .....	23
<b>Tabulka 8:</b> Teplotní profil PCR reakce .....	23
<b>Tabulka 9:</b> Nastavení separačních podmínek v přístroji ABI 3130 .....	24
<b>Tabulka 10:</b> Příprava Labeling Master Mix pro Cy-5 pro vzorky .....	26
<b>Tabulka 11:</b> Příprava Labeling Master Mix pro Cy-3 pro negativní reference.....	26
<b>Tabulka 12:</b> Příprava hybridizačního mixu .....	27
<b>Tabulka 13:</b> Výsledky analýzy klinických obrazů pacientů s MR a PAS a jejich porovnání metodou Fisherova exaktního testu .....	30
<b>Tabulka 14:</b> Počet zachycených CNV u 175 pacientů metodami aCGH a SNP aCGH .....	31
<b>Tabulka 15:</b> Přehled zachycených patogenních CNV .....	32
<b>Tabulka 16:</b> Přehled klinických obrazů pacientů s pravděpodobně patogenními CNV.....	35
<b>Tabulka 17:</b> Přehled pravděpodobně patogenních CNV a jejich nejvýznamnějších genů .....	36
<b>Tabulka 18:</b> Přehled popsání patogenních a pravděpodobně patogenních změn menších než 50 pb v databázi CVlinVar v genech zasažených pravděpodobně patogenní CNV .....	37
<b>Tabulka 19:</b> Přehled zachycených CNV s neznámým významem a klinické obrazy ve skupině MR .....	39
<b>Tabulka 20:</b> Přehled genů zasažených neznámými CNV variantami u skupiny MR .....	40
<b>Tabulka 21:</b> Přehled zachycených CNV s neznámým významem a klinické obrazy ve skupině pacientů s PAS .....	41
<b>Tabulka 22:</b> Přehled genů zasažených neznámými CNV variantami u skupiny PAS.....	42
<b>Tabulka 23:</b> Porovnání klinických a genetických nálezů pacientů s duplikací 9p24.3 .....	48

<b>Tabulka 24:</b> Porovnání klinických a genetických nálezů pacientů s duplikací 9p24.3 .....	52
--	----

## 13 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Triáda symptomů.....	5
<b>Obrázek 2:</b> Diagram rozložení nalezených CNV u pacientů s MR a/nebo PAS .....	14
<b>Obrázek 3:</b> Rozložení aberací mtDNA .....	17
<b>Obrázek 4:</b> Distribuce jednotlivých typů a kategorií CNV mezi skupinami pacientů s PAS a MR .....	31
<b>Obrázek 5:</b> Distribuce patogenních CNV na jednotlivých chromozomech pro jednotlivé skupiny pacientů .....	34
<b>Obrázek 6:</b> Distribuce CNV s neznámým významem pro jednotlivé skupiny pacientů .....	38
<b>Obrázek 7:</b> Distribuce CNV s pst. benigním a benigním významem pro jednotlivé skupiny pacientů.....	43
<b>Obrázek 8:</b> Závislost přítomnosti/nepřítomnosti ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciálních dysmorfických rysů a patogenní CNV ve skupině pacientů s MR .....	44
<b>Obrázek 9:</b> Závislost přítomnosti/nepřítomnosti ADHD, epilepsie, mikro/makrocefalie, faciálních dysmorfických rysů a patogenní CNV ve skupině pacientů s PAS .....	45
<b>Obrázek 10:</b> Porovnání přítomnosti patogenních CNV u pacientů s epilepsií mezi skupinami MR a PAS .....	46
<b>Obrázek 11:</b> Pravděpodobnost záchytu patogenní CNV ve skupině pacientů s PAS a s faciálními dysmorfickými rysy, epilepsií, makrocefálií nebo jejich kombinací .....	46
<b>Obrázek 12:</b> Grafické znázornění duplikace 2q37.1 u probanda 1 a probanda 2 .....	48
<b>Obrázek 13:</b> Fotografie probanda 3 .....	49
<b>Obrázek 14:</b> Fotografie sestry probanda 3 .....	50
<b>Obrázek 15:</b> Grafické znázornění duplikace 9p24.3 u probanda 3, sestry probanda 3, probanda 4 a probanda 5 .....	53

## 14 Seznam rovnic

<b>Rovnice 1:</b> Výpočet stupně značení .....	27
<b>Rovnice 2:</b> Výpočet specifické aktivity .....	27
<b>Rovnice 3:</b> Výpočet výtěžku značení .....	27

## 15 Seznam příloh

<b>Příloha č.1</b>	Informovaný souhlas pacienta
<b>Příloha č.2</b>	SALSA MLPA Probemix P036
<b>Příloha č.3</b>	SALSA MLPA Probemix P070
<b>Příloha č.4</b>	SALSA MLPA Probemix P106
<b>Příloha č.5</b>	SALSA MLPA Probemix P245
<b>Příloha č.6</b>	SALSA MLPA Probemix P297
<b>Příloha č.7</b>	SALSA MLPA Probemix P343
<b>Příloha č.8</b>	Seznam popsaných patogenních, pst. patogenních a neznámých změn < 50pb v genech <i>GNAS</i> , <i>ATP11C</i> a <i>F9</i>

