

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Petra Kovářová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulární analýza genů hrajících  
roli v nemocech autistického spektra**

**Bakalářská práce**

**Petra Kovářová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Andrea Štefková**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Andrey Štefkové s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne: .....

.....

Podpis

## Souhrn

Porucha autistického spektra (ASD) je pervazivní vývojová porucha, která se charakteristicky vyznačuje trojicí příznaků: poruchou sociální interakce, verbální a neverbální komunikace a omezenými, opakujícími se nebo stereotypními vzorci chování. Dále se u pacientů s ASD mohou vyskytovat vady řeči, opožděný psychomotorický vývoj, epilepsie a celá řada dalších postižení.

Ačkoli řada publikací prokázala genetickou determinaci ASD, není mechanismus vzniku tohoto onemocnění zcela znám. Cílem této práce byla podrobná genetická analýza 12 vzorků DNA izolované z periferní krve pacientů s ASD. U těchto vzorků byl stanoven karyotyp (popř. FISH) a k cílené detekci copy number variants (CNVs) byly využity komerčně dodávané multiplex ligation-dependent probe amplification kity (MLPA) (MRC-Holland). Vybrané analyzované vzorky DNA byly dále odeslány k dovyšetření dalších CNVs pomocí SNP array (Affimetrix GeneChip).

U 12 vzorků DNA pacientů s ASD byly odhaleny 3 translokace. Nebalancovaná translokace mezi chromozomy 20 a 22 postihla zejména geny *CHRNA4*, *COL9A3*, *EEF1A2*, *KCNQ2*, *RTEL1* (20q13.33) a *SHANK3*, *ARSA* (22q13.3). Nebalancovaná translokace mezi chromozomy 8 a 22 postihla zejména geny *GATA4*, *SOX7* (8p23.1) a *SHANK3* (22q13.3). Tyto translokace byly příčinou submikroskopických delecí/duplikací v daných oblastech a byly také kauzálními pro klinický obraz pacientů. Balancovaná translokace byla doprovázená CNVs ve smyslu ztráty v oblastech 1q21.2q21.3, 1q21.3q22 (*POGZ*, *GATAD2B*), které byly dle příslušných databází a literatury příčinou klinického obrazu pacienta.

Metoda MLPA (popř. SNP array) odhalila u 4 pacientů s ASD patologické CNVs ve smyslu zisku v oblastech Xq28 (*MECP2*), ztráty 1q21.1 (*GJA5*) a ve smyslu zisku nebo ztráty v oblasti 16p11.2 (*KCTD13*, *SEZ6L2*, *MAPK3*). U jednoho pacienta byla zachycena delece v oblasti 15q11.2 s nejasným významem zahrnující část genu *SNRPN*. U zbylých 4 pacientů nebyl objasněn genetický původ ASD. V těchto případech může být genetická podstata ASD na úrovni jednonukleotidových změn (SNP), v regulačních oblastech nebo epigenetických mechanismech genů asociovaných s ASD. Ke studiu těchto oblastí zájmu je zapotřebí nových technik, např. masivně paralelního sekvenování (MPS) a rozsáhlých epigenetických a funkčních studií k prostudování skutečného dopadu CNVs nebo SNPs na klinický obraz pacienta.

## Summary

Autism spectrum disorder (ASD) is a pervasive developmental disorder, typically characterized by three signs: impairment in social interaction, verbal and non-verbal communication, restricted, repetitive and stereotyped patterns of behaviour. There are also many other impairments, like epilepsy, speech and motor delay, present with ASD.

Although many publications proved genetic determination of ASD, the mechanism of origin is still not clarified. The aim of this thesis was detailed analysis of 12 DNA samples, isolated from patients' peripheral blood. These samples were tested by karyotyping (alternatively FISH) and for detection of copy number variants (CNVs) were used commercial multiplex ligation-dependent probe amplification kits (MLPA) (MRC-Holland). Chosen analyzed DNA samples were sent to additional analysis of CNVs using SNP array (Affimetrix GeneChip).

In 12 DNA samples of patients with ASD were detected 3 translocations. Imbalanced translocation between chromosomes 20 and 22 affected particularly genes *CHRNA4*, *COL9A3*, *EEF1A2*, *KCNQ2*, *RTEL1* (20q13.33) and *SHANK3*, *ARSA* (22q13.3). Imbalanced translocation between chromosomes 8 and 22 affected particularly genes *GATA4*, *SOX7* (8p23.1) and *SHANK3* (22q13.3). These translocations were causes of submicroscopic deletions/duplications in given areas and were also causal for patients' clinical picture. Balanced translocation was accompanied by CNVs in meaning of loss in areas 1q21.2q21.3, 1q21.3q22 (*POGZ*, *GATAD2B*), which were, according to relevant databases and literature, cause of patient's clinical picture.

MLPA method (alternatively SNP array) detected in 4 patients with ASD pathological CNVs as a gain in region Xq28 (*MECP2*), as a loss 1q21.1 (*GJA5*) and as a gain or a loss in region 16p11.2 (*KCTD13*, *SEZ6L2*, *MAPK3*). In one patient was observed deletion in region 15q11.2 of unknown significance including part of the gene *SNRPN*. In cases of 4 remaining patients, genetic cause was not clarified. In these cases, the genetic substance of ASD can be at the level of single nucleotide polymorphism (SNP), regulative areas or epigenetic mechanisms of genes associated with ASD. For studying these areas of interest, new technologies are needed, for example massive parallel sequencing (MPS) and extensive epigenetic and functional studies for examination of real impact of CNVs and SNPs for patient's clinical picture.

### **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Andrei Štefkové za cenné rady, trpělivost a vstřícnost při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Josefu Srovnalovi, PhD. z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí doplňujících výsledků a celému kolektivu Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc.

# Obsah

1.	Úvod .....	9
2.	Cíl práce.....	10
3.	Současný stav řešené problematiky .....	11
3.1.	Poruchy autistického spektra.....	11
3.1.1.	Dětský autismus .....	12
3.1.2.	Atypický autismus .....	12
3.1.3.	Rettův syndrom.....	13
3.1.4.	Jinádezintegrační porucha v dětství.....	13
3.1.5.	Hyperaktivní porucha spojená s mentální retardací a stereotypními pohyby.....	13
3.1.6.	Aspergerův syndrom.....	14
3.1.7.	Jiné pervazivní vývojové poruchy .....	14
3.2.	Příčiny a dědičnost ASD .....	14
3.3.	Diagnostika ASD.....	15
3.3.1.	ADI-R .....	17
3.3.2.	CARS .....	18
3.3.3.	Cytogenetické hodnocení ASD.....	18
3.3.4.	Copy number variations (CNVs).....	18
3.4.	Terapeutické možnosti léčby ASD.....	22
4.	Vyšetřovací metody používané u pacientů s ASD .....	24
4.1.	Karyotypizace.....	24
4.2.	FISH .....	24
4.3.	MLPA.....	25
4.4.	Čipová komparativní genomová hybridizace (aCGH).....	26
4.5.	SNP array .....	27
5.	Materiál a metody .....	29

5.1.	Biologický materiál a jeho zpracování.....	29
5.2.	Chemikálie a roztoky .....	29
5.3.	Laboratorní vybavení .....	30
5.4.	Pracovní postup .....	31
5.4.1.	Izolace DNA vysolovací metodou.....	31
5.4.2.	MLPA .....	32
5.4.3.	Kapilární elektroforéza .....	34
5.4.4.	Vyhodnocení.....	35
6.	Výsledky.....	36
7.	Diskuze .....	48
8.	Závěr.....	51
9.	Seznam použitých zkratk .....	52
10.	Seznam použité literatury .....	53



# 1. Úvod

Poruchy autistického spektra jsou heterogenní neurovývojová onemocnění postihující v evropské populaci asi 1 ze 100 dětí. U takto postižených jedinců pozorujeme poruchy v sociální interakci komunikaci, repetitivní vzorce chování a pohybů, což těmto lidem často znemožňuje zapojit se do běžného života a žít nezávisle, bez trvalé péče ostatních.

Genetické i negenetické příčiny ASD jsou stále nejednoznačné a není znám žádný samostatný biologický či klinický marker, který by tyto poruchy definoval. Avšak s rozvojem cytogenetiky a molekulární biologie také došlo k vývoji mnoha metod, které umožňují detekovat již velmi malé změny v DNA a napomáhají tak k objasnění genetického pozadí ASD.

I přes tento pokrok je v praxi stále velice obtížné určit příčinu ASD. Diagnostika ASD je tak závislá převážně na znalostech a zkušenostech psychologů, lékařů, ale například i učitelů či logopedů. Z farmakologického hlediska neexistuje žádná účinná léčba odstraňující hlavní příznaky ASD. V závislosti na značné fenotypové heterogenitě těchto pacientů je včasná diagnostika tohoto onemocnění velmi důležitá zejména proto, že umožňuje behaviorální zásah, který může redukovat některé příznaky ASD, zlepšit výsledky vývoje pacienta a v neposlední řadě napomoci k individualizaci lékařské péče o něj i jeho blízké.

## 2. Cíl práce

- Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
- Molekulární analýza 12 vzorků pacientů pomocí metody MLPA.
- Popis pozorovaných CNVs a jejich analýza pomocí genetických databází a celosvětové literatury, popřípadě posouzení jejich vlivu na klinický obraz pacienta.
- Popis vybraných genů, které se nacházejí v pozorovaných CNVs a jsou asociované s ASD, popřípadě posouzení jejich vlivu na klinický obraz pacienta.

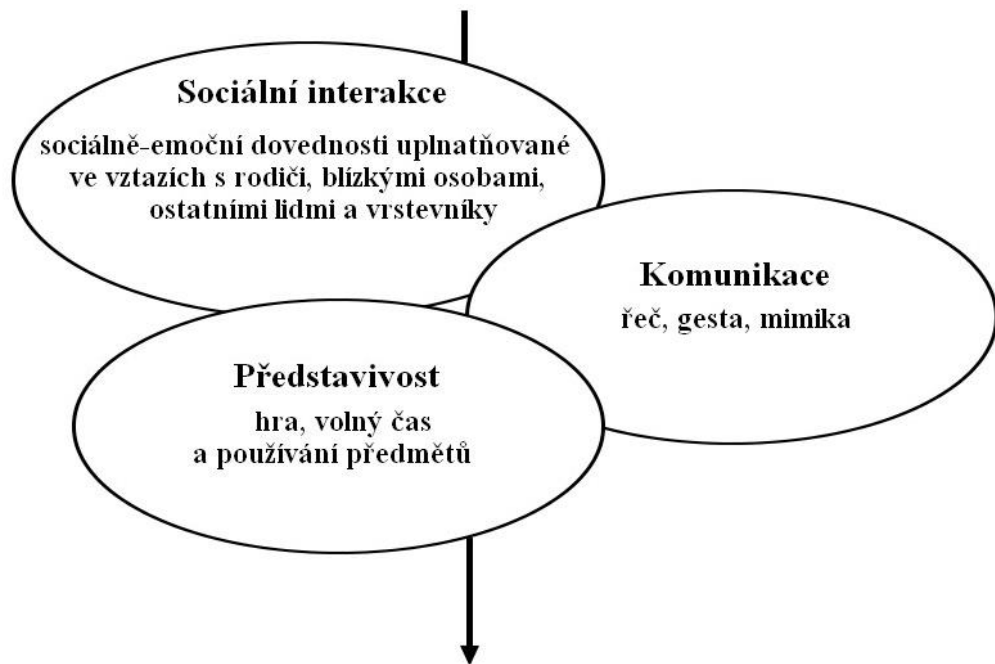
## 3. Současný stav řešené problematiky

### 3.1. Poruchy autistického spektra

Poruchy autistického spektra jsou onemocnění postihující růst a vývoj centrální nervové soustavy (CNS) vyznačující se abnormalitami v oblastech sociální integrace a komunikace, vadami řeči, stereotypními vzory chování a pohybů (American Psychiatric Association, 2013). Tato onemocnění mají širokou škálu projevů, spadají sem tedy jedinci se silnou mentální retardací, trvale závislí na péči rodiny, ale také jedinci s tzv. vysoce funkčním autismem (5 – 20 % případů) mající vyšší inteligenci, schopni zapojit se do běžného života. Současně s tímto typem poruchy se také někdy vyskytují výjimečné schopnosti, jako je fenomenální mechanická paměť či hudební a výtvarné nadání (Hort et al., 2000; Muhle et al., 2004). Výrazně je narušena komunikace, a opožděný vývoj řeči bývá jedním z prvních zaznamenaných příznaků. Přibližně 50 % postižených si nikdy neosvojí řeč na úroveň, kterou je možné použít ke komunikačním účelům (Thor, 2006).

V evropské populaci se ASD vyskytuje u 1 ze 100 dětí, přičemž až čtyřikrát častěji postihuje chlapce (De Rubeis et al., 2015; [www.autismeurope.org](http://www.autismeurope.org)). Ve více než 60 % případů se společně s ASD vyskytují i jiná onemocnění, jako je například epilepsie (30 %), ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) (30 %) nebo schizofrenie. Dalšími klinickými projevy mohou být gastrointestinální obtíže (9 – 70 %) či spánkové poruchy (50%) (Moreira et al., 2014; Gamsiz et al., 2015).

ASD řadíme mezi pervazivní vývojové poruchy. Vývoj dítěte je tedy narušen do hloubky v mnoha směrech a projevují se obvykle před třetím rokem života. Diagnostika vždy probíhá na základě přítomnosti určité sumy symptomů ve specifických oblastech, nikdy ne na základě jen několika projevů (Hadley et al., 2016; Thor, 2006.). V sedmdesátých letech vymezila britská psychiatryně Lorna Wing styčné problémové oblasti, které jsou klíčové pro diagnózu a nazvala je triádou poškození (viz Obrázek 1), což učinilo diagnostiku ASD méně obtížnou. Patří sem potíže v sociálním chování, komunikaci a představivosti (Thor, 2006).



**Obrázek 1:** Triáda poškození (převzato z Thor, 2006)

Světová zdravotnická organizace podle 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí dělí pervazivní vývojové poruchy na několik typů (viz níže) (Pastierik, 2013).

### 3.1.1. Dětský autismus

Dětský autismus byl poprvé popsán v roce 1943 Leo Kannerem a vyskytuje se v mnoha rozdílných formách s různým stupněm postižení. Vyznačuje se poruchami sociální interakce a komunikace, stereotypními zájmy a pohyby, přičemž symptomy jsou zaznamenávány typicky před třetím rokem věku. Mezi nejčastější komorbidity, vyskytující se společně s touto poruchou, patří mentální retardace, až u dvou třetin případů, či epilepsie (Skalny et al., 2016; Patrierik, 2013).

### 3.1.2. Atypický autismus

Tento typ autismu je charakteristický velmi heterogenními symptomy, které bývají zaznamenány až po třetím roce života, poruchy ve třech základních problémových oblastech typických pro ASD se projevují obvykle pouze ve velmi lehké formě (DiCicco-Bloom et al., 206). Na rozdíl od dětského autismu, se nevyznačuje repetitivním chováním a komunikačními deficity (Skalny et al., 2016).

### **3.1.3. Rettův syndrom**

Jedná se o progresivní onemocnění, vyskytující se téměř výhradně u žen. Vývoj je zdánlivě normální až do 6. až 18. měsíce, kdy se začínají objevovat první příznaky, dochází ke zpomalení růstu hlavy, ztrátám nabytých motorických schopností a řeči, typické je nepravidelné dýchání, stereotypní pohyby rukou a záchvaty. U takto postižených osob je výrazná mentální retardace, progresivní skolióza či kyfoskolióza často vedoucí k závislosti na invalidním vozíku. Dlouhou dobu byl tento syndrom považován za X-vázaný, s předpokladem, že u hemizygotních mužů je letální. V roce 1999 bylo však zjištěno, že tuto poruchu způsobují mutace genu MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2) a byly rovněž zaznamenány případy mužů trpících touto poruchou. K projevům typického Rettova syndromu u mužů dochází v případě somatického mozaicismu nebo nadbytečného X chromozomu, v ostatních případech MECP2 mutace vykazují fenotypy od této poruchy odlišné (Moog et al., 2003).

MECP2 je na X vázaný gen, nacházející se v oblasti Xq28. Protein, který tento gen kóduje, funguje jako methyl-dependentní represor transkripce a je rovněž zapojen do regulace RNA splicingu. Mutace tohoto genu je příčinou většiny případů Rettova syndromu, způsobuje také schizofrenii a další psychiatrická onemocnění ([www.gene.sfari.org](http://www.gene.sfari.org); Bueno et al., 2016).

### **3.1.4. Jiná dezintegrační porucha v dětství**

Tato porucha se vyznačuje výraznou regresí v oblasti řeči, kognitivních funkcí a nástupu mentální retardace mezi druhým a desátým rokem života, ačkoli předchozí vývoj probíhal zcela normálně. K pozorovaným projevům se přidává rovněž náhlý výskyt emoční lability, agrese, hyperaktivity či abnormální reakce na sluchové podněty (Thor, 2006; Muhle et al., 2004).