## 16 Seznam zkratk

aCGH	komparativní genomová hybridizace
AD	autozomálně dominantní dědičnost
ADHD	hyperaktivita
ADI-R	Autism Diagnostic Interview-Revised
ADOS	Autism Diagnostic Observation Schedule
AQ	Autism Quotient
AR	autozomálně recesivní dědičnost
AS	Angelmanův syndrom
BMI	body mass index
BWS	Beckwithův-Wiedemannův syndrom
CA	Kalifornie
CARS	Childhood Autism Rating Scale
CNS	centrální nervová soustava

CNV	variabilita počtu kopií genomu
DECIPHER	Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
del.	delece
DGV	Database of genomic variants
DMO	lehká mozková dysfunkce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DSM	Diagnostický a statistický manuálu
dup.	duplikace
dUTP	deoxyuridin trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
F	žena
gDNA	genomická DNA
GEO	Gene Expression Omnibus
IQ	intelligenčního kvocientu
ISCA	The International Standards for Cytogenomic Arrays
kb	kilobáze
LCh	Leighova choroba
M	muž
mat.	maternálně
Mb	megabáze
MELAS	Mitochondriální encefalomyopatie s laktátovou acidózou a iktu podobné epizody
MERRF	Myoklonická epilepsie s potrhanými červenými svalovými vlákny
M-CHAT	Modified Checklist of Autism in Toddlers
MIAME	Minimum Information about a Microarray Experiment
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPS/NGS	masivně paralelní sekvenování
MR	mentální retardace
MS MLPA	methyl specific MLPA

mtDNA	mitochondriální DNA
NCBI	Mezinárodní centrum pro biotechnologická data
ns.	bez statisticky významného rozdílu
nz.	neznámý
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAS	poruchy autistického spektra
pat.	paternálně zděděno
pb	pár bazí
PDD	Pervazivní vývojové poruchy
Pst.	pravděpodobně
PWS	Praderův-Williho syndrom
SD	směrodatná odchylka
SFARI	Simons Foundation Autism Research Initiative
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SNP	
aCGH	Single nucleotide polymorphism aCGH
SRS	Silverův-Russellův syndrom
TE	Tris/EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethanu
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
UPD	uniparentální disomie
USA	Spojené státy americké
VVV	vrozené vývojové vady
WES	celoexomové sekvenování
WGS	celogenomové sekvenování
WHO	Světová zdravotnická organizace
XLR	X vázaná recesivní dědičnost

## 17 Použitá literatura

ABGHARI, F.Z., M. AKOUCHEKIAN a Y. MORADI. 2019. PTEN gene mutations in patients with macrocephaly and classic autism: A systematic review. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* [online]. **33**(1): 52 - 59. DOI: 10.341711/mjiri.33.10. ISSN 22516840

ADANG, L. A., O. SHERBINI, L. BALL, et al. 2017. Revised consensus statement on the preventive and symptomatic care of patients with leukodystrophies. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **122**(1-2): 18-32. DOI: 10.1016/j.ymgme.2017.08.006

AL AGEELI, E., S. DRUNAT, C. DELANOË, et al. 2014. Duplication of the 15q11-q13 region: Clinical and genetic study of 30 new cases. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **57**(1): 5-14. DOI: 10.1016/j.ejmg.2013.10.008

ALBORES-GALLO, L., L. FRITSCHÉ-GARCÍA, A. P. MIRANDA-AGUIRRE a M. AVILA-ACOSTA. 2017. Brief Report: Macrocephaly Phenotype and Psychiatric Comorbidity in a Clinical Sample of Mexican Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. **47**(9): 2911-2917. DOI: 10.1007/s10803-017-3175-4

ALOUI, M., K. NASRI, N. B. JEMAA, et al. 2017. Fetopathological examination for the fetuses with Down syndrome in Tunisia: Epidemiological study and associated malformations. *Pathology - Research and Practice* [online]. **213**(9): 1200-1206. DOI: 10.1016/j.prp.2017.05.001

ALTMANN, J., B. BÜCHNER, A. NADAJ-PAKLEZA, et al. 2016. Expanded phenotypic spectrum of the m.8344AG "MERRF" mutation: data from the German mitoNET registry. *Journal of Neurology* [online]. 263(5): 961-972. DOI: 10.1007/s00415-016-8086-3 -972

ALAZAMI, A. M., N. PATEL, H. E. SHAMSELDIN, et al. 2015. Accelerating Novel Candidate Gene Discovery in Neurogenetic Disorders via Whole-Exome Sequencing of Prescreened Multiplex Consanguineous Families. *Cell Reports* [online]. **10**(2): 148-161. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.12.015



AMIET, C., I. GOURFINKEL-AN, C. LAURENT, 2013. Does epilepsy in multiplex autism pedigrees define a different subgroup in terms of clinical characteristics and genetic risk? *Molecular Autism* [online]. **4**(1). DOI: 10.1186/2040-2392-4-47

ANTONARAKIS, S. E. 2017. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nature Reviews Genetics* [online]. **18**(3): 147-163. DOI: 10.1038/nrg.2016.154

ASTUTI, D, M. R MORRIS, W. N COOPER, et al. 2012. Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nature Genetics* [online]. **44**(3): 277-284. DOI: 10.1038/ng.1071

ARROYO, H. A. Microcefalia [Microcephaly]. *Medicina (B Aires)*. 2018;78 Suppl 2:94-100.

ATTWOOD, T. Aspergerův syndrom. Praha: Portál. 2005. 208. ISBN 80-7178-979-8.

BĂDESCU, G. M., M. FÎLFAN, R. E. SANDU, et al. 2016. Molecular mechanisms underlying neurodevelopmental disorders, ADHD and autism. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 57(2):361-366.

BAKER, E. K., D. E. GODLER, M. BUI, C. HICKERTON, et al. 2018. Exploring autism symptoms in an Australian cohort of patients with Prader-Willi and Angelman syndromes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* [online]. **10**(1). DOI: 10.1186/s11689-018-9242-0

BARENDSE, E. M., M. P. H. HENDRIKS, G. THOONEN, et al. 2018. Social behaviour and social cognition in high-functioning adolescents with autism spectrum disorder (ASD): two sides of the same coin? *Cognitive Processing* [online]. **19**(4): 545-555. DOI: 10.1007/s10339-018-0866-5

BARTOŇOVÁ, Miroslava, Barbora BAZALOVÁ a Jarmila PIPEKOVÁ. 2007. *Psychopedie: texty k distančnímu vzdělávání*. Brno: Paido. ISBN 978-80-7315-144-7

BATTAGLIA, A., J. C. CAREY a S. T. SOUTH. 2015. Wolf-Hirschhorn syndrome: A review and update. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics [online]*. **169**(3): 216-223. DOI: 10.1002/ajmg.c.31449

BATTAGLIA, A., V. DOCCINI, L. BERNARDINI, 2013. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *European Journal of Paediatric Neurology [online]*. **17**(6): 589-599. DOI: 10.1016/j.ejpn.2013.04.010

BAER, S., A. AFENJAR, T. SMOL, et al. 2018. Wiedemann-Steiner syndrome as a major cause of syndromic intellectual disability: A study of 33 French cases. *Clinical Genetics [online]*. **94**(1): 141-152. DOI: 10.1111/cge.13254

BEAN JAWORSKI, J. L., T. FLYNN, N. BURNHAM, et al. 2017. Rates of autism and potential risk factors in children with congenital heart defects. *Congenital Heart Disease [online]*. **12**(4): 421-429. DOI: 10.1111/chd.12461

BEAUDET, A. L. 2013. The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics. *Child Development [online]*. **84**(1): 121-132. DOI: 10.1111/cdev.12050

BEN-DAVID, B. M., E. BEN-ITZCHAK, G. ZUKERMAN, et al. 2020. The Perception of Emotions in Spoken Language in Undergraduates with High Functioning Autism Spectrum Disorder: A Preserved Social Skill. *Journal of Autism and Developmental Disorders [online]*. **50**(3): 741-756. DOI: 10.1007/s10803-019-04297-2

BENÍTEZ-BURRACO, A., M. BARCOS-MARTÍNEZ, Is. ESPEJO-PORTERO a S. JIMÉNEZ-ROMERO. 2017. Variable Penetrance of the 15q11.2 BP1-BP2 Microduplication in a Family with Cognitive and Language Impairment. *Molecular Syndromology [online]*. **8**(3): 139-147. DOI: 10.1159/000468192

BERG, A. T. a S. PLIOPLYS. 2012. Epilepsy and autism: Is there a special relationship? *Epilepsy & Behavior [online]*. **23**(3): 193-198. DOI: 10.1016/j.yebeh.2012.01.015

BERGBAUM, A. a C. M. OGILVIE. 2016. Autism and chromosome abnormalities-A review. *Clinical Anatomy* [online]. **29**(5): 620-627. DOI: 10.1002/ca.22719

BERNARDINI, L., V. ALESI, S. LODDO, et al. 2010. High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *European Journal of Human Genetics* [online]. **18**(2): 178-185. DOI: 10.1038/ejhg.2009

BERNIER, R., G. DAWSON, S. WEBB a M. MURIAS. 2007. EEG mu rhythm and imitation impairments in individuals with autism spectrum disorder. *Brain and Cognition* [online]. **64**(3): 228-237. DOI: 10.1016/j.bandc.2007.03.004

BILLECI, L., S. CALDERONI, E. CONTI, et al. 2019. Brain Network Organization Correlates with Autistic Features in Preschoolers with Autism Spectrum Disorders and in Their Fathers: Preliminary Data from a DWI Analysis. *Journal of clinical medicine* [online]. **8**(4). DOI: 10.3390/jcm8040487

BLANKEN, L. M. E., A. DASS, G. ALVARES, et al. 2018. A prospective study of fetal head growth, autistic traits and autism spectrum disorder. *Autism Research* [online]. **11**(4): 602-612. DOI: 10.1002/aur.1921

BORLOT, F., B. M. REGAN, A. S. BASSETT, et al. 2017. Prevalence of Pathogenic Copy Number Variation in Adults With Pediatric-Onset Epilepsy and Intellectual Disability. *JAMA Neurology* [online]. **74**(11). DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.1775

BOYLE, M.I., C. JESPERGAARD, K. BRØNDUM-NIELSEN, et al. 2015. Cornelia de Lange syndrome. *Clinical Genetics* [online]. **88**(1): 1-12. DOI: 10.1111/cge.12499

BOURGERON, T. 2016. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *Comptes Rendus Biologies* [online]. **339**(7-8): 300-307. DOI: 10.1016/j.crv.2016.05.004

CAPKOVA, P., J. SROVNAL, Z. CAPKOVA, et al. 2019. MLPA is a practical and complementary alternative to CMA for diagnostic testing in patients with autism spectrum disorders and identifying new candidate CNVs associated with autism. *PeerJ* [online]. **6**. DOI: 10.7717/peerj.6183

CHAN, P. Y. T., H. M. LUK, F. M. Y. LEE a I. F. M. LO. 2018. Genetic profile and clinical application of chromosomal microarray in children with intellectual disability in Hong Kong. *Hong Kong Medical Journal* [online]. DOI: 10.12809/hkmj187260

CHASTE, P. a M. LEBOYER. 2012. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience*. **14**(3):281-92.