### **3.1.5. Hyperaktivní porucha spojená s mentální retardací a stereotypními pohyby**

Jedná se o nejednoznačně definovanou poruchu, jež spojuje hyperaktivitu, mentální retardaci, stereotypní pohyby a sebepoškozování. U tohoto typu poruchy se nevyskytuje sociální narušení autistického typu (Hort et al., 2000).

### 3.1.6. Aspergerův syndrom

Aspergerův syndrom (AS) je porucha poprvé popsána roku 1940 Hansem Aspergerem. Jedná se o mírnější formu ASD, postižení jedinci jsou průměrně až nadprůměrně inteligentní a porucha by tedy neměla být diagnostikována u pacientů s IQ nižším než 70. Děti s AS se vyznačují těžkou poruchou sociální interakce a komunikace, mohou, ale nemusí mít opožděný vývoj řeči (narušení řeči by se však nemělo vyskytovat před třetím rokem života a ve věku pěti let již děti mluví plynule). Vykazují zúžené a stereotypní zájmy, narušeny jsou také motorické schopnosti a koordinace. Vyskytuje se rovněž suicidální jednání či atypické deprese (Hort et al., 2000).

### 3.1.7. Jiné pervazivní vývojové poruchy

Do této skupiny se řadí jedinci s autistickými rysy, kteří však, v závislosti na hodnotících kritériích, nespádají do žádného podtypu poruch autistického spektra (Muhle et al., 2004).

## 3.2. Příčiny a dědičnost ASD

ASD je multigenní onemocnění a současné odhady předpokládají zapojení okolo 1000 genů, z posledních studií vyplývá, že je geneticky podmíněno alespoň z poloviny. Za použití tradičních genetických přístupů bylo identifikováno více než 100 genů a více než 50 lokusů (příčemž některé z nich zahrnují tyto geny) bylo zapojeno v opakujících se chromozomálních abnormalitách nebo CNVs (De Rubeis et al., 2015). U všech chromozomů nalezneme oblast s kandidátními geny pro rozvoj ASD, nejčastěji zaznamenávané jsou však nálezy replikací na chromozomech 2q, 7q a 15q (Santangelo&Tsatsanis, 2012; Gümüslü et al., 2015). Mezi další, velmi významné, genetické přispěvatele patří také opakující se delece a duplikace chromozomální oblasti 16p11.2 které způsobují nejen ASD, ale i širokou škálu pediatrických diagnóz, včetně duševních vad, poruch koordinace a řeči (Duyzend et al., 2016).

Ke vzniku ASD mohou přispívat vzácné genetické odchylky v každém rozsahu, ať už se jedná o odchylky zděděné od rodičů, vzniklé *de novo*, recesivní, na X-vázané SNV či aneuploidie. *De novo* odchylky se vyskytují u potomků, přičemž ani jeden z rodičů je nenese nebo nepřenáší. Tyto mutace vznikají během meiotického dělení, na rozdíl od post-zygotických somatických mutací, jež vznikají během embryogeneze (De Rubeis et al., 2015;

Poultney et al., 2013). Velká většina studií rodin navíc naznačuje, že se ASD nesegreguje jako jednoduché mendelovské onemocnění, ale projevuje se jako systém shodný s komplexními znaky (Kolevzon et al., 2004).

Důkazy, že autismus má neoddiskutovatelně genetickou příčinu, se opírají především o výsledky výzkumů monozygotních (MZ) a dizygotních (DZ) dvojčat a rodin, kde se autismus vyskytuje u dvou až tří sourozenců. Při studiích zkoumajících široký autistický fenotyp, zahrnující sociální a komunikační poruchy, byla shoda u MZ dvojčat 92 %, u DZ dvojčat dosahovala přibližně 10 %. Získaná data z řady výzkumů prokázala fakt, že dědičnost hraje u výskytu autismu významnou roli (Thor, 2006; Muhle et al., 2004).

Negenetické příčiny poruch autistického spektra jsou, stejně jako příčiny genetické, stále nejednoznačné a neexistuje tedy samostatný biologický či klinický marker, svou roli hraje například i environmentální vliv. Stejně tak nebyla ve spojitosti s ASD identifikována žádná jednoznačná oblast mozku či patofyziologický mechanismus, které by toto onemocnění mohli způsobovat (Santangelo&Tsatsanis, 2012).

### **3.3. Diagnostika ASD**

V současné době neexistuje zkouška biologického charakteru prokazující autismus, screeninguse proto zaměřuje především na mapování a výzkum chování. V této problematice se tedy nejvíce cení klinická zkušenost, a to nejen u odborníků, ale také u pediatrů, psychologů, psychiatrů, učitelů či logopedů, kteří by měli symptomy rozpoznat a vyslovit podezření na toto onemocnění u daného pacienta (Thor, 2006). V posledním desetiletí stoupl zájem o ASD, vzhledem k rychle vzrůstajícímu počtu zaznamenaných případů autismu po celém světě, a tato zvyšující se prevalence vedla k zájmu výzkumníků o nalezení možných příčin. Tento trend však nemusí být způsoben skutečným nárůstem osob, vykazujících autistické chování, ale může být přičítán rozdílu či změnám ve vhodnosti kritérií a dostupnosti služeb, subjektivních úsudcích při diagnostických procesech a větší různorodosti diagnostických metod, diagnostika u velmi malých dětí, větší znalost parametrů a povědomí o ASD. Svou roli hraje také lepší proškolení klinických pracovníků a menší pravděpodobnost falešně pozitivních diagnóz (Muraru et al., 2016).

Nejčastěji se k diagnostice využívá 10. revize Mezinárodní statistické klasifikace nemocí (MKN-10) vydaná Světovou zdravotnickou organizací (WHO) (viz Tabulka 1).

**Tabulka 1:** Diagnostická kritéria pro ASD podle MKN-10 (upraveno podle <http://www.autismus.cz/>)

<b>1. Autismus se projevuje před třetím rokem věku dítěte</b>	
<b>2. Kvalitativní narušení sociální interakce</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nepřiměřené hodnocení společenských emočních situací</li> <li>- nedostačující odpověď na emoce jiných lidí</li> <li>- nedostatečné přizpůsobení sociálnímu kontextu</li> <li>- špatné používání sociálních signálů</li> <li>- chybí sociálně-emoční vzájemnost</li> <li>- slabá integrace sociálního, komunikačního a emočního chování</li> </ul>
<b>3. Kvalitativní narušení sociální interakce</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nedostatečné sociální užívání řeči bez ohledu na úroveň jazykových schopností</li> <li>- porucha imaginace a společenské napodobivé hry</li> <li>- nedostatečná synchronizace a reciprocita v konverzačním rozhovoru</li> <li>- snížená přizpůsobivost v jazykovém vyjadřování</li> <li>- relativní nedostatek tvořivosti a fantazie v myšlení</li> <li>- chybí emoční reakce na přátelské přiblížení jiných lidí (verbální i neverbální)</li> <li>- narušená kadence a důraz komunikace, které jsou odrazem modulace komunikace</li> <li>- nedostatečná gestikulace užívaná k zvýraznění komunikace</li> </ul>
<b>4. Omezené, opakující se stereotypní způsoby chování, zájmy a aktivity</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rigidita a rutinní chování v široké škále aspektů každodenního života (všední zvyky, hry)</li> <li>- specifická přichylnost k předmětům, které jsou pro daný věk netypické (jiné než např. plyšové hračky)</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lpění na rutině, vykonávání speciálních rituálů</li> <li>- stereotypní zájmy - např. data, jízdni řády</li> <li>- pohybové stereotypie</li> <li>- zájem o nefunkční prvky předmětů (například omak, vůně)</li> <li>- odpor ke změnám v běžném průběhu činností nebo v detailech osobního prostředí (například přesunutí dekorací nebo nábytku v rodinném domě)</li> </ul>
<b>Nespecifické rysy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- strach (fobie)</li> <li>- poruchy spánku a příjmu potravy</li> <li>- záchvaty vzteku a agrese (zvláště pokud je přítomna těžká mentální retardace)</li> <li>- většinou chybí spontaneita, iniciativa a tvořivost při organizování volného času</li> <li>- potíže s koncepčností při rozhodování v práci i přesto, že schopnostmi na samotné úkoly stačí</li> </ul>

Pro přesnější hodnocení autistických projevů existuje řada posuzovacích stupnic, v České republice je nyní nejčastěji využívána škála ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised) a CARS (Childhood Autism Rating Scale) (Thor, 2006; Pastierik., 2013).

### **3.3.1. ADI-R**

ADI-R je v současné době jednou z nejlépe ověřených diagnostických metod, která je založená na semistrukturovaném rozhovoru a jejíž spolehlivost je nejvyšší u dětí v předškolním věku. Výsledky rozhovoru jsou daným algoritmem převedeny na kritéria MNK-10 a rozděleny do tří diagnostických oblastí, jimiž jsou sociální interakce, komunikace (dále dělena na verbální a neverbální subdoménu) a repetitivní chování se stereotypními vzory. Nevýhodou je dlouhá doba administrace (přibližně 90 – 120 minut), která snižuje možnosti běžného využití v klinické praxi (Jones et al., 2015; Thor, 2006).

### 3.3.2. CARS

Jedná se o metodu hodnotící celkem 15 položek na stupnici od 1 do 7, které určují míru abnormalit zjištěnou pozorováním, informacemi získanými od rodičů a lékařskými záznamy. Výsledný počet bodů určuje orientačně stupeň závažnosti poruchy. Na rozdíl od ADI-R vyžaduje administrace pouze 30 – 60 minut, nevýhodou je však o mnoho nižší spolehlivost a slouží proto spíše ke screeningu ASD, než jako nástroj pro diagnózu (Mayes et al., 2014; Hrdlička et al., 2008).

### 3.3.3. Cytogenetické hodnocení ASD

Standartní analýzy karyotypu vykazují chromozomální přeskupení u 3 % – 6% jedinců postižených ASD, přičemž cytogenetické abnormality mohou vést k funkčním genetickým změnám několika způsoby. Jedná se například o změnu dávky genů v důsledku delecí a duplikací, narušení genů či jejich odloučení od genů regulačních způsobené zlomy a přeuspořádáním. Delece mohou také vést k odhalení bodových mutací v genech lokalizovaných na odpovídajících nedeletovaných homologních chromozomech (Vorstman et al., 2006). Mezi nejčastěji se vyskytující chromozomální abnormality patří delece a duplikace na dlouhých raménkách 15., 22., a 7. chromozomu, dále pak delece 22. chromozomu typické pro DiGeorgův (syndrom delece 22q11.2) a Phelan-McDermidův syndrom (syndrom delece 22q13.3) (Vorstman et al., 2006; De Rubeis et al., 2015). Časté jsou cytogenetické nálezy na chromozomu X vedoucí k syndromu fragilního X (syndrom Martinův-Bellové) (El-Baz et al., 2016).

### 3.3.4. Copy number variations (CNVs)

Další skupinu strukturních genomických odchylek, hrajících roli ve vzniku ASD, tvoří CNVs, jež definujeme jako submikroskopické odchylky s abnormálním počtem kopií DNA segmentů, delece a duplikace, o délce větší než 1000 párů bazí (De Rubeis et al., 2015; Eriksson et al., 2015). Tyto odchylky mohou být děděny od předchozí generace, ale mohou rovněž vznikat *de novo*. Mezi mechanismy, vedoucí ke vzniku CNVs, patří například nealelická homologní rekombinace, spojování nehomologních konců DNA vláken, zlomem vyvolaná replikace či tzv. breakage-fusion-bridge mechanismus (Prunier et al., 2017). CNVs byly identifikovány jako významný klíčový faktor náchylnosti k některým onemocněním, mají za následek mnoho neuropsychiatrických poruch. Vyskytují se rovněž v normální

populaci, kde hrají roli v lidské genetické diverzitě (Eriksson et al., 2015; Poultney et al., 2013).

Patogenní *de novo* CNVs jsou častěji identifikovány u probandů v rodinách s jedním postiženým členem než u rodin, kde je postižen více než jeden člen, což indikuje rozdílný mechanismus vzniku (Eriksson et al., 2015). Asociace, mezi CNVs a poruchami autistického spektra, byla několikrát prokázána a vysvětluje 5 – 10 % ASD případů. Mezi nejčastěji zaznamenávané pak patří především odchylky nacházející se na chromozomech v místech 1q21.1, 7q11.23, 15q11-q13, 16p11.2, 22q11.2 a 22q13, které jsou popsány v následujících kapitolách (AlAyadhi et al., 2016; Moreira et al., 2014; Gamsiz et al., 2015).

#### **3.3.4.1 1q21.1**

Delece a duplikace v této oblasti byly zaznamenány u 0,2 % pacientů s ID (intellectual disability), ASD a vrozenými abnormalitami. 1q21.2 je přibližně 1,35 Mb dlouhý lokus obsahující nejméně sedm rizikových genů (Mefford et al., 2009). Probandi s delecemi jsou charakterističtí mikrocefalií, hypotonií, vrozenými srdečními vadami, ADHD či kataraktem, narušeny jsou schopnosti komunikace a sociální interakce (Brunetti-Pierri et al., 2009). Pro reciproké duplikace je typický opožděný vývoj, autistické chování, přítomny mohou být také srdeční malformace. CNVs se zde vyznačují neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Rodiče či sourozenci probanda tedy mohou mít stejné CNV, ovšem bez projevení příznaků (Mefford et al., 2009).

#### **3.3.4.2 7q11.23**

Duplikace v oblasti 7q11.23 jsou signifikantně asociovány s autismem, s frekvencí výskytu 0,09 % u 3816 ASD probandů (Sanders et al., 2011). Tyto *de novo* duplikace v rozpětí 1,37 Mb zahrnují 22 genů a vykazují velmi heterogenní fenotypy. Mezi běžné rysy patří ASD, kognitivní deficity, velmi výrazné opoždění řeči, úzkost a hyperaktivita. Reciproká delece tohoto lokusu způsobuje Williams-Beurenův syndrom, jehož nositelé se vyznačují hypersociální osobností, jsou velmi přátelští a empatictí, charakteristické jsou také kognitivní porucha dysmorfie obličeje (Gamsiz et al., 2015).

#### **3.3.4.3 15q11 – q13**

15q11 – 13 duplikace představují jedny z nejčastějších nálezů u pacientů s autismem a nedávné studie ASD, v asociaci s intersticiální duplikací oblasti 15q11 – 13 zděděné od matky, vedou k předpokladu, že zvýšená exprese maternálně zděděných 15q11 – 13 genů

zvysuje riziko vzniku ASD (Veltman et al., 2005). Tento lokus obsahuje pět stále se opakujících BP (breakpoints), přičemž BP2-BP3 jsou spojovány zejména s autismem a Prader-Williho (PWS) a Angelman syndromem (Gamsiz et al., 2015). Přibližně 25 – 30 % pacientů s PWS vykazuje uniparentální disomii (UPD) pro maternální chromozom 15, u 60 – 70% se vyskytuje delece v oblasti 15q11 – 13 paternálního chromozomu. Fenotyp je heterogenní a může zahrnovat ASD, hypotonii, emoční labilitu, úzkost a hyperaktivitu. 2 – 7 % případů Angelmanova syndromu je způsobeno parentální UPD, 68 – 75 % pak vzniká v důsledku delece na 15. chromozomu v regionu 15q11 – 13 zděděného od matky. Pacienti se vyznačují opožděným vývojem, mentální retardací, částečnou nebo úplnou ztrátou řeči, běžné jsou motorické poruchy a záchvaty smíchu (Veltman et al., 2005).

Gen UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A) byl určen jako kandidátní gen pro rozvoj autismu, který je zodpovědný za tvorbu enzymu ubikvitin-protein ligázy, část ubikvitinačního degradačního systému. Mezi další rizikové geny patří MAGEL2, HERC2 a GABRB3 (Glessner et al., 2009; [www.gene.sfari.org](http://www.gene.sfari.org)).

#### **3.3.4.4 16p11.2**

Tento segment pokrývající 25 genů je spojován se vznikem neurovývojových poruch a podílí se na vzniku 1 % autistických případů, penetrace je i v tomto případě neúplná (Gamsiz et al., 2015). Delece a duplikace této oblasti významně přispívají nejen ke vzniku ASD, ale vedou také k poruchám koordinace a řeči, ID. Se schizofrenií jsou pak spojovány pouze duplikace (Duyzend et al., 2016; Hippolyte et al., 2016). Pozorovány jsou zde velmi kontrastní fenotypy; zatímco delece jsou asociovány s makrocefalií a zvýšeným BMI (body mass index)/obezitou, duplikace se naopak projevují mikrocefalií a sníženým BMI. MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3) je gen ležící v této oblasti, jenž hraje rozhodující roli v kortikogenezi regulováním buněčného cyklu v proliferujících neurálních progenitorech a je geneticky spojován s ASD a RASopatiemi. Pacienti s deficitem genu BCKDK (branched chain ketoacid dehydrogenase kinase), který je zde lokalizován, vykazují abnormální neurobehaviorální fenotypy, včetně autismu, bez přítomnosti epilepsie či ID (Gamsiz et al., 2015; Oyarzabal et al., 2016; Pucilowska et al., 2015). Dalším genem, zodpovědným za vznik neurovývojových poruch, je KCTD13 (potassium channel tetramerization domain containing 13), jehož zvýšená exprese má za následek mikrocefálii (Golzio et al., 2012).