CHIEN, W.H., S. S. GAU, Y. Y. WU, et al. 2010. Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. *Clinical Genetics* [online]. **78**(5): 449-456. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01395.x

COSTALES, J. L. a A. KOLEVZON. 2015. Phelan–McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics* [online]. **12**(3): 620-630. DOI: 10.1007/s13311-015-0352-z

CRESPI, B., E. LEACH, N. DINSDALE, et al. 2016. Imagination in human social cognition, autism, and psychotic-affective conditions. *Cognition* [online]. **150**: 181-199. DOI: 10.1016/j.cognition.2016.02.001

CRUZ, A.C.P., A. FERRASA, R.H. HERAI a A.R. MUOTRI. 2019. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders. *Mitochondrion* [online]. **46**: 345 – 360. DOI: 10.1016/j.mito.2018.09.005

CUNNINGHAM, M. L. a C. L HEIKE. 2007. Evaluation of the infant with an abnormal skull shape. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. **19**(6): 645-651. DOI: 10.1097/MOP.0b013e3282f1581a

LADUCA, H., K. D. FARWELL, H. VUONG, et al. 2017. Exome sequencing covers 98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels. *PLOS ONE* [online]. **12**(2). DOI: 10.1371/journal.pone.0170843.

DE LA TORRE-UBIETA, L., H. WON, J. L. STEIN a D. H GESCHWIND. 2016. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Medicine* [online]. **22**(4): 345-361. DOI: 10.1038/nm.4071

ERGER, F., C. P. SCHAAF a C. NETZER. 2019. Which genes to assess in the NGS diagnostics of intellectual disability? The case for a consensus database-driven and expert-curated approach. *Molecular and Cellular Probes* [online]. **45**: 84-88. DOI: 10.1016/j.mcp.2019.03.006

ESPIRITO SANTO, L. D., L. M. A. MOREIRA a M. RIEGEL. 2016. Cri-Du-Chat Syndrome: Clinical Profile and Chromosomal Microarray Analysis in Six Patients. *BioMed Research International* [online]. **2016**: 1-9. DOI: 10.1155/2016/5467083

EVANS, B. 2013. How autism became autism. *History of the Human Sciences* [online]. **26**(3): 3-31. DOI: 10.1177/0952695113484320

FAZZARI, M. J. aj. M. GREALLY. 2010. Introduction to Epigenomics and Epigenome-Wide Analysis. *Methods in Molecular Biology*. **620**: 243-265. DOI: 10.1007/978-1-60761-580-4\_7

FINI, J. B. a B. DEMENEIX. 2019. Les perturbateurs thyroïdiens et leurs conséquences sur le développement cérébral. *Biologie Aujourd'hui* [online]. **213**(1-2): 17-26. DOI: 10.1051/jbio/2019009

FINSTERER, J. a S. M. WAKIL. 2016. Stroke-like episodes, peri-episodic seizures, and MELAS mutations. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. **20**(6): 824-829. DOI: 10.1016/j.ejpn.2016.08.002

FOMBONNE, E. 2009. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. *Pediatric Research* [online]. **65**(6): 591-598. DOI: 10.1203/PDR.0b013e31819e7203

D’GAMA, A. M. a C. A. WALSH. 2018. Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. *Nature Neuroscience* [online]. **21**(11): 1504-1514. DOI: 10.1038/s41593-018-0257-3

GLESSNER, J. T., J. LI, D. WANG, et al. 2017. Copy number variation meta-analysis reveals a novel duplication at 9p24 associated with multiple neurodevelopmental disorders. *Genome Medicine* [online]. **9**(1). DOI: 10.1186/s13073-017-0494-1

GREEN SNYDER, L. A., D. D’ANGELO, Q. CHEN, et al. 2016. Autism Spectrum Disorder, Developmental and Psychiatric Features in 16p11.2 Duplication. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. **46**(8): 2734-2748 [cit. 2020-08-22]. DOI: 10.1007/s10803-016-2807-4

GUO, H., T. WANG, H. WU, et al. 2018. Inherited and multiple de novo mutations in autism/developmental delay risk genes suggest a multifactorial model. *Molecular Autism* [online]. **9**(1). DOI: 10.1186/s13229-018-0247-z

HORN, S., M. AU, L. BASEL-SALMON, et al. 2019. De novo variants in PAK1 lead to intellectual disability with macrocephaly and seizures. *Brain* [online]. **142**(11): 3351-3359. DOI: 10.1093/brain/awz264

MCGOWAN, P. O., A. SASAKI, A. C. D’ALESSIO, et al. 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience* [online]. **12**(3): 342-348. DOI: 10.1038/nn.2270

MILLER, D. T., M. P. ADAM, S. ARADHYA, et al. 2010. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **86**(5): 749-764. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006