### 3.3.4.5 22q11.2

Lokus 22q11 je jedním z nejsilnějších CNV nálezů v neurovývojové genetice. I v této oblasti se CNVs vyznačují nekompletní penetrancí a jsou asociovány s širokým spektrem fenotypů, včetně autismu. Syndrom delece 22q11 (22q11DS), také známý jako DiGeorgův syndrom, reprezentuje jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů pro neuropsychiatrické poruchy. Při rozsáhlé studii jedinců s 22q11DS byla prevalence ASD 26,5 %, s vrcholem v adolescentním věku. Mezi významné geny, nejčastěji spojované s ASD, řadíme PRODH a LZTR1 (Gamsiz et al., 2015).

### 3.3.4.6 22q13

Syndrom způsobený delecí 22q13, rovněž známý jako Phelan-McDermidův syndrom, je charakteristický celkovým opožděným vývojem, absencí nebo silným opožděním řeči, neonatální hypotonií a dysmorfickými rysy (Gamsiz et al., 2015). Jedním z nejvýznamnějších rizikových genů pro vznik ASD ležící v této oblasti je SHANK3.

SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) je gen pokrývající přibližně 58 Kb genomické sekvence a obsahující 24 exonů, z nichž 7 může být alternativně stříženo (Durand et al., 2007). SHANK3 patří do rodiny SHANK proteinů, které byly nejprve identifikovány u krys a později u člověka (Boeckers et al., 1999; Bonaglia et al., 2001). Protein kódovaný tímto genem nalezneme v mnoha tělních tkáních, nejhojněji se vyskytuje v mozku. Je zapojen do formování a zrání dendritických trnů, hraje roli ve funkci synapsí a podílí se tak na mezibuněčné komunikaci. Většina mutací nalezena u pacientů s ASD narušila funkci proteinu kódovaného tímto genem nebo vedla k jeho abnormálně zkrácené verzi. Vzniklo tedy podezření, že narušení v komunikaci nervových buněk přispívá k rozvoji autismu (Durand et al., 2007). Haploinsuficience tohoto genu představuje jednu z nejvíce frekventovaných jedno-genových mutací v poruchách autistického spektra (Yi et al., 2016). Vzhledem k jeho formující se roli v neuropsychiatrických poruchách a překrývajících se fenotypech autismu a syndromu delece 22q13.3, byl dále analyzován u pacientů s ASD (Sykes et al., 2009).

### 3.3.4.7 Další vybrané geny opakovaně identifikované u pacientů s ASD

Gen TSC2 je lokalizován v oblasti 16p13.3, jehož produkty fungují jako nádorové supresory a jsou schopny stimulovat specifické GTPasy, přičemž mutace TSC2 jsou příčinou přibližně 50 % případů tuberózní sklerózy (TSC). Přestože 40 – 50% jedinců s TSC splňuje kritéria pro poruchy autistického spektra, není prozatím objasněn žádný sdílený genetický

mechanismus mezi s TSC-asociovaným a idiopatickým ASD (van Bakel et al., 1997; Bahl et al., 2013).

Contactin Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2) je gen z rodiny NEUREXIN, který zprostředkovává buněčnou adhezi. Jeho cytogenetická lokace je 7q35-q36 a bývá spojován s několika onemocněními. Kromě poruch autistického spektra způsobují jeho abnormality také epilepsii či Pitt-Hopkinsův syndrom (Gdalyahu et al., 2014; OMIM 604569).

Další kandidátní gen, s názvem Contactin 4 (CNTN4), se nachází v regionu 3p26.3 – 3p26.2. Tento gen kóduje protein zapojený do buněčné adheze, který může mít esenciální roli ve formaci axonových spojů ve vyvíjejícím se nervovém systému. Narušení toho genu bylo odhaleno jako příčina syndromu delecce 3p a náchylnosti k poruchám autistického spektra (Hui et al., 2012).

Gen Neurexin-1 (NRXN1), s lokací 2p16.3, kóduje protein neurexin. Tento protein funguje jako receptor nervového systému obratlovců a presynaptická molekula, sloužící k buněčné adhezi (Liu et al., 2012). Mutace genu NRXN1 byly opakovaně nalezeny u pacientů s ASD a schizofrenií a jejich signifikantní asociace byly potvrzena mnoha studiemi (Pak et al., 2015).

Významným genem spojovaným s autismem je také gen FMR1 (fragile X mental retardation 1), který je lokalizován na pozici Xq27.3. FMR1, kódovaný tímto genem, je mRNA a ribozomální vazebný protein, který inhibuje expresi několika klíčových proteinů a cytokinů účinkujících při zánětlivých procesech a váže se na některé proteiny zapojené do reparace DNA při buněčném stresu a obraně. Mutace tohoto genu vedou k syndromu fragilního X, což je nejčastější dědičná porucha intelektu a rovněž nejčastější jednogenumutace asociována s autismem (Naviaux et al., 2015; Tassone et al., 2012).

### **3.4. Terapeutické možnosti léčby ASD**

Z farmakologického hlediska je potřeba zdůraznit, že neexistuje žádná účinná léčba, která by odstranila hlavní příznaky ASD. Bylo však ověřeno, že velmi brzký a intenzivní behaviorální zásah může redukovat jádrové příznaky a zlepšit výsledky vývoje. Farmakologickým zásahem je možno zlepšit související potíže ve formě epilepsie, spánkových poruch, hyperaktivity, či agrese, což celkově vede ke zlepšení kvality života. Vzhledem ke komplikovanosti metodologické situace je obtížné ověřit účinnost jednotlivých

terapií, nejlepší výsledky přináší strukturované vzdělávací programy, kombinace různých behaviorálních technik a využívání vizualizovaných informací. Důležitá je kvalitní spolupráce s rodinou, pedagogická a terapeutická empatie (Thor, 2006; Bodur et al., 2015).

## 4. Vyšetřovací metody používané u pacientů s ASD

### 4.1. Karyotypizace

Karyotypizace je proces hodnocení chromozomů, za účelem identifikace chybějícího, přebývajícího či abnormálního chromozomu (Klose, 2016). Tato metoda je dnes běžně využívána pro diagnostiku vrozených vad, genetických poruch či rakoviny, výhodou je především její jednoduchost a nízké finanční náklady.

Preparáty pro karyotypizaci jsou připravovány z mitotických buněk, pozastavených v metafázi či prometáfazi buněčného cyklu, kdy chromozomy zaujímají nejkondenzovanější konformaci. Jako zdroj buněk bývá využívána především periferní krev a buňky bukálního stěru, pro prenatální diagnostiku pak plodová voda či choriové klky. Před samotným karyotypováním je důležité buňky kultivovat, délka kultivace závisí na typu používaných buněk. Po dostatečné multiplikaci je přidán kolchicin, který rozvolňuje mitotická vřeténka a buňky se tedy dále nedělí. V dalším kroku jsou buňky ošetřeny hypotonickým roztokem a chemickými fixativy na podložní sklo. Pro zviditelnění struktury chromozomů jsou nejčastěji využívány metody proužkování (banding). Dnes je většina karyotypů barvena Giemsovým barvivem (G – banding), které poskytuje vyšší rozlišení jednotlivých pruhů a dovoluje vyhodnocení prostřednictvím světelného mikroskopu (O'Connor, 2008).

### 4.2. FISH

S ohledem na úplnost textu této kapitoly je třeba zmínit i testovací metodu fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Jde o metodu molekulární cytogenetiky, jež v roce 1986 vyvinuli Pinkel a kolegové (Pinkel et al., 1986). Tato technika je založena na denuraci vyšetřované DNA a následné hybridizaci sond, které jsou fluorescenčně značené přímo nebo přes vazbu značených protilátek, což umožňuje výsledný signál amplifikovat. Vizualizace a vyhodnocení poté probíhá pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pro aplikaci FISH metody je nutno použít buňky nacházející se v metafázi buněčného dělení, v případě použití lokus-specifických nebo centromerických sond je pak možno aplikovat i na jádra nacházející se v interfázi (Pinkel et al., 1986; Pradhan, 2015).

Fluorescenčně značené sondy poskytují slabé pozadí a vysoké rozlišení, přičemž rozlišujeme tři typy sond, volené v závislosti na typu vyšetření. Lokus-specifické sondy jsou



používány k určení pozice konkrétního genu na chromozomu a počtu kopií v rámci určitého genomu. Centromerické sondy slouží k označení chromozomů v oblastech centromer a stanovení jejich počtu. Celochromozomové sondy jsou pak tvořeny souborem menších sond, jež se váží k odlišným sekvencím podél celé délky chromozomu a jsou tak schopny odhalit chromozomové přestavby (Pradhan, 2015).

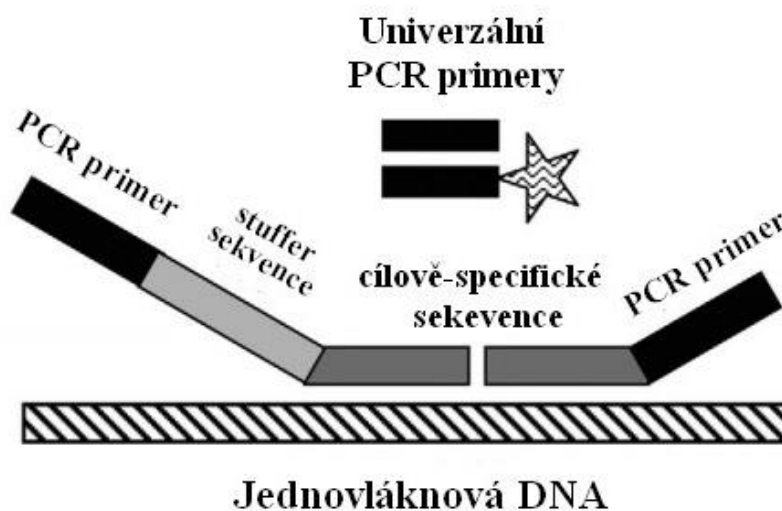
Tato metoda slouží k určování počtu chromozomů, vizualizuje různá přeskupení, jako je translokace či inverze, umožňuje studovat organizaci a strukturu genomu v buňce. FISH je využívána v oblasti prenatalní a postnatalní diagnostiky, uplatňuje se rovněž při diagnostice odlišných forem rakovin (Pradhan, 2015).

### **4.3. MLPA**

Metoda FISH může také sloužit jako komplementární metoda k metodě multiplex ligation-dependent probe amplification, která je, na rozdíl od FISH, založená na PCR. Schouten a jeho kolegové tuto metodu poprvé publikovali v roce 2002. Jedná se o metodu pro relativní kvantifikaci až 40 různých probových DNA sekvencí v jediné reakci (multiplexová PCR), jež vyžaduje pouze 50 ng lidské DNA. Jednou z výhod, které MLPA poskytuje, je široké spektrum využití. Je schopna cíleně detekovat delece a duplikace exonů v lidských BRCA, MSH2 a MLH1 genech, trisomie charakteristické např. pro Downův syndrom nebo chromozomální aberace v buněčných a nádorových liniích (Schouten et al., 2002).

Metoda je založena na použití sond, jež v průběhu reakce hybridizují ke vzorku DNA a následně se amplifikují, a to za použití pouze jednoho páru PCR primerů (Homig-Holzel & Savola, 2012). Každá sonda je složena ze dvou syntetických oligonukleotidových částí, krátké a dlouhé. Kratší oligonukleotidy každé sondy obsahují na svém 3' konci cílově-specifickou sekvenci o délce 21 až 30 nukleotidů (nt) a univerzální 19 nt dlouhou sekvenci, identickou se značeným PCR primerem, na 5' konci. Cílově-specifická sekvence, o délce 25 až 43 nt, se nachází na 5' fosforylovaném konci a je odvozena od M13 fága. 3' konec pak obsahuje univerzální 36 nt dlouhou sekvenci komplementární k neznačenému PCR primeru a na rozdíl od krátké části sondy obsahuje také tzv. stuffer sekvenci ležící mezi právě popsány mi sekvencemi na 3' a 5' konci. Každá sonda dává vznik amplifikovanému produktu o jedinečné délce mezi 130 a 480 páry bází (bp), což umožňuje následnou separaci kapilární elektroforézou (Schouten et al., 2002).

Celou reakci můžeme rozdělit do pěti kroků a to denaturaci, hybridizaci, ligaci, PCR amplifikaci a separaci kapilární elektroforézou. V prvním kroku dochází vlivem teploty k denaturaci dvouvláknové DNA za vzniku DNA jednovláknové. Na takto připravenou DNA poté hybridizují přidané sondy a dochází k jejich spojení pomocí enzymu Ligáza-65. Aby mohl být signál sond detekován, je potřebný prostor k průběhu ligační reakce. Enzym ligáza-65, který je v metodě MLPA využíván, je v oblasti cílově-specifické sekvence krátké části sondy velmi senzitivní a reaguje tak na změny již v jednom nukleotidu. Nedojde tedy k ligaci ani následné amplifikaci sond a signál není zachycen (Homig-Holzel & Savola, 2012). Následuje PCR reakce, která slouží k amplifikaci sond (signálu) a posledním krokem je pak separace a vyhodnocení.



**Obrázek 2:** Znárodnění sondy využívané metodou MLPA (upraveno podle Jeuken et al., 2006)

#### 4.4. Čipová komparativní genomová hybridizace (aCGH)

Čipová komparativní genomová hybridizace je metoda sloužící k analýze CNVs v rámci vyšetřované DNA (Gümüslü et al., 2015). Jedná se o zdokonalení metody CGH, kterou Pinkel a Solinas-Toldo vyvinuli v roce 1997. Tato technika odstraňuje nutnost využití metafázních chromozomů, což bylo limitací CGH metody, a nahrazuje je fragmenty klonované DNA různých genů. Tyto jsou tištěny na povrch skla (každý fragment zaujímá přesně určené místo), kde k nim referenční a zkoumaná DNA hybridizují. Takto připravená speciální skla nazýváme microarray neboli čipy (Pinkel et al., 1997; Solinas-Toldo et al.,

1997; Jarošová et al., 2006). Kromě skla bývají na výrobu čipů využívány také nylonové membrány či plastické materiály představující tzv. makročipy. Velikost sond je velmi rozličná, čítající od malých sond o délce okolo 25 – 85 bp po genomické klony, jako jsou umělé bakteriální chromozomy s velikostí 80 000 – 200 000 bp. Nanášení sond na povrch čipu lze provádět několika způsoby, a to buď mechanickým spotováním již presyntetizovaných sond (cDNA klony či jejich PCR produkty) či chemicky připravených oligonukleotidů, nebo syntéza sondy ve formě oligonukleotidů *in situ* na povrch mikročipu (tento postup je využíván např. firmou Affymetrix, jejíž platformy řadíme v současné době k nejpoužívanějším) (Merkerová et al., 2006).

Bez ohledu na typ sondy, základní metodika je pro všechny analýzy konzistentní. Vyšetřovaná a referenční DNA jsou značeny rozdílnými barvami, používána jsou obvykle fluorescenční barviva zelená (Cy3) a červená (Cy5). Obě DNA jsou následně smíchány, denaturovány, přidány jsou rovněž denaturované sondy a po aplikaci na podložní sklíčko dochází k hybridizaci. K zachycení a kvantifikaci relativní fluorescenční intenzity značených DNA sond, které hybridizovaly ke svým cílům, jsou poté využívány digitální snímací systémy. Poměr fluorescenčního signálu testované a referenční DNA poskytují informace o relativním počtu kopií sekvencí v testované DNA v porovnání s normálním genomem (zdravá kontrola) (Theisen, 2008).

K výhodám aCGH patří především možnost analýzy s využitím pouze malého množství DNA, schopnost porovnat rozdílné genomy a detekce velmi malých DNA změn (rozlišovací schopnost metody je 75 – 130 kb (Gümüslü et al., 2015, Jarošová et al., 2006). Array-CGH nabízejí vysoký diagnostický přínos, v rozmezí 14 – 20 %, pro jedince s nevysvětlenými poruchami intelektu, ASD či vícenásobnými vrozenými vadami, v jejichž diagnostice jsou v současnosti rutinně používány. Metoda se osvědčila jako rychlá, specifická a velmi citlivá (Cappuccio et al., 2016; Oostlander et al., 2004).