GUO, H., T. WANG, H. WU, et al. 2018. Inherited and multiple de novo mutations in autism/developmental delay risk genes suggest a multifactorial model. *Molecular Autism* [online]. **9**(1). DOI: 10.1186/s13229-018-0247-z

HO, K., E. WASSMAN, A. BAXTER, et al. 2016. Chromosomal Microarray Analysis of Consecutive Individuals with Autism Spectrum Disorders Using an Ultra-High Resolution Chromosomal Microarray Optimized for Neurodevelopmental Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(12). DOI: 10.3390/ijms17122070

HONDA, H., N. MIHARU, O. SAMURA, et al. 2000. Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics* [online]. **106**(2): 188-193. DOI: 10.1007/s004390051027

HOSOZAWA, M., A. SACKER, W. MANDY, et al. 2020. Determinants of an autism spectrum disorder diagnosis in childhood and adolescence: Evidence from the UK Millennium Cohort Study. *Autism* [online]. **24**(6): 1557-1565. DOI: 10.1177/1362361320913671

HU, V. W., T. SARACHANA, K. S. KIM, et al. 2009. Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders: evidence for circadian rhythm dysfunction in severe autism. *Autism Research* [online]. **2**(2): 78-97. DOI: 10.1002/aur.73

IVANOV, H. Y., V. K. STOYANOVA, N. T. POPOV a T. I. VACHEV. 2015. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Medica* [online]. **57**(1): 19-28. DOI: 10.1515/folmed-2015-0015.

JACQUEMONT, S., B. P. COE, M. HERSCH, et al. 2014. A Higher Mutational Burden in Females Supports a "Female Protective Model" in Neurodevelopmental Disorders. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **94**(3): 415-425. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.02.001

JASENSKÁ, P. *Nejčastější příčiny mentální retardace z hlediska doby vzniku*. Olomouc, 2012. 48 s. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Bezděková M.

JELÍNKOVÁ, M. 2010. *Autismus – pervazivní vývojové poruchy*. Praha: Autistik.

JIANG, Y. S. a Z. H. XU. 2019. [Brain developmental diseases and pathogenic mechanisms]. *Yi chuan = Hereditas* [online]. **41**(9): 801-815 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.16288/j.ycz.19-133

JOKIRANTA, E., A. SOURANDER, A. SUOMINEN. 2014. Epilepsy Among Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders: A Population-Based Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. **44**(10): 2547-2557. DOI: 10.1007/s10803-014-2126-6

KAUR, P., S. MISHRA, S. M. RAJESH, et al. 2019. GATAD2B-related intellectual disability due to parental mosaicism and review of literature. *Clinical Dysmorphology* [online]. **28**(4): 190-194. DOI: 10.1097/MCD.0000000000000288

KAZEMI, M., M. SALEHI a M. KHEIROLLAHI. (2016): Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. **5**(3): 125–133

KENT, L., S. BOWDIN, G. A. KIRBY, et al. 2008. Beckwith Weidemann syndrome: A behavioral phenotype-genotype study. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [online]. **147B**(7): 1295-1297. DOI: 10.1002/ajmg.b.30729



KLEIN, S., P. SHARIFI-HANNAUER a J. A. MARTINEZ-AGOSTO. 2013. Macrocephaly as a Clinical Indicator of Genetic Subtypes in Autism. *Autism Research* [online]. **6**(1): 51-56. DOI: 10.1002/aur.1266

KRGOVIC, D., N. KOKALJ VOKAC, A. ZAGORAC a H. GREGORIC KUMPERSCAK. 2018. Rare structural variants in the DOCK8 gene identified in a cohort of 439 patients with neurodevelopmental disorders. *Scientific Reports* [online]. **8**(1) [cit. 2020-08-22]. DOI: 10.1038/s41598-018-27824-0

KROUPOVÁ, K. a L. LUDÍKOVÁ. 2010. Kvalita života dětí s retinopatií nedonošených. [rukopis]. *Kvalita života dětí s retinopatií nedonošených [rukopis] / .K. Stejskalová* [online]

KRUSZKA, P., C. TEKENDO-NGONGANG a M. MUENKE. 2019. Diversity and dysmorphology. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. **31**(6): 702-707. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000816

KUBOTA, T. 2018. Epigenetics of Neurodevelopmental Disorders Comes of Age with Roles in Clinical and Educational Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(9). DOI: 10.3390/ijms19092720

LAKE, N. J., A. G. COMPTON, S. RAHMAN a D. R. THORBURN. 2016. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of Neurology* [online]. **79**(2): 190-203. DOI: 10.1002/ana.24551

LALLAR, M., A. RAJ a P. SRIVASTAVA, et al. 2018. Molecular Testing of MECP2 Gene in Rett Syndrome Phenotypes in Indian Girls. *Indian Pediatrics*. **55**(6):474-477.

LEBLOND, C. S., J. HEINRICH, R. DELORME, et al. 2012. Genetic and Functional Analyses of SHANK2 Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics* [online]. **8**(2). DOI: 10.1371/journal.pgen.1002521

LEE, I. S., C. M. B. CARVALHO, P. DOUVARAS, et al. 2015. Characterization of molecular and cellular phenotypes associated with a heterozygous CNTNAP2 deletion using patient-derived hiPSC neural cells. *Npj Schizophrenia* [online]. **1**(1). DOI: 10.1038/npjSchz.2015.19. ISSN 2334-265X

LEE, B. H., T. SMITH a A. R. PACIORKOWSKI. 2015. Autism spectrum disorder and epilepsy: Disorders with a shared biology. *Epilepsy & Behavior* [online]. **47**: 191-201. DOI: 10.1016/j.yebeh.2015.03.017

LOGHMANI, K. H., A. KARIMINEJAD, G. ZAMANI, et al. 2014. Investigation of microdeletions in syndromic intellectual disability by MLPA in Iranian population. *Archives of Iran Medicine*. **17**(7):471-474.

MARTINEZ-MORGA, M. a S. MARTINEZ. 2016. Brain development and plasticity. *Revista de neurologia* [online]. **62**: S3 - S8. ISSN 15766578

MCCAULLEY a M. E. 2019. Autism spectrum disorder and mercury toxicity: use of genomic and epigenetic methods to solve the etiologic puzzle. *Acta Neurobiologiae Experimentalis Journal*. **79**(2):113-125. DOI: 10.21307/ane-2019-010

MENASHE, I., P. GRANGE, E. C. LARSEN, et al. 2013. Co-expression Profiling of Autism Genes in the Mouse Brain. *PLoS Computational Biology* [online]. **9**(7). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003128

MERIKANGAS, A. K., R. SEGURADO, E. A. HERON, et al. 2015. The phenotypic manifestations of rare genic CNVs in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry* [online]. **20**(11): 1366-1372. DOI: 10.1038/mp.2014.150.

MULLE, J. G., A. E. PULVER, J. A. MCGRATH, et al. 2014. Reciprocal Duplication of the Williams-Beuren Syndrome Deletion on Chromosome 7q11.23 Is Associated with Schizophrenia. *Biological Psychiatry* [online]. **75**(5): 371-377. DOI: 10.1016/j.biopsych.2013.05.040.

MUNDHOFIR, F.E.P., T.I. WINARNI, S.M.H. FARADZ, et al. 2012. A cytogenetic study in a large population of intellectually disabled Indonesians. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* [online]. **16**(5): 412 - 417. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0157

MURGATROYD, C., A. V. PATCHEV, Y. WU, et al. 2009. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature Neuroscience* [online]. **12**(12): 1559-1566 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.1038/nn.2436

NAKAJIMA, M., L. I. SCHMITT, G. FENG a M. M. HALASSA. 2019. Combinatorial Targeting of Distributed Forebrain Networks Reverses Noise Hypersensitivity in a Model of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* [online]. **104**(3): 488-500.e11. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.09.040

NIARCHOU, M., S. J. R. A. CHAWNER, J. L. DOHERTY, et al. 2019. Psychiatric disorders in children with 16p11.2 deletion and duplication. *Translational Psychiatry* [online]. **9**(1) [cit. 2020-08-22]. DOI: 10.1038/s41398-018-0339-8

OLSON, H., Y. SHEN, J. AVALLONE, et al. 2014. Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Annals of Neurology* [online]. **75**(6): 943-958. DOI: 10.1002/ana.24178

OROZCO, J. S., I. HERTZ-PICCIOTTO, L. ABBEDUTO a C. M. SLUPSKY. 2019. Metabolomics analysis of children with autism, idiopathic-developmental delays, and Down syndrome. *Translational Psychiatry* [online]. **9**(1). DOI: 10.1038/s41398-019-0578-3

PAGNAMENTA, A. T., P. J. KAISAKI, F. BENNETT, et al. 2019. Delineation of dominant and recessive forms of LZTR1 -associated Noonan syndrome. *Clinical Genetics* [online]. **95**(6): 693-703 [cit. 2020-08-22]. DOI: 10.1111/cge.13533. ISSN 0009-9163

PANTALEÓN F., G. a T. JUVIER R. 2015. Bases moleculares del síndrome de Rett, una mirada actual. *Revista Chilena de Pediatría* [online]. **86**(3): 142-151 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.1016/j.rchipe.2015.07.001

PAPAVASSILIOU, P., C. CHARALSAWADI, K. RAFFERTY a C. JACKSON-COOK. 2015. Mosaicism for trisomy 21: A review. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. **167**(1): 26-39. DOI: 10.1002/ajmg.a.36861

PASTIERKOVÁ L. 2013. Poruchy autistického spektra. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 117. ISBN 978-80-244-3732-3

PEYCHEVA, V., K. KAMENAROVA, N. IVANOVA, et al. 2018. Chromosomal microarray analysis of Bulgarian patients with epilepsy and intellectual disability. *Gene* [online]. **667**: 45-55. DOI: 10.1016/j.gene.2018.05.015

PICINELLI, C., C. LINTAS, I. Stefano PIRAS. 2016. Recurrent 15q11.2 BP1-BP2 microdeletions and microduplications in the etiology of neurodevelopmental disorders. *American Journal of*

*Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [online]. **171**(8): 1088-1098. DOI: 10.1002/ajmg.b.32480

POLÁŠKOVÁ E. 2010. Význam a pomoc poradenských služeb pro klienty s poruchami autistického spektra. Olomouc. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Pedagogická fakulta. Sroková E.