## 4.5. SNP array

Metoda SNP čipů byla vyvinuta v roce 1998 za účelem genotypování (Wang et al., 1998). Od toho okamžiku byla značně vylepšena, je hojně využívána k detekci CNVs v lidském genomu, umožňuje rovněž určit ztrátu heterozygoty jednotlivých nukleotidů a stala se tak jedním z nejvýkonnějších nástrojů genomické analýzy (Raghavan et al., 2005; Mao et al., 2007; AlAyadhi et al., 2016).

Komerční probe-based SNP array platformy jsou v dnešní době schopny provést genotypizaci okolo jednoho milionu SNPs v rámci jedné analýzy, a to s 99% přesností, umožňují analyzovat odchylky v intenzitě signálu a změny v alelickém složení současně. Jedny z nejpoužívanějších platforem v současné době vyrábí firmy Affymetrix a Illumina (La Framboise, 2009; Mao et al., 2007). Mezi hlavní výhody SNP array technologie patří poskytnutí signálu pro specifický počet SNP markerů za relativně nízkou cenu a spotřeba pouze malého množství DNA, což umožňuje využití v případě limitovaného množství vzorku nebo nedostupnost metafázních chromozomů. Na rozdíl od aCGH metody je rovněž schopna detekovat uniparentální disomii (Nicolazzi et al., 2016; Wang et al., 2016; Raghavan et al., 2005).

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Biologický materiál a jeho zpracování

V praktické části této práce bylo analyzováno 12 vzorků DNA, která byla získána odběrem periferní krve pacientů s ASD. Odběr tohoto materiálu byl proveden na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc (ÚLG FNOL). Zde byl rozdělen na dvě části. Jedna část byla určena ke kultivaci a následnému karyotypování a druhá část byla určena k izolaci DNA vysolovací metodou. Vzhledem k tomu, že věk žádného z pacientů nepřesáhl 18 let, byl informovaný souhlas o využití biologického materiálu pro účely výzkumu podepsán zákonnými zástupci.

### 5.2. Chemikálie a roztoky

- Deionizovaný Hi-Di formami (Applied Biosystems)
- PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- Deionizovaná H<sub>2</sub>O (Lékárna FN Olomouc)
- Sterilní TE pufr (10 mM TRIS-HCl + 0,1 mM EDTA; pH 8,2) (Lékárna FN Olomouc)
- Značený velikostní standard 500 LIZ<sup>®</sup> (Applied Biosystems)
- POP-7 separační gel (Applied Biosystems)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P015 MECP2 (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P036 Subtelomeres Mix 1 (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P070 Subtelomeres Mix 2B (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P106 MRX (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P245 Microdeletion Syndromes-1 (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P297 Microdeletion Syndromes-2 (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P343 Autism-1 (MRC Holland)
- SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> reagent kit (MRC-Holland)
- 96% a 70% etanol (Lékárna FN Olomouc)
- LB pufr (připraveno na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc)
- SDS pufr (připraveno na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc)
- Proteináza K (připraveno na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc)

**Tabulka 2:** Chemické složení SALSA® MLPA® reagent kitu (upraveno podle MRC Holland MLPA)

Složka kitu	Složení
<b>SALSA MLPA pufr</b>	KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000; pH 8.5
<b>SALSA MLPA probemix</b>	Syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy bakteriálního původu, Tris-HCl, EDTA; pH 8.0
<b>SALSA ligáza-65</b>	Glycerol, BRIJ (0,05%), EDTA, beta-merkptoethanol (0,1%), KCl, Tris-HCl; pH 7,5, ligaza-65 bakteriálního původu
<b>Ligační pufr A</b>	NAD bakteriálního původu; pH 3,5
<b>Ligační pufr B</b>	Tris-HCl, neionogenní detergenty, MgCl <sub>2</sub> ; pH 8.5
<b>SALSA mix PCR primerů</b>	Syntetické oligonukleotidy značené fluorescenční značkou FAM, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ; pH 8
<b>SALSA polymeráza</b>	Glycerol, neionogenní detergenty, EDTA, DTT (0,1 %), KCl, Tris-HCl, polymeráza bakteriálního původu; pH 7.5

### 5.3. Laboratorní vybavení

Automatické pipety LabMate (HTL)

Automatické pipety (Eppendorf)

Jednorázové sterilní špičky (FL medical, Kartell Spa, Tref Labs)

Zkumavky typu Eppendorf (1,7ml) (Golden Gate Bioscience)

Zkumavky typu PCR (0,2ml) (Thermo Scientific)

Chladnička, mrazák (Electrolux)

96-jamková destička na kapilární elektroforézu (VWR International)

Minicentrifuga Combi-Spin, FVL-2400N (Biosan)

Centrifuga Mikro 200 (Hettich)

PCR termocykler C1000 Touch™ (BioRad)

Automatický genetický analyzátor ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems)

Laminární box Mini-V/PCR (TELSTAR)

Nitrilové bezprašné rukavice SempercareR nitrile skin2 (Semperit Investments)

Alobal, popisovač, kontejnery na infekční odpad, nádoba na led, stojan na zkumavky

Software – GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems)

Coffalyser.Net (MRC-Holland)

## **5.4. Pracovní postup**

### **5.4.1. Izolace DNA vysolovací metodou**

#### **1. den**

1. Krev přelit do označené kónické zkumavky (Falkonka, 50 ml).
2. Dolít do 50 ml chlazeným LB pufrem a promíchat.
3. Inkubovat při pokojové teplotě 15 min a poté centrifugovat 30 min/1 000 g.
4. Slít supernatant tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek.
5. Přidat 5 ml chlazeného LB pufru, promíchat a centrifugovat 10 min/1 000 g.
6. Supernatant slít, lehce opláchnout pelet chlazeným LB pufrem.
7. Zkumavky nechat okapat na ubrousku dnem vzhůru.
8. Přidat 3 ml NBL pufru, 50 $\mu$ l proteinasy K, 150 $\mu$ l 20% SDS a důkladně protřepat.
9. Inkubovat v termostatu při 37°C přes noc.

#### **2. den**

1. K inkubované směsi z předchozího dne přidat 1 ml NaCl o koncentraci 6 mol/l a důkladně protřepat.
2. Centrifugovat 15 min/5 000 g.
3. Supernatant přelit do čisté označené 10 ml zkumavky a centrifugovat 10 min/5 000 g.
4. Supernatant slít do čisté označené 15 ml zkumavky a doplnit 96% vychlazeným ethanolem.
5. Obsah promíchat pomalým převrácením zkumavky až do vysrážení DNA.
6. Do označené zkumavky typu Eppendorf nalít cca 1 ml 70% ethanolu a přenést DNA pomocí sterilního háčku.

7. Centrifugovat 5 min/14 000 g a poté opatrně slít 70% ethanol na ubrousek.
8. DNA nechat vyschnout přibližně 1 hod při pokojové teplotě.
9. DNA rozpustit v TE pufru (50 $\mu$ l TE pufru na 1 ml krve) a označit štítkem s potřebnými údaji.
10. DNA rozpustit při pokojové teplotě přes noc nebo 1 hod při 65 °C za současného promíchávání na míchačce.
11. DNA uschovat v lednici nebo při -25°C v případě delšího skladování.

## **5.4.2. MLPA**

### **DNA denaturace (1. den)**

1. Označit 0,2 ml zkumavky.
2. Napipetovat 5  $\mu$ l naředěného vzorku DNA (10-50 ng/ $\mu$ l) do každé zkumavky, jako kontrolu použít TE pufr (blank).
3. Zkumavky umístit do termocykléru a spustit program dle Tabulky 5. Vzorek denaturovat 5 minut při 98 °C, po ochlazení na 25 °C zkumavky vyjmout.

### **Hybridizační reakce (1. den)**

1. Před použitím vortexovat MLPA pufr a MLPA sondy.
2. Připravit hybridizační master mix (1,5 $\mu$ l MLPA sondy a 1,5 $\mu$ l MLPA pufru na jednu reakci) a opatrně promíchat pipetováním.
3. Do každé zkumavky přidat 3  $\mu$ l hybridizačního master mixu a promíchat pipetováním.
4. Zkumavky umístit zpět do termocykléru, inkubovat 1 minutu při 95 °C a poté 16 – 20 hodin při teplotě 60 °C (viz Tabulka 5).

### **Ligační reakce (2. den)**

1. Oba ligační pufrы před použitím vortexovat.
2. Připravit si Ligase-65 master mix (viz Tabulka 3) a opatrně promíchat pipetováním.
3. Při teplotě 54 °C pozastavit program a přidat 32  $\mu$ l master mixu do každé zkumavky. Promíchat jemně pipetováním nahoru a dolů.
4. Pokračovat v programu termocykléru (viz Tabulka 5) a při teplotě 20 °C zastavit program a vyjmout zkumavky z termocykléru.



## PCR reakce (2. den)

1. SALSA PCR primery vortexovat, polymerázu ohřát po dobu 10 sekund v ruce z důvodu snížení viskozity.
2. Připravit polymerázový master mix (viz Tabulka 4) a opatrně promíchat pipetováním. Zkumavky zabalit do alobalu a až do použití skladovat na ledě.
3. Při pokojové teplotě přidat 10  $\mu\text{l}$  polymerázového master mixu do každé zkumavky a pipetováním opatrně promíchat.
4. Pokračovat v programu (viz Tabulka 5).
5. PCR produkty uchovávat při teplotě 4 °C po dobu 1 týdne nebo při -15 °C až -25 °C v případě delšího skladování. Z důvodu citlivosti fluorescenčních barev na světlo produkty skladovat ve tmě.

**Tabulka 3:** Složení mixu pro ligační reakci

	<b>1 reakce</b>
<b>Deionizovaná H<sub>2</sub>O</b>	25 $\mu\text{l}$
<b>Ligase pufr A</b>	3 $\mu\text{l}$
<b>Ligase pufr B</b>	3 $\mu\text{l}$
<b>Ligase-65 enzym</b>	1 $\mu\text{l}$

**Tabulka 4:** Složení mixu pro PCR reakci

	<b>1 reakce</b>
<b>Deionizovaná H<sub>2</sub>O</b>	7,5 $\mu\text{l}$
<b>SALSA PCR směs primerů</b>	2 $\mu\text{l}$
<b>SALSA polymeráza</b>	0,5 $\mu\text{l}$

**Tabulka 5:** Teplotní profil pro MLPA reakci

<b>1. DNA denaturace</b>	<b>98 °C</b>	<b>5 minut</b>
	<b>25 °C</b>	<b>pauza</b>
<b>2. Hybridizace</b>	95 °C	1 minuta
	60 °C	pauza
<b>3. Ligace</b>	54 °C	pauza
	54 °C	15 minut
	98 °C	5 minut
	20 °C	pauza
<b>4. PCR reakce</b>	35 cyklů	
	95 °C	30 sekund
	60 °C	30 sekund
	72 °C	60 sekund
	72 °C	20 minut
	15 °C	pauza

### 5.4.3. Kapilární elektroforéza

Pro fragmentační analýzu vzorků byl použit automatický genetický analyzátor ABI-PRISM 3130 Genetic Analyzer pracující na principu kapilární elektroforézy. Fluorescenčně značené fragmenty DNA jsou detekovány laserem. Podmínky elektroforézy jsou zaznamenány v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Podmínky kapilární elektroforézy

<b>Počáteční napětí vstřikování</b>	1,6 kV
<b>Doba vstřikování vzorku</b>	15 sekund
<b>Doba analýzy</b>	26 minut
<b>Průměrné napětí</b>	15 kV
<b>Teplota</b>	60 °C

## **Příprava vzorků do genetického analyzátoru**

1. Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky (předem vysvícené UV světlem) napipetovat po 14  $\mu$ l připraveného mixu formamidu a značeného velikostního standardu 500 LIZ<sup>®</sup> (1 ml formamidu + 22,2  $\mu$ l LIZ<sup>®</sup> standardu).
2. Napipetovat po 1  $\mu$ l amplifikovaných produktů do každé jamky (vyhnout se přítomnosti bublin).
3. Destičku centrifugovat a následně umístit do termocykleru pro denaturaci při 95 °C po dobu 2 minut. Destičku ochladit v ledové lázni a osušit.
4. Umístit destičku do genetického analyzátoru a spustit fragmentační analýzu vzorků.

### **5.4.4. Vyhodnocení**

#### **Získání dat z metody MLPA**

Výstupní data byla digitalizována prostřednictvím Foundation Data Collection softwaru 3.1.1. a analyzována programem GeneMapper 4.1. Vyhodnocení poté proběhlo pomocí programu Coffalyser.net, vyvinutým firmou MRC Holland, který je volně stažitelný ze stránek [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com).

#### **Získání dat z metody SNP array**

Vybrané vzorky DNA byly odeslány k vyšetření pomocí metody SNP array. Vzorky byly zpracovávány v Laboratoři experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (MUDr. Josef Srovnal, PhD). Využita byla chipová technologie Affymetrix GeneChip a digitalizace výsledků byla provedena Chromosome Analysis Suite (ChAS) Softwarem.

#### **Vyhodnocení nalezených CNVs**

Nalezené CNVs byly hodnoceny na základě databází DGV (Database of Genomic Variants), DECIPHER, CliVar a celosvětové literatury. Dále byly nalezená CNVs hodnoceny z hlediska genů, které obsahovaly, a jejich vztahu k ASD, za použití databází SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative), OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) databází a celosvětové literatury.

## 6. Výsledky

V rámci praktické části této práce bylo testováno 12 vzorků DNA pacientů Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc (ÚLG FNOL) s projevy ASD, z toho byly 3 dívky a 9 chlapců, jejichž poslední genetické vyšetření proběhlo mezi lety 2012-2017. Věk těchto pacientů se v době genetického vyšetření pohyboval od 18 měsíců do 10 let věku.

Krev byla z jedné části použita ke karyotypování pomocí barvení giemsou, popř. pro testování metodou FISH (ÚLG FNOL), a druhá část byla použita k izolaci DNA vysolovací metodou na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky DNA byly dále testovány metodou cílené detekce CNVs za použití komerčních SALSA MLPA kitů P015, P036, P070, P106, P245, P297 a P343 (MRC-Holland). Ve vybraných případech byla DNA pacientů dovyšetřena na přítomnost CNVs, které nebyly zachyceny metodou MLPA, v Laboratoři experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (MUDr. Josef Srovnal, PhD) pomocí metody SNP array (Affymetrix GeneChip).

### Pacient 34812

Pacientka 34812 je dívka s mikrocefalií, gotickým patrem a hypotonií trupu. Trpí lehkou psychomotorickou retardací, opožděním řeči a afektivními záchvaty vzteku. Celkově je pacientka negativistická.

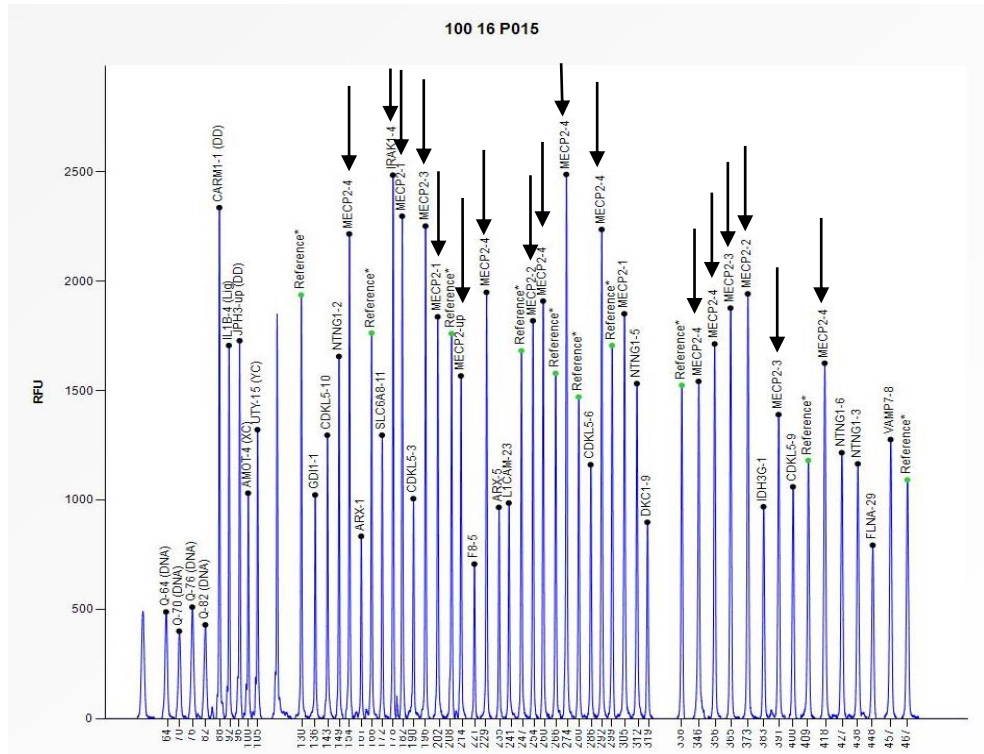
Tato pacientka měla fyziologický karyotyp 46, XX. Na základě podezření na Prader-Williho/Angelmanův syndrom byla provedena další vyšetření, která tyto syndromy vyloučila (ÚLG FNOL, MS-PCR). Metoda MLPA odhalila cca 1,6Mb velkou deleci v pozici 20q13.33 a duplikaci v oblasti 22q13.3. Tento vzorek byl odeslán k vyšetření metodou SNP array, která odhalila deleci 20q13.33 zasahující 36 protein kódujících OMIM genů, z nichž nejvýznamější pro klinický obraz pacientky jsou CHRNA4, COL9A3, EEF1A2, KCNQ2, RTEL1. Dle databáze ClinVar se jedná o patologickou variantu spojovanou s mentální retardací a poruchou chůze a řeči. Dále byly nalezeny CNVs ve smyslu zisku v oblastech 1q25.2 a 15q11.2, které byly hodnoceny s ohledem na klinický obraz pacientky, jako nevýznamné. Avšak duplikace 22q13.3, odhalená metodou MLPA, nebyla pozorována při vyšetřování pomocí metody SNP array. Proto byly tyto oblasti dovyšetřeny pomocí FISH metody, která prokázala, že do deletované oblasti 20q13.33 byla translokována zdvojená část dlouhého raménka 22. chromozomu. Obě také vznikly *de novo* (nebyly pozorovány u rodičů).

Mikroduplikace oblasti 22q13.3 je významná zejména proto, že zasáhla geny RABL2B, SHANK3, ARSA a CHKB. Geny SHANK3 a ARSA jsou dle databází OMIM a SFARI zapojeny v celé řadě neurodegenerativních onemocnění, onemocnění způsobující změnu chování, mentální retardaci a také ASD. Vzhledem ke klinickému obrazu pacientky se jeví delece oblasti 22q13.3 jako kauzální. I přesto je však duplikace 20q13.3 neméně důležitá a může se projevit v pozdějším věku pacientky.

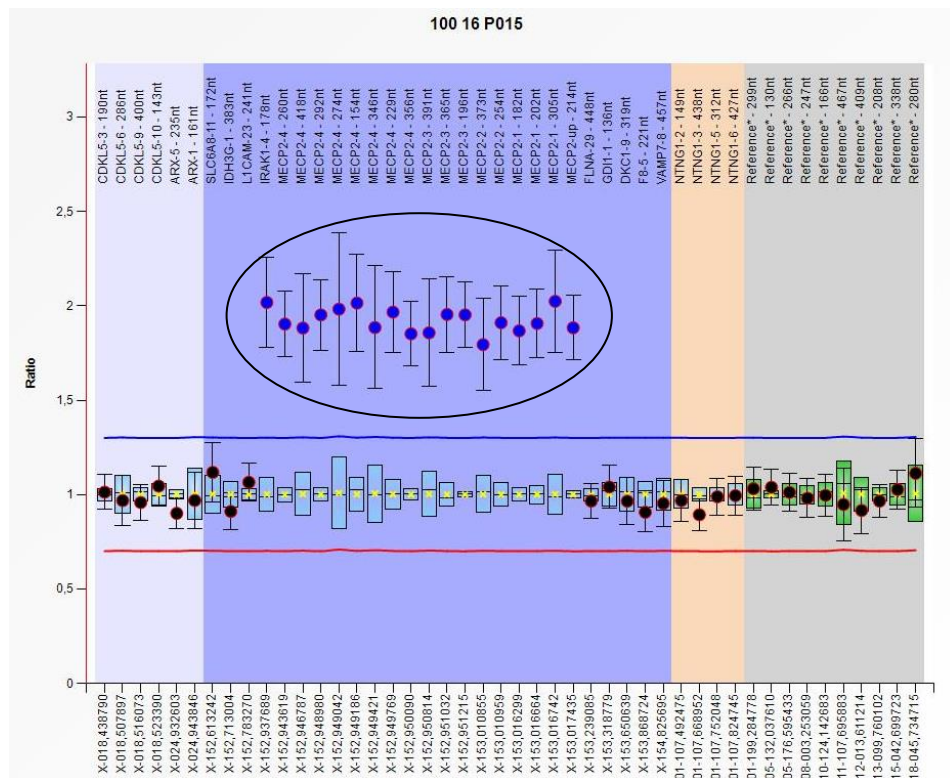
### **Pacient 10016**

Tento pacient byl geneticky testován ve věku 18-ti měsíců. Trpí hypertrofií, hypotonií a opožděným psychomotorickým vývojem, stojí výjimečně, nechodí. Nukleární magnetická rezonance odhalila ložiskové změny v bílé hmotě mozku s nejasnou etiologií.

Tomuto pacientovi nebyl stanoven karyotyp. On i jeho matka byli odesláni pouze k cílenému vyšetřování metodou MLPA, která odhalila duplikaci v oblasti Xq28. Nejvýznamější geny v této oblasti jsou MECP2 a přilehlý IRAK1 (viz Obrázky 3 a 4). Tuto CNV chlapec zdědil od matky. Dle Ramocki a spol z roku 2010 se tato CNV projevuje výrazněji u mužů než u žen. Tyto projevy nebyly u matky chlapce pozorovány. Fenotypový projev této CNV je tedy variabilní (ASD, mentální retardace, tělesná asymetrie a další). Vzhledem k literárním zdrojům je duplikace Xq28 považována za příčinu obtíží pacienta (Ramocki et al 2010). Tento pacient ani jeho matka nebyli odesláni k dalšímu genetickému vyšetření metodou SNP array.



Obrázek 3: Elektrofotogram duplikace Xq28 u pacienta 10016



Obrázek 4: Box diagram duplikace Xq28 u pacienta 10016

### **Pacient 164714**

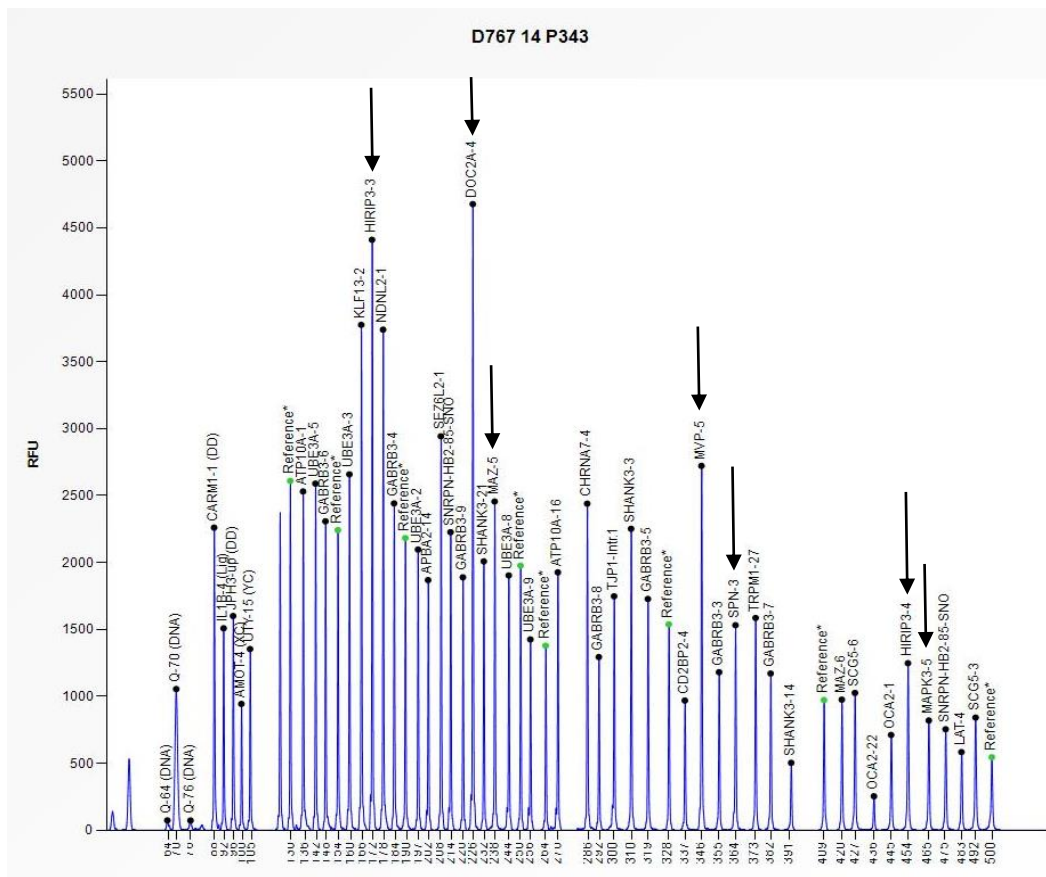
Tento proband, vyšetřovaný ve 3 letech, trpí lehkou psychomotorickou retardací a hyperaktivitou, patrné jsou u něj prvky autismu. Jeho atypický vývoj byl pozorován již ve 2 letech. Dítě nemluví, má pravidelné záchvaty vzteku bez konkrétní příčiny, výrazné jsou automatismy spojené především s poslechem oblíbené hudby či zvuků. Narušení rutiny vede ke vzteku a agresi pacienta. Neurologické a metabolické vyšetření tohoto pacienta neodhalilo žádné abnormality.

Karyotyp tohoto pacienta byl fyziologický 46, XY. Metodou MLPA byly vyloučeny subtelomerické duplikace, delecce, mikroleční syndromy a MLPA panel pro ASD byl také negativní. Tento pacient nebyl odeslán na doplňující vyšetření metodou SNP array. Na základě těchto výsledků nebyla odhalena genetická příčina obtíží pacienta.

### **Pacient 76714**

Pacient 76714 je chlapec s pervazivní vývojovou poruchou, jeho psychomotorický vývoj byl do 1 roku a 11 měsíců přiměřený, po prodělání horečnatého onemocnění došlo k progresi onemocnění, postupně nabyt pohybových automatismů, ztratil zájem o okolí a projevila se i vada řeči.

Analýza G-pruhováním u pacienta 76714 neodhalila abnormality, tedy pacient má fyziologický karyotyp 46, XY. Analýza MLPA detekovala duplikaci na 16. chromozomu v pozici 16p11.2 (Obrázek 5). Doplňující vyšetření SNP array potvrdilo, že se jedná o 576 kb dlouhou duplikaci, která zahrnuje 21 protein kódujících OMIM genů, z nichž pouze KCTD13, SEZ6L2 a MAPK3 jsou asociovány s ASD (SFARI, OMIM databáze). Navíc dle databází ClinVar, DECIPHER a DGV jsou CNVs v oblasti 16p11.2 genetickou podstatou mikroduplikačního syndromu spojovaného s idiopatickým a nesyndromatickým autismem, proto je tento náález hodnocen jako patologická příčina obtíží pacienta. Dále byly nalezeny duplikace 8p11.22 a 14q32.33, které jsou ve zdravé populaci zcela běžné a nepodílí se na klinickém obrazu pacienta.



**Obrázek 5:** Elektroforetogram duplikace 16p11.2 u pacienta 76714

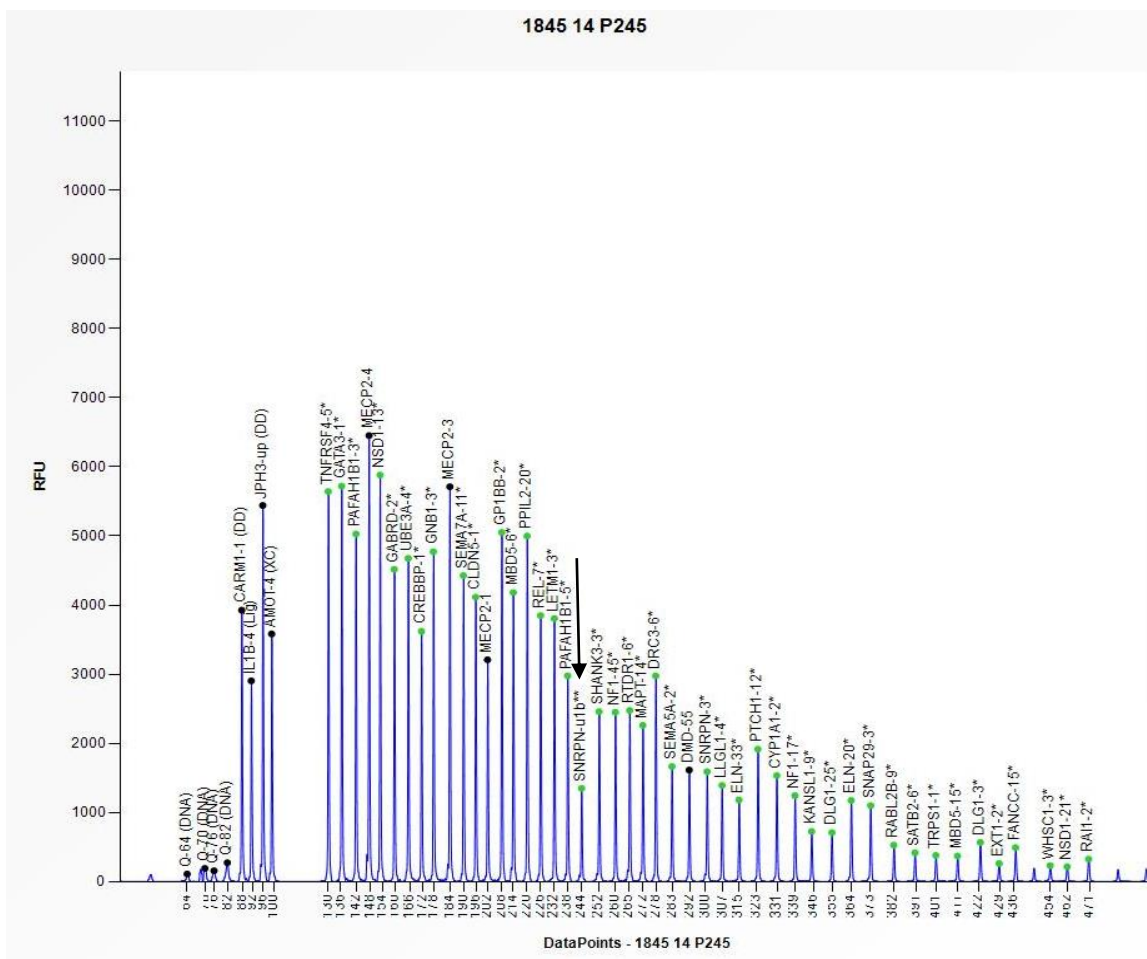
### Pacient 184514

Tato probandka trpí mentální retardací, agresí, vyskytují se u ní rysy autismu, epilepsie a ADHD. Magnetická rezonance mozku u této pacientky odhalila kongenitální abnormalitu, tzv. double cortex.

Karyotyp této pacientky je zcela fyziologický, 46, XX. Analýza DNA pomocí metody MLPA prokázala delecí v oblasti 15q11.2, jež pacientka zdědila od matky, tato delece zasáhla část genu SNRPN, který je spojován se vznikem ASD, ale také schizofrenie, bipolární poruchy či ID (Talkowski et al 2012, Obrázek 6). Na základě fyziologického klinického projevu matky je tato CNV považována za nejasnou, popř. s variabilním fenotypovým projevem. Delece 15q11.2 nebyla zachycena navazujícím vyšetřením metodou SNP array, která mimo to odhalila duplikaci 16p11.2p.11.1 o velikosti 306 kb, která nedosahuje velikosti duplikací popisovaných ve SFARI databázi u ASD. Duplikace oblasti 16p11.2p.11.1 byla rovněž nalezena u zdravého otce. Nález je hodnocen spíše jako benigní. Obdobně byl hodnocen i nález delecí 14q11.2. o velikosti 196 kb, jež vznikl *de novo*. Vzorek DNA této



pacientky byl na základě žádosti lékaře odeslán k vyšetření bodových mutací v genu DCX (SYNLAB, Praha), které potvrdilo přítomnost mutace (NM\_178153.2:c.3867C>T). Tato mutace vznikla *de novo*. Na proteinové úrovni a vede k záměně serinu za leucin. Tato záměna aminokyselin je kauzální pro vznik double cortex (Kim et al. 2005).