PROCHÁZKA, M., R. VRTĚL a R. VODIČKA. 2018. *Základy lékařské genetiky pro studenty všeobecného lékařství / M. Procházka (editor), R. Vodička, R. Vrtěl a kolektiv*. ISBN 9788024453682

QIAO, Y., E. MERCIER, J. DASTAN, et al. 2014. Copy number variants (CNVs) analysis in a deeply phenotyped cohort of individuals with intellectual disability (ID). *BMC Medical Genetics* [online]. **15**(1). DOI: 10.1186/1471-2350-15-82

QUINTELA, I., J. EIRÍS, C. GÓMEZ-LADO, et al. 2017. Copy number variation analysis of patients with intellectual disability from North-West Spain. *Gene* [online]. **626**: 189-199. DOI: 10.1016/j.gene.2017.05.032. ISSN 03781119

RAMAEKERS, .V. T., J. M. SEQUEIRA, Marco DIDUCA, et al. 2019. Improving Outcome in Infantile Autism with Folate Receptor Autoimmunity and Nutritional Derangements: A Self-Controlled Trial. *Autism Research and Treatment* [online]. **2019**: 1-12. DOI: 10.1155/2019/7486431

RICHARDS, C., C. JONES, L. GROVES, et al. 2015. Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* [online]. **2**(10): 909-916. DOI: 10.1016/S2215-0366(15)00376-4

RIESKE, R. t D. a J. L. MATSON. 2020. Parental Age at Conception and the Relationship with Severity of Autism Symptoms. *Developmental Neurorehabilitation* [online]. **23**(5): 265-270. DOI: 10.1080/17518423.2019.1645222

RIGGS, E. R., E. F. ANDERSEN, A. M. CHERRY, et al. 2020. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine* [online]. **22**(2): 245-257. DOI: 10.1038/s41436-019-0686-8

RODNÝ, T. 2006. Věk otce a riziko autismu. *Psychologie Dnes*. Roč. 12, č. 10, s. 6. ISSN 1212-9607

RUZZO, E. K., L. PÉREZ-CANO, J. Y. JUNG, et al. 2019. Inherited and De Novo Genetic Risk for Autism Impacts Shared Networks. *Cell* [online]. **178**(4): 850-866.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.015

SAMANGO-SPROUSE, C., E. STAPLETON, S. CHEA, et al. 2018. International investigation of neurocognitive and behavioral phenotype in 47,XXY (Klinefelter syndrome): Predicting individual differences. *American journal of medical genetics. Part A* [online]. **176**(4): 877-885. DOI: 10.1002/ajmg.a.38621. ISSN 15524833

SANDERS, S. J., X. HE, A. J. WILLSEY, et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* [online]. **87**(6): 1215-1233. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.09.016

SCHAEFER, G. 2016. Clinical Genetic Aspects of Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(2): 180. DOI: 10.3390/ijms17020180

SHARMA, S. R., X. GONDA a F. I. TARAZI. 2018. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **190**: 91-104. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.007

SHATTUCK, P. T., M. M. SELTZER, J. S. GREENBERG, et al. 2007. Change in Autism Symptoms and Maladaptive Behaviors in Adolescents and Adults with an Autism Spectrum Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. **37**(9): 1735-1747. DOI: 10.1007/s10803-006-0307-7

SMITH, K., E. BOYD, C. BRENNAN, et al. 1993. Smith-Magenis Syndrome. *GeneReviews*

SVOBODA, M., M. VÁGNEROVÁ a D. KREJČÍŘOVÁ. 2015. *Psychodiagnostika dětí a dospívajících / M. Svoboda (ed.), D. Krejčířová, M. Vágnerová*. ISBN 9788026208990

SUSPITSIN, E. N., G. A. YANUS, M. Y. DOROFEEVA, et al. 2018. Pattern of TSC1 and TSC2 germline mutations in Russian patients with tuberous sclerosis. *Journal of Human Genetics* [online]. **63**(5): 597-604. DOI: 10.1038/s10038-018-0416-0

TAFAZOLI, A., P. ESHRAGHI, F. PANTALEONI, et al. 2018. Novel mutations and their genotype-phenotype correlations in patients with Noonan syndrome, using next-generation sequencing. *Advances in Medical Sciences* [online]. **63**(1): 87-93. DOI: 10.1016/j.advms.2017.07.001

TARAZI, F. I., Z. T. SAHLI, J. PLESKOW a S. A. MOUSA. 2015. Asperger's syndrome: diagnosis, comorbidity and therapy. *Expert Review of Neurotherapeutics* [online]. **15**(3): 281-293. DOI: 10.1586/14737175.2015.1009898

THOROVÁ, K.. 2016. *Poruchy autistického spektra / K. Thorová*. ISBN 9788026207689

VAN RIJN, S. 2015. Social Attention in 47,XXY (Klinefelter Syndrome): Visual Scanning of Facial Expressions Using Eyetracking. *Journal of the International Neuropsychological Society* [online]. **21**(5): 364-372. DOI: 10.1017/S1355617715000302

VORSTMAN, J. A. S., J. R. PARR, D. MORENO-DE-LUCA, et al. 2017. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics* [online]. **18**(6): 362-376. DOI: 10.1038/nrg.2017.4

TSAI, L. H. a J. W. LIN. 2020. Adaptation of Diagnosis from Autism Spectrum Disorder to Social Communication Disorder in Adolescents with ADHD. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. **50**(2): 685-687. DOI: 10.1007/s10803-019-04265-w

ULFARSSON, M. O., G. B. WALTERS, O. GUSTAFSSON, et al. 2017. 15q11.2 CNV affects cognitive, structural and functional correlates of dyslexia and dyscalculia. *Translational Psychiatry* [online]. **7**(4): e1109-e1109 [cit. 2020-08-22]. DOI: 10.1038/tp.2017.77