**Obrázek 6:** Elektroforetogram delece 15q11.2 u pacienta 184514

## Pacient 100115

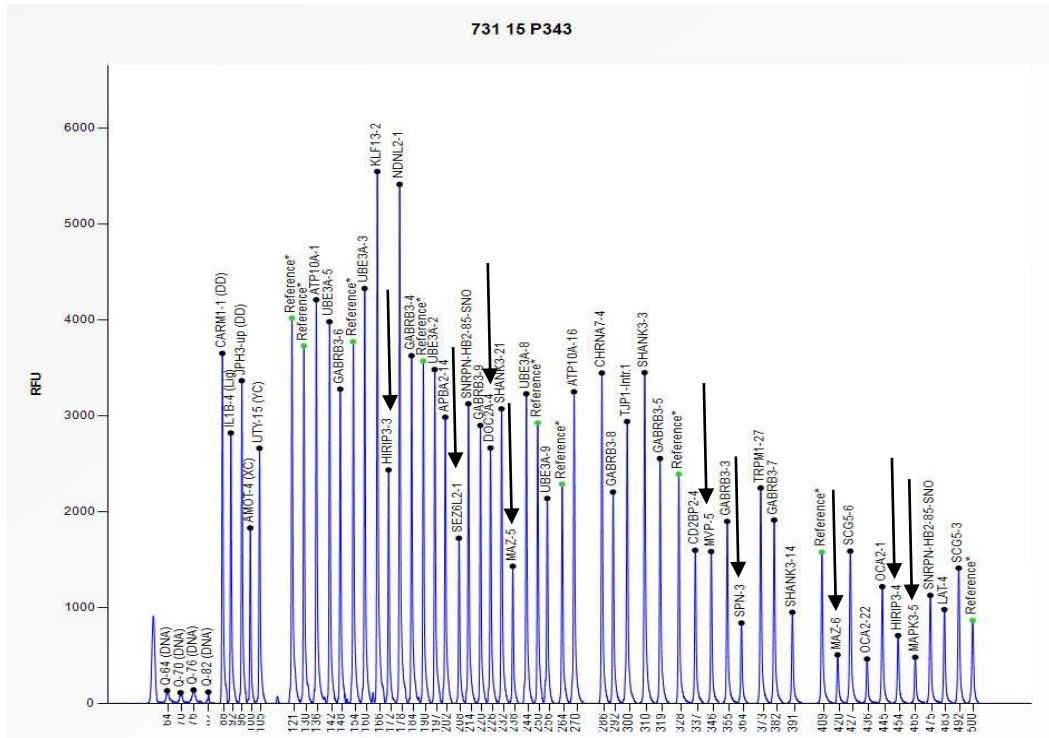
Genetické vyšetření této pacientky bylo poprvé prováděno ve 4 a půl letech, do 2 let užívala několik slov, hrála si, poté došlo k regresi v oblasti vývoje řeči. Pacientka začala vykazovat stereotypní pohyby rukou, což vyvolalo podezření na Rettův syndrom. Je schopna se napít, nakrmit a od 5 let jsou zaznamenávány pokroky. Dívka byla z důvodu predilekce hlavy vpravo rehabilitována Vojtovou metodou, trpí klinodaktylií malíčků, těžkou psychomotorickou retardací a dětským autismem. Magnetická rezonance mozku byla v normě.

Karyotyp pacientky 100115 byl 46, XX. Metodou MLPA byly vyloučeny subtelomerní duplikace, delece, mikroleční MLPA a panel pro ASD byl také negativní. Byla ověřena i možnost přítomnosti Rettova syndromu s negativním výsledkem (MLPA). Metoda SNP array odhalila pouze benigní CNV ve smyslu zisku v oblastech 1q21.2, 4q12, 10q25.1 a ve smyslu ztráty v oblastech 11p11.2, 19p1, jež se dle genetických databází nepodílí na klinickém obrazu pacientky (SFARI, OMIM, ClinVar). Na základě těchto výsledků se nepodařilo objasnit genetickou příčinu obtíží pacientky.

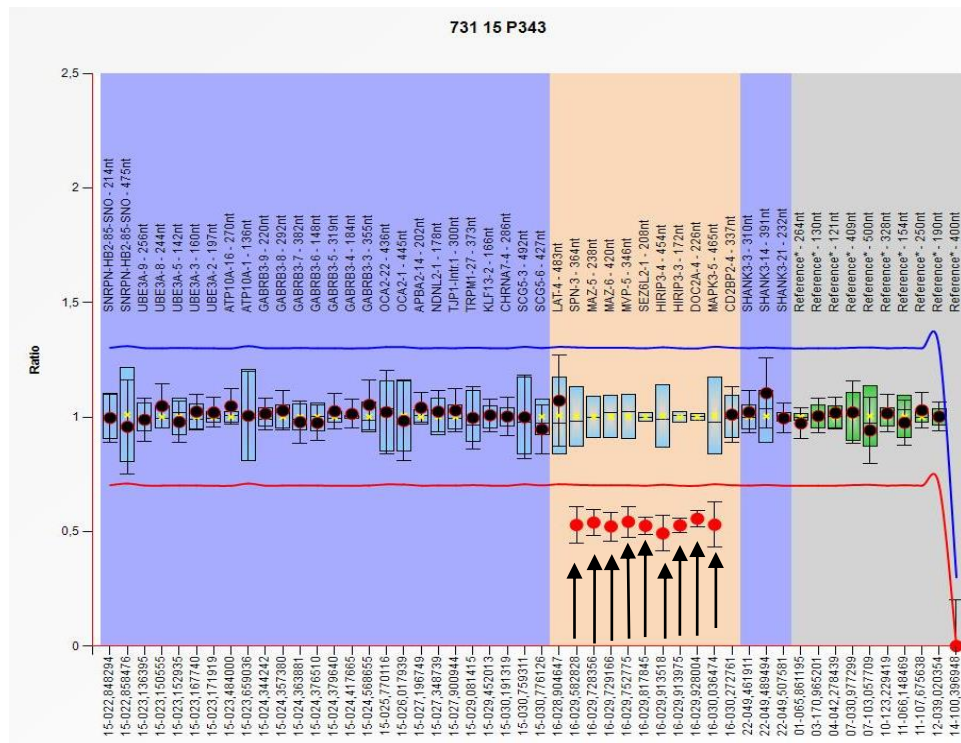
### **Pacient 73115**

Jedná se o chlapce trpícího psychomotorickou retardací a opožděným vývojem řeči. Mezi další fenotypové projevy tohoto pacienta patří poruchy zraku, konkrétně hypermetropie, astigmatismus a amblyopie.

Karyotyp chlapce byl 46, XY, zcela fyziologický. Analýza metodou MLPA detekovala intersticiální delecii oblasti 16p11.2, která zahrnuje geny asociované s ASD (KCTD13, SEZ6L2 a MAPK3). Změna ve smyslu zisku v oblasti 16p11.2 byla již pozorována u pacienta 76714. Stejně jako duplikace u pacienta 76714, je i delece v této oblasti hodnocena jako patologická. Dle databází DECIPHER, DGV a ClinVar se jedná o oblast geneticky podmiňující mikroleční syndrom spojovaný s idiopatickým a nesyndromatickým autismem (viz Obrázky 7 a 8). Tento nálezn byl potvrzen metodou SNP array, která dále odhalila CNVs ve smyslu ztráty v oblastech 1q21.1, 5p13.2, 8p11.22 a ve smyslu zisku 14q32.33, 17q21.31 a 22q11.22, jež se dle genetických databází nepodílí na klinickém obrazu pacientky (SFARI, OMIM, ClinVar).



**Obrázek 7: Elektrofotogram delece 16p11.2 u pacienta 73115**



**Obrázek 8: Box diagram delece 16p11.2u pacienta 73115**

## **Pacient 103216**

Tento pacient byl ve věku 4 let vyšetřován pro vývojovou dysfázií, nerovnoměrný psychomotorický vývoj a ADHD. Dysmorfie a pervazivní porucha se u něj nevyskytují.

Karyotyp tohoto pacienta odhalil translokaci chromozomů 6 a 19, 46, XY, t(6;19)(p21;q13.3). Nebylo však možné potvrdit/vyloučit, jedná-li se o plně balancovanou translokaci. Proto bylo doplněno vyšetření metodou MLPA, která neodhalila žádné početní změny v cílových oblastech DNA. Vzorek byl podroben testování metodou SNP array, kde byla potvrzena balancovaná translokace t(6;19)(p21;q13.3). Dále pak byla odhalena mikrodelece oblastí 1q21.2q21.3 o velikosti 1,7 Mb a 1q21.3q22 o velikosti 2,3 Mb. Tyto deletované oblasti zahrnují geny CTSK, POGZ, SF3B4, ADAR, CHRN2, DPM3, GATAD2B, GBA, HAX1, LMNA, RIT1, které jsou zařazeny v genotyp-fenotypové databázi pro vývojové poruchy (SFARI, OMIM). Databáze ISCA a DECIPHER popisují souvislost CNV v této oblasti s opožděným psychomotorickým vývojem, zejména v oblasti řeči, mentální retardace a faciální dysmorfie. V souvislosti s klinickým obrazem pacienta lze uvažovat zejména o patologickém dopadu heterozygotní ztráty funkce POGZ, která je asociována se syndromem White-Sutton, a delece GATAD2B. Detekována byla také delece v pozici 1q42.3 o velikosti 370 kb, v databázi ClinVar jsou popisovány větší delece v této oblasti s variabilními fenotypovými projevy u pacientů, jako je hypotonie, epilepsie, mikrocefalie či abnormality horních končetin.

## **Pacient 98011**

Tato dívka je sledována pro atypický vývoj. Pro svalovou hypotonii podstupuje rehabilitaci Vojtkovou metodou od 3 měsíců. Dále spíše prospívala. Její opoždění bylo zřetelné zejména v řečové složce. Na základě psychologického vyšetření bylo vysloveno podezření na atypický autismus. V oblasti hrubé a jemné motoriky vykazuje pokroky, v oblasti řeči je však patrný regres. MRI mozku je u této pacientky v normě.

Karyotyp pacientky byl 46, XX, tedy fyziologický. Na základě podezření na Prader-Williho/Angelmanův syndrom byla provedena další vyšetření, která tyto syndromy vyloučila (ÚLG FNOL, MS-PCR). Metodou MLPA byl vyloučen také Rettův syndrom. Avšak tato metoda prokázala mikroduplikaci v oblasti 1q21.1, která byla rovněž potvrzena metodou SNP array. Tato oblast zahrnuje 9 protein kódujících OMIM morbidních genů. Nejvýznamější z nich, gen GJA5, je asociován s ASD, dále je tato CNV popisována jako příčina mikroduplikačního syndromu zahrnujícího opoždění vývoje či dismorfické rysy (DGV,

DECIPHER, ClinVar). Tato varianta je patologická a je příčinou obtíží této pacientky. Dále byla zachycena CNV ve smyslu zisku v oblasti 22q11.1, která je, s ohledem na klinický obraz pacienta, hodnocena jako klinicky nevýznamná.

### **Pacient 57915**

Tento pacient byl vyšetřován ve věku 6 let z důvodu poruchy řeči a vývojové dysfázie, na základě čehož vzniklo podezření na autismus, které bylo později diagnostikováno jako vysoko funkční autismus. Psychomotorický vývoj tohoto chlapce byl po narození v pořádku. Porucha řeči nastala okolo 2 let. Pacient začal ztrácet slova a přestával mluvit. Postupně však dochází ke zlepšení.

Karyotyp pacienta 57915 byl zcela fyziologický, 46,XY. Metodou MLPA byly vyloučeny subtelomerické duplikace, delece, mikroleční syndromy a panel pro ASD byl také negativní. Animetoda SNP array neodhalila patologické CNVs. Byly pozorovány pouze CNVs ve smyslu zisku v oblastech 14q32.33, 22q11.22, které lze pozorovat i u zdravé populace. Z genetického hlediska se nepodařilo objasnit příčinu obtíží tohoto pacienta.

### **Pacient 98214**

U tohoto pacienta byla pozorována porucha chování asi ve 3 letech. Chlapec je postižen ADHD, které bylo diagnostikováno ve věku 5 let, následně byla diagnóza doplněna o Aspergerův syndrom, kterým rovněž trpí jeho sestra a sestřenice. Bratři matky tohoto dítěte jsou ve vývoji lehce opožděni. U otce byly zaznamenány rysy obsedantně kompulzivní poruchy. Prarodiče matky trpí Alzheimerovou chorobou.

Pacient vykazoval fyziologický karyotyp 46, XY. Metodou MLPA byly vyloučeny subtelomerické duplikace, delece, mikroleční syndromy a panel pro ASD byl také negativní. Dále byl vzorek 98214 odeslán k analýze metodou SNP array, která odhalila CNVs ve smyslu ztráty v oblasti 8p11.22, 11p11.2 a 19p12 a ve smyslu zisku v oblasti 14q32.33 a 22q11.22. Všechny nalezené změny byly hodnoceny jako klinicky nevýznamné (ClinVar). Z genetického hlediska se nepodařilo objasnit příčinu obtíží tohoto pacienta.

### **Pacient 100615**

100615 je pacient s opožděným psychomotorickým vývojem a lehkou psychomotorickou retardací, chlapec nemá výrazné dysmorfické rysy, vývoj řeči je však opožděný. Dále je pacient postižen silnou zrakovou vadou.

Karyotyp tohoto pacienta odhalil ztrátu terminální části chromozomu 22, tedy 46,XYder(22). Tento nálezn také potvrdily metody FISH, MLPA a SNP array, které detekovaly nebalancovanou translokaci mezi krátkým raménkem 22. chromozomu (pozice 22q13.3) a dlouhým raménkem chromozomu 8 (pozice 8p23.3). Tato translokace vyvolala delecí terminální části chromozomu 22 a duplikaci části chromozomu 8. Delece 22q13.3 zasáhla 28 protein kódujících OMIM morbidních genů, z nichž, z hlediska klinického obrazu pacienta, je nejvýznamější gen SHANK3 pro svoji asociaci s ASD a jinými neurodegenerativními onemocněními (Durand et al., 2007). Duplikace 8p23.3 zahrnula 59 protein kódujících OMIM morbidních genů z nichž nejvýznamějšími geny jsou GATA4 a SOX7 (OMIM, DECIPHER, SFARI databáze). Jedná se tedy o kombinaci Phelan-McDermidova a 8p23.1 mikroduplikačního syndromu postihujícího geny asociované s rozvojem ASD, která vznikla *de novo*. Tato translokace je genetickou příčinou obtíží pacienta.

**Tabulka 7:** Přehled výsledků vyšetření pacientů metodami MLPA, popř. SNP array

Pacient	Karyotyp	MLPA - klinicky významné CNVs	SNP array - klinicky významné CNVs	Klinicky významné geny v nalezených CNVs	Celkový klinický význam
34812*	46, XX	delece 20q13.3	delece 20q13.3	KCNQ2	patologická
		duplikace 22q13	-	RABL2B, SHANK3, ARSA, CHKB	
10016	-	duplikace Xq28	-	MECP2	patologická
164714	46, XY	Negativní	-	-	neobjasněno
76714	46, XY	duplikace 16p11.2	duplikace 16p11.2	KCTD13, SEZ6L2, MAPK3	patologická
184514 <sup>#</sup>	46, XX	delece 15q11.2	negativní	SNRPN	neobjasněno
100115	46, XX	Negativní	negativní	-	neobjasněno
73115	46, XY	delece 16p11.2	delece 16p11.2	KCTD13, SEZ6L2, MAPK3	patologická
103216	46, XY, t(6;19)(p21;q13.3)	negativní	delece 1q21.2q21.3	POGZ, GATAD2B	patologická
			delece 1q21.3q22		patologická
98011	46, XX	duplikace 1q21.1	duplikace 1q21.1	GJA5	patologická
57915	46, XY	negativní	negativní	-	neobjasněno
98214	46, XY	negativní	negativní	-	neobjasněno
100615*	46, XY der(22)	duplikace 8p23.3	duplikace 8p23.3	GATA4, SOX7	patologická
		delece 22q13.3	delece 22q13.3	SHANK3	

\* Genetická analýza doplněna o metodu FISH, pro přesné určení translokace. # NM\_178153.2:c.3867C>T

## 7. Diskuze

Porucha autistického spektra (ASD) je pervazivní vývojová porucha, která se charakteristicky vyznačuje trojicí příznaků: poruchou sociální interakce, verbální a neverbální komunikace a omezenými, opakujícími se nebo stereotypními vzorci chování (Sykes et al., 2009). Navíc u 60 % pacientů s ASD lze pozorovat celou řadu dalších fenotypových projevů, které jsou velmi heterogenní (Moreira et al., 2014). V této práci byly pozorovány zejména psychomotorická retardace (n=8), poruchy řeči (n=6), ADHD (n=3), vývojová dysfázie (n=2), hypotonie (n=2), mentální retardace (n=2), agrese (n=2), poruchy zraku (n=2), hypertrofie (n=1), epilepsie (n=1), mikrocefalie (n=1).

Nejčastějším doprovodným znakem ASD je psychomotorická retardace (popř. mentální retardace), které mohou být zachyceny až u 70 % pacientů s ASD. Tomuto literárnímu faktu odpovídá i 8 (2) z 12 pacientů s ASD v této práci. Přibližně polovina autistických pacientů trpí spánkovými poruchami (Moreira et al., 2014). I přes její vysokou frekvenci výskytu u ASD pacientů, nebyla spánková porucha v této práci pozorována. Další velice častá komorbidita, která se rovněž vyskytla u jednoho z našich pacientů, je epilepsie, postihující až 30 % pacientů s ASD. Stejně procentuální zastoupení má dle literatury i hyperaktivita s poruchou pozornosti (Moreira et al., 2014). V této práci byli zachyceni 3 z 12 (25%) pacientů s ASD a zároveň ADHD. Dále u 20 % pacientů s ASD může být zachycena makrocefalie (Moreira et al., 2014; Gamsiz et al., 2015). V této práci nebyl zachycen žádný pacient s makrocefálií, avšak byl zachycen pacient s mikrocefálií. Mezi další doprovodné znaky patří syndrom fragilníhoX (2,1 %), Anglemanův ( $\leq 1$  %) a Phelan-McDermidův ( $< 1$  %) syndrom nebo tuberózní skleróza (1,1 % – 1,3 %) (Muhle et al., 2004; Gamsiz et al., 2015; Persico & Napolioni, 2013). Častou abnormalitou spojovanou s ASD je také ID. Studie ukazují, že 10 % – 40 % lidí s ID trpí rovněž poruchami autistického spektra (Stessman et al., 2016).