UWINEZA, A., J. HITAYEZU, M. JAMAR, et al. 2016. Cytogenetic Studies of Rwandan Pediatric Patients Presenting with Global Developmental Delay, Intellectual Disability and/or Multiple Congenital Anomalies. *Journal of tropical pediatrics* [online]. **62**(1): 38-45. DOI: 10.1093/tropej/fmv065

VAN DER ZWAAG, B., W. G. STAAL, R. HOCHSTENBACH, et al. 2009. A co-segregating microduplication of chromosome 15q11.2 pinpoints two risk genes for autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [online]. DOI: 10.1002/ajmg.b.31055

VANZO, R. J., H. TWEDE, K. S. HO. 2019. Clinical significance of copy number variants involving KANK1 in patients with neurodevelopmental disorders. *European Journal of Medical Genetics* [online]. **62**(1): 15-20. DOI: 10.1016/j.ejmg.2018.04.012

VARDI, O., M. DAVIDOVITCH, C. VINKLER, et al. 2012. Autistic regression in a child with Silver–Russell Syndrome and maternal UPD 7. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. **16**(1): 95-98. DOI: 10.1016/j.ejpn.2011.05.009



VISCIDI, E. W., E. W. TRICHE, M. F. PESCOLIDO, et al. 2013. Clinical Characteristics of Children with Autism Spectrum Disorder and Co-Occurring Epilepsy. *PLoS ONE* [online]. **8**(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0067797

VOELKERDING, K. V, S. A DAMES a J. D. DURTSCHI. 2009. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* [online]. **55**(4): 641-658 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789

WANG, T. S., W. H. TSAI, L- P. TSAI a S. B. WONG. 2020. Clinical characteristics and epilepsy in genomic imprinting disorders: Angelman syndrome and Prader–Willi syndrome. *Tzu Chi Medical Journal* [online]. **32**(2) [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.4103/tcmj.tcmj\_103\_19

WANG, Y., M. PICARD a Z. GU. 2016. Genetic Evidence for Elevated Pathogenicity of Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Autism Spectrum Disorder. *PLoS Genetics* [online]. **12**(10): e1006391 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006391

WATKINS, A., S. BISSELL, J. MOSS, et al. 2019. Behavioural and psychological characteristics in Pitt-Hopkins syndrome: a comparison with Angelman and Cornelia de Lange syndromes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* [online]. **11**(1). DOI: 10.1186/s11689-019-9282-0

WAYE, M. M. Y. a Ho Yu CHENG. 2018. Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* [online]. **72**(4): 228-244. DOI: 10.1111/pcn.12606

WAYHELOVA, M., J. SMETANA, V. VALLOVA, et al. 2019. The clinical benefit of array-based comparative genomic hybridization for detection of copy number variants in Czech children with intellectual disability and developmental delay. *BMC Medical Genomics* [online]. **12**(1). DOI: 10.1186/s12920-019-0559-7

WEAVER, I. C., N. CERVONI, F. A. CHAMPAGNE, et al. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience* [online]. **7**(8): 847-54. ISSN 10976256.

WHITTINGTON, J. a A. HOLLAND. 2018. A review of psychiatric conceptions of mental and behavioural disorders in Prader-Willi syndrome. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [online]. **95**: 396-405. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.10.006

WILSON, R. B., P. G. ENTICOTT a N. J. RINEHART. 2018. Motor development and delay. *Current Opinion in Neurology* [online]. **31**(2): 134-139 [cit. 2020-08-21]. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000541

XU, M., Y. JI, T. ZHANG et al 2018. Clinical Application of Chromosome Microarray Analysis in Han Chinese Children with Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience Bulletin* [online]. DOI: 10.1007/s12264-018-0238-2

YAN, J., Q. ZHANG, Y. CHEN a Z. J. CHEN. 2017. Birth of a Mosaic Non-Down Syndrome Offspring to a 45,XY,t(21;21)(q10;q10) Homologous Robertsonian Translocation Carrier: A Case Report. *The Journal of reproductive medicine* [online]. **62**(5-6): 337-41. ISSN 00247758.

YASIN, H., W. T. GIBSON, S. LANGLOIS, et al. 2019. A distinct neurodevelopmental syndrome with intellectual disability, autism spectrum disorder, characteristic facies, and macrocephaly is caused by defects in CHD8. *Journal of Human Genetics* [online]. **64**(4): 271-280. DOI: 10.1038/s10038-019-0561-0. ISSN 1434-5161

YU, H., Z. ZHANG, J. LIU, et al. 2020. Association study between genetic variants in vitamin D metabolism related genes and childhood autism spectrum disorder. *Metabolic Brain Disease* [online]. **35**(6): 971-978. DOI: 10.1007/s11011-020-00570-x

ZHANG, X. C., Li. Qi. SHU, X. S. ZHAO a X. K. LI. 2019. Autism spectrum disorders: autistic phenotypes and complicated mechanisms. *World Journal of Pediatrics* [online]. **15**(1): 17-25. DOI: 10.1007/s12519-018-0210-2

ZHANG, J., H. TONG, X. FU, et al. 2015. Molecular Characterization of NF1 and Neurofibromatosis Type 1 Genotype-Phenotype Correlations in a Chinese Population. *Scientific Reports* [online]. **5**(1). DOI: 10.1038/srep11291

## 18 Přílohy