Hua a spol v roce 2015 publikovali, že 8-20% CNVs je asociováno se vznikem ASD. V literatuře byly popisovány případy delecí v regionu 20q13.33 v rozmezí 561 kb až 6,8 Mb, jejichž fenotyp zahrnoval autistické a destruktivní chování, záchvaty, opožděný psychomotorický vývoj, deficity řeči a hypotonii (Traylor et al., 2010). Tato delece bývá obecně spojována s poruchami autistického spektra a schizofrenií s brzkým nástupem (Papakonstantinou et al., 2016). U pacientky s delecí v oblasti 20q13.33 o velikosti 1,6 Mb rovněž pozorujeme některé z těchto znaků, jako je psychomotorická retardace, hypotonie



a afektivní záchvaty. U této dívky byla také nalezena mikroduplikace oblasti 22q13.33, která byla již dříve popsána. Stejně jako v literárních zdrojích i u této pacientky došlo ke změně zahnující gen SHANK3, který je jedním z nejrizikovějších genů pro vznik ASD. Abnormality v této oblasti jsou asociovány s neurologickými onemocněními, jako je epilepsie, schizofrenie či ADHD (Moreira et al., 2014).

Mutace genu MECP2 způsobuje progresivní neurovývojovou poruchu známou jako Rettův syndrom. U chlapců způsobuje tato změna těžkou poruchu vývoje a ID, u dívek se projevuje mírněji. Publikované případy duplikace Xq28 vykazovali ID, opožděný vývoj, pomalou chůzi, poruchy řeči a hypotonii, u žádného z nich nebyla přítomna spasticita (Yi et al., 2016). Pacient 10016 s touto duplikací fenotypově odpovídá zmíněným znakům, navíc se u něj vyskytuje hypertrofie. Avšak jeho matka, od které duplikaci zdědil, nejeví známky nemoci autistického spektra.

Duplikace v oblasti 16p11.2, která se společně s delecí stejného regionu podílí na vzniku 1 % autistických případů, je jedním z nejčastějších genetických přispěvatelů k ASD (Duyzend et al., 2016). Abnormality v této oblasti jsou kromě autismu spojovány také s mentální retardací, poruchami řeči, vrozenými anomáliemi, ID, záchvaty, ADHD. Zatímco delece častěji vedou k ASD a projevují se makrocefalií a zvýšeným BMI, duplikace jsou běžněji asociovány se schizofrenií, mikrocefalií a sníženým BMI (Gamsiz et al., 2015; Snyder et al., 2016). Duplikace této oblasti byla nalezena u chlapce s poruchou řeči, pervazivní vývojovou poruchou a pohybovými automatismy, jeho fenotyp tedy je tedy podmíněn duplikací v oblasti 16p11.2. Obdobně delece přibližně stejné oblasti u druhého pacienta vysvětluje jeho autistický projev. Dále tento pacient trpí vadou zraku, která je také vysvětlována mikrodelečním syndromem 16p11.2.

Pacientka 184514 se zdánlivě totožnou duplikací 16p11.2 se fenotypově shoduje se dvěma výše popsanými pacienty ve znacích, jako jsou ADHD, agresivní záchvaty či autistické chování. Avšak její mikroduplikace 16p11.2 je pouze 306 kb velká a nedosahuje tedy oblastí kauzálních pro klinický obraz pacientky. Dále je tato CNVs zachycena i u jejího bezpříznakového otce. U této dívky byla rovněž prokázána delece v pozici 15q11.2 zasáhla část genu SNPRN. CNVs v oblasti 15q11.2 je v literatuře nejčastěji uváděna jako příčina vzniku Angelmanova a Prader-Williho syndromu. Fenotyp těchto syndromů je velmi heterogenní, přičemž některé znaky, jako je ASD, poruchy vývoje a řeči, ADHD či emoční labilita, odpovídají fenotypovému projevu této dívky (Gamsiz et al., 2015). Navíc gen

SNPRN je dle databáze SFARI asociován s ASD, DD (development delay), ID. Na druhou stranu je tato změna zachycena i u bezpříznakové matky pacientky.

Intersticiální delece zahrnující oblast 14q11.2 jsou vzácné. Pacienti s mikrodelecemi vykazují kognitivní vady, dysmorfické rysy a anomálie ušního boltce. Jedním z publikovaných případů je pacientka s 2,89Mb delecí, pozorován byl opožděný vývoj a hypotonie (Terrone et al., 2014). Avšak pacientka 184514 disponuje CNV 14q11.2 o velikosti pouze 196 kb. Kromě již zmíněných abnormalit, byla u pacientky 184514 nalezena také X vázaná dominantní mutace genu DCX (NM\_178153.2:c.3867C>T). Případ publikovaný Shnyder a kolegy popisuje čtyřletou dívku s opožděným vývojem a double cortex syndromem, u které byla prokázána stejná mutace. Tento sporadicky se vyskytující syndrom byl potvrzen i u naší pacientky a pravděpodobně je tak důsledkem nalezené bodové mutace (Shnyder et al., 2017).

Fenotyp pacienta 103216, zahrnující vývojovou dysfázii a opožděný psychomotorický vývoj, je pravděpodobně způsobem heterozygotní ztrátou funkce genů GATAD2B a POGZ, která byla způsobena delecí v oblasti 1q21.3. Tato ztráta je popisována především v souvislosti s výskytem ID a mentální retardací, mezi další poruchy, korelující s fenotypem pacienta, patří např. vývojová dysfázie a opožděný vývoj motoriky (Stessman et al., 2016; Tim-Aroon et al., 2017).

U pacientky 98011 byla detekována duplikace na 1. chromozomu v pozici 1q21.1, někdy také nazývána jako 1q21.1 mikroduplikační syndrom. Tento syndrom je nejčastěji zmiňován u pacientů trpících těžkými vývojovými poruchami, autistickým chováním, lehkou mentální retardací nebo opožděním řeči, které jsou popisovány rovněž u této pacientky. Nejvýznamnějšími zasaženými geny je gen GJA5, které se podílí především na vzniku vrozených srdečních vad (Mefford et al., 2008).

U 4 pacientů nebyla zachycena CNVs, která by vysvětlovala jejich fenotypový projev. V těchto případech může být genetická podstata ASD na úrovni jednonukleotidových změn (SNP), v regulačních oblastech nebo epigenetických mechanismech genů asociovaných s ASD. Ke studiu těchto oblastí zájmu je zapotřebí nových technik, např.: masivně paralelního sekvenování (MPS) a rozsáhlých epigenetických a funkčních studií k prostudování skutečného dopadu CNVs nebo SNPs na klinický obraz pacienta.

## 8. Závěr

V teoretické části se tato práce zabývala současným stavem problematiky ASD pacientů a zaměřila se zejména na genetickou podstatu, možnosti jejího zkoumání, a jejich fenotypového projevu.

V experimentální části byla metodou MLPA provedena analýza vzorků DNA izolované z periferní krve 12 pacientů s ASD k cílené detekci CNVs, které by mohly být příčinou fenotypových projevů těchto pacientů. Ve vybraných případech byla tato analýza rozšířena o metodu SNP array. Nalezené CNVs byly analyzovány, s ohledem na další vyšetření (karyotyp, FISH, MS-PCR, sekvenace DCX), pomocí genetických databází (SFARI, OMIM, ClinVar, DECIPHER) a celosvětové literatury.

U 8 pacientů s ASD byly nalezeny patologické CNVs podmiňující fenotypový projev těchto pacientů, u jednoho byla nalezená CNVs nejasného klinického významu a u 3 nebyla genetická příčina ASD objasněna. Výsledky byly v rámci diskuze porovnány s publikovanými údaji. Ve většině případů se výsledky této práce shodovaly s celosvětovou literaturou.

## 9. Seznam použitých zkratek

22q11DS – syndrom delece 22q11

ADHD – attention deficit hyperactivity disorder

ADI-R – autism diagnostic interview-revised

AS – Aspergerův syndrom

ASD – autism spectrum disorders

BMI – body mass index

bp –base pairs

BP – breakpoints

CARS – childhood autism rating scale

CGH – comparative genomic hybridization

CNS – centrální nervová soustava

CNV – copy number variation

DD – developmental delay

DZ – dizygotní

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FXS – fragile X syndrome

ID – intellectual disability

MKN-10 – mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification

MPS – masivně paralelní sekvenování

MZ – monozygotní

nt – nukleotid

PWS – Prader-Williho syndrom

SNP – single nucleotide polymorphism

SNV – single nucleotide variation

TSC – tuberous sclerosis complex

UPD – uniparentální disomie

WHO – world health organization

## 10. Seznam použité literatury

AlAyadhi, L., Hashmi, J., Iqbal, M., Albalawi, A., Samman, M., Elamin, N., Bashir, S., & Basit, S. (2016): High-resolution SNP genotyping platform identified recurrent and novel CNVs in autism multiplex families, *Neuroscience*, 339: 561-570.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

Bahl, S., Chiang, C., Beauchamp, R., Neale, B., Daly, M., Gusella, J., Talkowski, M., & Ramesh, V. (2013): Lack of association of rare functional variants in TSC1/TSC2 genes with autism spectrum disorder, *Molecular Autism*, 4(1): 1-11.

Bodur, S., Taskiran, C., Isildar, Y., Alan, B., Cetinkaya, M., Kara, H., Sahin, M., & Turgut, S. (2016): Factors Affecting Burden of Psychopharmacological Medication in Patients with Autism Spectrum Disorder: The Importance of Early Diagnosis, *Klinik Psikofarmakoloji Bulteni*, 26(3): 273-277.

Boeckers T.M., Kreutz M.R., Winter, C. (1999): Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci* 19 (15): 6506-6518.

Bonaglia M.C., Giorda R., Borgatti, R. (2001): Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet*, 69: 261–268.

Brunetti-Pierri, N., Berg, J., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C., Sahoo, T., Lalani, S., Graham, B., Lee, B., Shinawi, M., Shen, J., Kang, S., Pursley, A., Lotze, T., Kennedy, G., Lansky-Shafer, S., Weaver, C., Roeder, E., Grebe, T., & Arnold, G. (2008): Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities, *Nature Genetics*, 40(12): 1466-1471.

Bueno, C., Tabares-Seisdedos, R., Moraleda, J., & Martinez, S. (2016): Rett Syndrome Mutant Neural Cells Lacks MeCP2 Immunoreactive Bands, *Plos ONE*, 11(4): 1-14.

Cappuccio, G., Vitiello, F., Casertano, A., Fontana, P., Genesio, R., Bruzzese, D., Ginocchio, V., Mormile, A., Nitsch, L., Andria, G., & Melis (2016): New insights in the interpretation of

array-CGH: autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants, *Italian Journal Of Pediatrics*, 42: 1-11.

De Rubeis, S., & Buxbaum, J. (2015): Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity, *Human Molecular Genetics*, 24(20): 24.

DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S., Schmitz, Ch., Schultz, R.T., Crawley, J., Young, L. (2006): The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *Journal of Neuroscience*, 26(26): 6897-6906.

Durand, C., Betancur, C., Boeckers, T., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I., Anckarsäter, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M., de Mas, P., Bieth, E., Rogé, B., Héron, D., & Burglen, L. (2007): Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders, *Nature Genetics*, 39(1): 25-27.

Duyzend, M., Nuttle, X., Coe, B., Baker, C., Nickerson, D., Bernier, R., & Eichler, E. (2016): Maternal Modifiers and Parent-of-Origin Bias of the Autism-Associated 16p11.2 CNV, *The American Journal Of Human Genetics*, 98: 45-57.

El-Baz, F., Zaghoul, M., Sobky, E., Elhossiny, R., Salah, H., & Abdelaziz, N. (2016): Chromosomal abnormalities and autism, *Egyptian Journal Of Medical Human Genetics*, 17(1): 57-62.

Eriksson, M. A., Liedén, A, Westerlund, J, Bremer, A, Wincent, J, Sahlin, E, Gillberg, C, Fernell, E and Anderlid, B.-M. (2015): Rare copy number variants are common in young children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatr*, 104: 610–618.

Gamsiz, E. D., Sciarra, L. N., Maguire, A. M., Pescosolido, M. F., van Dyck, L. I., & Morrow, E. M. (2015): Discovery of Rare Mutations in Autism: Elucidating Neurodevelopmental Mechanisms. *Neurotherapeutics*, 12(3): 553–571.

Gdalyahu, A., Trachtenberg, J., Lazaro, M., Penagarikano, O., Golshani, P., & Gescwind, D. (2015): The autism related protein contactin-associated protein-like 2 (CNTNAP2) stabilizes new spines: An in vivo mouse study, *Plos ONE*, 10(5).

Glessner, J., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C., Bradfield, J., Imielinski, M., Frackelton, E., Reichert, J., Crawford, E., Munson, J., Sleiman, P., Chiavacci, R., Annaiah, K., Thomas, K., & Hou, C. (2009): Autism genome-

wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes, *Nature*, 459(7246): 569-573.

Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M., Oh, E., Taniguchi, Y., Jacquemont, S., Reymond, A., Sun, M., Sawa, A., Gusella, J., Kamiya, A., Beckmann, J., & Katsanis, N. (2012): KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant, *Nature*, 485(7398): 63-367.

Gümüşlü, K., Salvi, H., Sünnetci, D., Çine, N., Kara, B., Eren Keskin, S., & Akkoyunlu, R. (2015): A CGH array study in nonsyndromic (primary) autism patients: deletions on 16p13.11, 16p11.2, 1q21.1, 2q21.1q21.2, and 8p23.1, *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 45(2): 313-319.

Guo, H., Xun, G., Peng, Y., Xiang, X., Xiong, Z., Zhang, L., He, Y., Xu, X., Liu, Y., Lu, L., Long, Z., Pan, Q., Hu, Z., Zhao, J., & Xia, K. (2012): Disruption of Contactin 4 in two subjects with autism in Chinese population, *Gene*, 505: 201-205.

Hadley, D., Hakonarson, H. (2016): *Genetics of Autism Spectrum Disorders*, Medscape.

Hippolyte, L., Maillard, A., Rodriguez-Herreros, B., Pain, A., Martin-Brevet, S., Ferrari, C., Conus, P., Macé, A., Hadjikhani, N., Metspalu, A., Reigo, A., Kolk, A., Männik, K., Barker, M., Isidor, B., Le Caignec, C., Mignot, C., Schneider, L., Mottron, L., Keren, B., David, A., Doco-Fenzy, M., Gérard, M., Bernier, R., Goin-Kochel, R., Hanson, E., Green Snyder, L., Ramus, F., Beckmann, J., Draganski, B., Reymond, A., & Jacquemont, S. (2016): Archival Report: The Number of Genomic Copies at the 16p11.2 Locus Modulates Language, Verbal Memory, and Inhibition, *Biological Psychiatry*, 80, *Autism and the Social Brain*, 129-139.

Hogart, A., Wu, D., LaSalle, J., & Schanen, N. (2010): The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13, *Neurobiology Of Disease*, 38(2): 181-191.

Homig-Holzel, C., & Savola, S. (2012): Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in Tumor Diagnostics and Prognostics, *Diagnostic Molecular Pathology*, 21(4): 189-206.

Hort, V., Hrdlička, M., Kocourková, J., Malá, E. (2008): *Dětská a adolescentní psychiatrie*. Vyd. 2. Praha: Portál, 492 s. ISBN 9788073674045.

- Jarošová, M., Pospíšilová, H., Plachý, R., Papajík, T., Koptíková, J., Indrák, K. (2006): Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů. *Klinická onkologie*, 19: 342-346.
- Jeuken, J., Cornelissen, S., Boots-Sprenger, S., Gijzen, S., & Wesseling, P. (2006): Technical Advance: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. A Diagnostic Tool for Simultaneous Identification of Different Genetic Markers in Glial Tumors, *The Journal Of Molecular Diagnostics*, 8: 433-443.
- Jeuken, J., Cornelissen, S., Vriezen, M., Dekkers, M., Boots-Sprenger, S., Wesseling, P., Errami, A., & Sijben, A. (2007): MS-MLPA: An attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas', *Laboratory Investigation*, 87(10):1055-1065.
- Jones, R., Risi, S., Wexler, D., Anderson, D., Corsello, C., Pickles, A., & Lord, C. (2015): How interview questions are placed in time influences caregiver description of social communication symptoms on the ADI-R, *Journal Of Child Psychology & Psychiatry*, 56(5): 577-585.
- Kannan, T. P., & Zilfalil, B. A. (2009): Cytogenetics: Past, Present And Future. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 16(2): 4–9.
- Kawai, Y., Mimori, T., Kojima, K., Nariai, N., Danjoh, I., Saito, R., Yasuda, J., Yamamoto, M., & Nagasaki, M. (2015): Japonica array: improved genotype imputation by designing a population-specific SNP array with 1070 Japanese individuals, *Journal Of Human Genetics*, 60, 10: 581-587.
- Kelleher, I., & Bear, M. (2008): The Autistic Neuron: Troubled Translation? *Cell*, 135: 401-406.
- Kim, M., Park, M., Kim, B., Cho, K., Kim, Y., Kim, J., Lee, M., Heo, T., & Kim, E. (2005): A novel missense mutation of doublecortin: Mutation analysis of Korean patients with subcortical band heterotopia, *Journal Of Korean Medical Science*, 20(4): 670-673.
- Klose, R.P. (2016): Karyotyping, *Magill'S Medical Guide (Online Edition)*.
- Kolevzon, A., Smith, C., Schmeidler, J., Buxbaum, J., & Silverman, J. (2004): Familial symptom domains in monozygotic siblings with autism, *American Journal Of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 129B(1): 76-81.



- Kozłowski, P., Jasinska, A. J. and Kwiatkowski, D. J. (2008): New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *ELECTROPHORESIS*, 29: 4627–4636.
- LaFramboise, T. (2009): Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 37(13): 4181–4193.
- Liu, Y., Hu, Z., Xun, G., Peng, Y., Lu, L., Xu, X., Xiong, Z., Xia, L., Liu, D., Li, W., Zhao, J., & Xia, K. (2012): Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort, *Journal Of Psychiatric Research*, 46: 630-634.
- Manning, M, Hudgins, L, Enns, G, Hoyme, H, Cassidy, S, Clericuzio, C, Cherry, A, & Schwartz, S (2004): Terminal 22q deletion syndrome: A newly recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum, *Pediatrics*, 114(2): 451-457.
- Mao, X., Young, B. D., & Lu, Y.-J. (2007): The Application of Single Nucleotide Polymorphism Microarrays in Cancer Research. *Current Genomics*, 8(4): 219-228.
- Mayes, S., Calhoun, S., Murray, M., Pearl, A., Black, A., & Tierney, C. (2014): Final DSM-5 under-identifies mild Autism Spectrum Disorder: Agreement between the DSM-5, CARS, CASD, and clinical diagnoses, *Research In Autism Spectrum Disorders*, 8: 68-73.
- Mefford, H. C., Sharp, A. J., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K., Eichler, E. E. (2008): Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotypes. *The New England Journal of Medicine*, 359(16): 1685–1699.
- Merkenová M., Kramářová A., Bruchová H., Brdička R. (2006): Využití biočipových technologií v onkologii, *Klinická onkologie*, 19: 333-337.
- Moog, U., Smeets, E., van Roozendaal, K., Schoenmakers, S., Herbergs, J., Schoonbrood-Lenssen, A., & Schrandt-Stumpel, C. (2003): Review article: Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2), *European Journal Of Paediatric Neurology*, 7: 5-12.
- Moreira, D., Griesi-Oliveira, K., Bossolani-Martins, A., Lourenço, N., Takahashi, V., da Rocha, K., Moreira, E., Vadasz, E., Meira, J., Bertola, D., Halloran, E., Magalhães, T., Fett-Conte, A., & Passos-Bueno, M. (2014): Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in Autism Spectrum Disorder Brazilian Individuals with and without Epilepsy, *Plos ONE*, 9(9):1-8.

- Moreira, E., Silva, I., Lourenço, N., Moreira, D., Ribeiro, C., Martins, A., Griesi-Oliveira, K., Lazar, M., Costa, S., Naslavsky, M., Rocha, K., Agüena, M., Fett-Conte, A., Zatz, M., Rosenberg, C., Zachi, E., Bertola, D., Vadasz, E., & Passos-Bueno (2016): Detection of small copy number variations (CNVs) in autism spectrum disorder (ASD) by custom array comparative genomic hybridization (aCGH), *Research In Autism Spectrum Disorders*, 23: 145-151.
- Muhle, R., Trentacoste, S. V., Rapin, I. (2004): The Genetics of Autism, *Pediatrics*, 113(5): 472-486.
- Muraru, I., Iorga, M., & Karner-Hutuleac, A. (2016): Psychological reasons and ethical issues related to early diagnosis and intervention in children with autism spectrum disorders, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Bioethica*, 61(½): 101-110.
- Naviaux, J., Lin, W., Kefeng, L., Bright, A., Alaynick, W., Williams, K., Powell, S., & Naviaux, R. (2015): Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the Fragile X (Fmr1 knockout) mouse model, *Molecular Autism*, 6(1): 1-19.
- Nicolazzi, E., Marras, G., & Stella, A. (2016): SNPConvert: SNP Array Standardization and Integration in Livestock Species, *Microarrays (2076-3905)*, 5(2): 1-6.
- O'Connor, C. (2008): Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature Education* 1(1): 27.
- Oostlander, A., Meijer, G., & Ylstra, B. (2004): Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics' *Clinical Genetics*, 66(6): 488-495.
- Oyarzabal, A., Bravo-Alonso, I., Sánchez-Aragó, M., Rejas, M., Merinero, B., García-Cazorla, A., Artuch, R., Ugarte, M., & Rodríguez-Pombo, P. (2016): Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive dietary response in this form of autism, *BBA - Molecular Basis Of Disease*, 1862: 592-600.
- Pak, C., Danko, T., Zhang, Y., Aoto, J., Anderson, G., Maxeiner, S., Yi, F, Wernig, M., & Südhof, T. (2015): Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in NRXN1, *Cell Stem Cell*, 17: 316-328.
- Papakonstantinou, A., Otheiti, I, Belivanaki, M., Haritaki, S., Korpa, T., Albani, Z., Terzioglou, E., Apostola, P., Skamnaki, A., Xaidara, A., Kosma, K., Kitsiou-Tzeli, S., Tzetis,

- M., Kolaitis, G., & Bouwkamp, C. (2016): A boy with conduct disorder (CD), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), borderline intellectual disability, and 47,XXY syndrome in combination with a 7q11.23 duplication, 11p15.5 deletion, and 20q13.33 deletion, *Child And Adolescent Psychiatry And Mental Health*, 10(1).
- Persico, A., & Napolioni, V. (2013): Review: Autism genetics, *Behavioural Brain Research*, 251, SI:Neurobiology of Autism, 95-112.
- Phelan, M., Thomas, G., Saul, R., Rogers, R., Taylor, H., Wenger, D., & McDermid, H. (1992): Cytogenetic, biochemical, and molecular analyses of a 22q13 deletion, *American Journal Of Medical Genetics*, 43(5): 872-876.
- Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Wen-Lin Kuo, C., Chen, Ch., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, Gray, J., Albertson, D. (1998): High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nature Genetics*, (20): 207-211.
- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9): 2934-2938.
- Poultney, C., Goldberg, A., Drapeau, E., Kou, Y., Harony-Nicolas, H., Kajiwara, Y., De Rubeis, S., Durand, S., Stevens, C., Rehnström, K., Palotie, A., Daly, M., Ma'ayan, A., Fromer, M., & Buxbaum (2013): Identification of Small Exonic CNV from Whole-Exome Sequence Data and Application to Autism Spectrum Disorder', *The American Journal Of Human Genetics*, 93: 607-619.
- Pradhan, A.P. (2015): Fluorescence in situ hybridization (FISH)', *Salem Press Encyclopedia Of Health*.
- Prunier, J., Caron, S., & MacKay, J. (2017): CNVs into the wild: screening the genomes of conifer trees (*Picea* spp.) reveals fewer gene copy number variations in hybrids and links to adaptation, *BMC Genomics*, 18: 1-12.
- Pucilowska, J., Vithayathil, J., Tavares, E., Kelly, C., Colleen Karlo, J., & Landreth, G. (2015): The 16p11.2 deletion mouse model of autism exhibits altered cortical progenitor proliferation and brain cytoarchitecture linked to the ERK MAPK pathway, *Journal Of Neuroscience*, 35(7): 3190-3200.

- Raghavan, M., Lillington, D., Skoulakis, S., Debernardi, S., Chaplin, T., Foot, N., Lister, T., & Young, B. (2005): Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias, *Cancer Research*, 65(2): 375-378.
- Ramocki, M. B., Tavyev, Y. J., & Peters, S. U. (2010): The MECP2 Duplication Syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(5): 1079–1088.
- Ravnan, J., Tepperberg, J., Papenhausen, P., Lamb, A., Hedrick, J., Eash, D., Ledbetter, D., & Martin, C. (2006): Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities, *Journal Of Medical Genetics*, 43(6): 478-489.
- Sanders, S., Ercan-Sencicek, A., Hus, V., Luo, R., Murtha, M., Moreno-De-Luca, D., Chu, S., Moreau, M., Gupta, A., Thomson, S., Mason, C., Bilguvar, K., Celestino-Soper, P., Choi, M., Crawford, E., Davis, L., Davis Wright, N., Dhodapkar, R., DiCola, M., DiLullo, N., Fernandez, T., Fielding-Singh, V., Fishman, D., Frahm, S., Garagaloyan, .R, Goh, G., Kammela, S., Klei, L., Lowe, J., Lund, S., McGrew, A., Meyer, K., Moffat, W., Murdoch, J., O'Roak, B., Ober, G., Pottenger, R., Raubeson, M., Song, Y., Wang, Q., Yaspan, B., Yu, T., Yurkiewicz, I., Beaudet, A., Cantor, R., Curland, M., Grice, D., Günel, M., Lifton, R., Mane, S., Martin, .D, Shaw, C., Sheldon, M., Tischfield, J., Walsh, C., Morrow, E., Ledbetter, D., Fombonne, E., Lord, C., Martin, C., Brooks, A., Sutcliffe, J., Cook, J., Geschwind, D., Roeder, K., Devlin, B., & State, M. (2011): Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism, *Neuron*, 70: 863-885.
- Santangelo, S., & Tsatsanis, K. (2005): What is known about autism - Genes, brain, and behavior, *American Journal Of Pharmacogenomics*, 5(2): 71-92.
- Shnayder, N., Artyukhov, I., Egorova, E., Dmitrienko, D., Shilkina, O., Molgachev, A., (2017): Novel Mutation chrX:110644366 C>A of the DCX Gene in 4-year-old Girl with Sporadic Double Cortex Syndrome, *International Journal Of Biomedicine*, Vol 7, Iss 1, Pp 67-70 (2017), 1: 67.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Research* 30.

Skalny, A., Simashkova, N., Klyushnik, T., Grabeklis, A., Radysh, I., Skalnaya, M., Nikonorov, A., & Tinkov, A. (2016): Pathobiochemistry: Assessment of serum trace elements and electrolytes in children with childhood and atypical autism, *Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology*.

Snyder, L., D'Angelo, D., Chen, Q., Bernier, R., Goin-Kochel, R., Wallace, A., Gerdts, J., Kanne, S., Berry, L., Blaskey, L., Kuschner, E., Roberts, T., Sherr, E., Martin, C., Ledbetter, D., Spiro, J., Chung, W., & Hanson, E. (2016): Autism Spectrum Disorder, Developmental and Psychiatric Features in 16p11.2 Duplication, *Journal Of Autism And Developmental Disorders*, 46(8): 2734-2748.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Lichter, P., Benner, A., Döhner, H., & Cremer, T. (1997): Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances, *Genes Chromosomes And Cancer*, 20(4): 399-407.

Stessman, H., Willemsen, M., Fenckova, M., Penn, O., Hoischen, A., Xiong, B., Wang, T., Hoekzema, K., Vives, L., Vogel, I., Brunner, H., van der Burgt, I., Ockeloen, C., Schuurs-Hoeijmakers, J., Klein Wassink-Ruiter, J., Stumpel, C., Stevens, S., Vles, H., Marcelis, C., van Bokhoven, H., Cantagrel, V., Colleaux, L., Nicouleau, M., Lyonnet, S., Bernier, R., Gerdts, J., Coe, B., Romano, C., Alberti, A., Grillo, L., Scuderi, C., Nordenskjöld, M., Kvarnung, M., Guo, H., Xia, K., Piton, A., Gerard, B., Genevieve, D., Delobel, B., Lehalle, D., Perrin, L., Prieur, F., Thevenon, J., Gecz, J., Shaw, M., Pfundt, R., Keren, B., Jacquette, A., Schenck, A., Eichler, E., & Kleefstra, T. (2016): Article: Disruption of POGZ Is Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders, *The American Journal Of Human Genetics*, 98: 541-552.

Sykes, N.H. (2009): Copy Number Variation and Association Analysis of SHANK3 as a Candidate Gene for Autism in the IMGSAC Collection. *European Journal of Human Genetics*, 17(10): 1347-1353.

Talkowski, M., Rosenfeld, J., Blumenthal, I., Pillalamarri, V., Chiang, C., Heilbut, A., Ernst, C., Hanscom, C., Rossin, E., Lindgren, A., Pereira, S., Ruderfer, D., Kirby, A., Ripke, S., Harris, D., Lee, J., Ha, K., Kim, H., Solomon, B., Gropman, A., Lucente, D., Sims, K., Ohsumi, T., Borowsky, M., Loranger, S., Quade, B., Lage, K., Miles, J., Wu, B., Shen, Y., Neale, B., Shaffer, L., Daly, M., Morton, C., & Gusella, J. (2012): Sequencing Chromosomal Abnormalities Reveals Neurodevelopmental Loci that Confer Risk across Diagnostic Boundaries, *Cell*, 149: 3.

- Tassone, F., Choudhary, N., Tassone, F., Durbin-Johnson, B., Hansen, R., Hertz-Picciotto, I., & Pessah, I. (2013): Identification of Expanded Alleles of the FMR1 Gene in the Childhood Autism Risks from Genes and Environment (CHARGE) Study, *Journal Of Autism & Developmental Disorders*, 43(3): 530-539.
- Terrone, G., Cappuccio, G., Esposito, A., Fiorentino, V., Riccitelli, M., Brunetti-Pierri, N., Del Giudice, E., Genesio, R., & Nitsch, L. (2014): A case of 14q11.2 microdeletion with autistic features, severe obesity and facial dysmorphisms suggestive of Wolf-Hirschhorn syndrome, *American Journal Of Medical Genetics, Part A*, 164(1): 190-193.
- Theisen, A. (2008) Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1): 45.
- Thorová, K. (2006): Poruchy autistického spektra: dětský autismus, atypický autismus, Aspergerův syndrom, dezintegrační porucha. Vyd. 1. Praha: Portál, 453 s. ISBN 8073670917.
- Tim-Aroon, T., Wattanasirichaigoon, D., Jinawath, N., Thammachote, W., Sinpitak, P., Limrungsikul, A., & Khongkhatithum, C. (2017): 1q21.3 deletion involving GATAD2B: An emerging recurrent microdeletion syndrome', *American Journal Of Medical Genetics, Part A*, 173(3): 766-770.
- Traylor, R., Bruno, D., Burgess, T., Wildin, R., Spencer, A., Ganesamoorthy, D., Amor, D., Hunter, M., Caplan, M., Rosenfeld, J., Theisen, A., Torchia, B., Shaffer, L., Ballif, B., & Slater, H. (2010): A Genotype-First Approach for the Molecular and Clinical Characterization of Uncommon De Novo Microdeletion of 20q13.33, *Plos ONE*, 5(8): 1-7.
- Van Bakel, I., Sepp, T., Ward, S., Yates, J., & Green, A. (1997): Mutations in the TSC2 gene: Analysis of the complete coding sequence using the protein truncation test (PTT), *Human Molecular Genetics*, 6(9): 1409-1414.
- Veltman, M., Craig, E., & Bolton, P. (2005): Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: A systematic review, *Psychiatric Genetics*, 15(4): 243-254.
- Vorstman, J., Staal, W., van Daalen, E., van Engeland, H., Hochstenbach, P., & Franke, L. (2006): Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism, *Molecular Psychiatry*, 11(1): 18-28.

Vorstman, J.A.S., Jalali, G.R., Rappaport, E.F., Hacker, A.M., Scott, C. and Emanuel, B.S. (2006), MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum. Mutat.*, 27: 814-821.

Wang, D., Fan, J., Siao, C., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T., Lipshutz, R., Chee, M., & Lander, E. (1998): Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome', *Science*, 5366: 1077.

Wang, Y., Miller, S., Roulston, D., Bixby, D., & Shao, L. (2016): Regular article: Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Array Analysis Improves Prognostication of Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma, *The Journal Of Molecular Diagnostics*, 18: 595-603.

Wong, A.C., Shkolny, D., Dorman, A., Willingham, D., Roe, B.A., McDermid, H.E., (1999): Two novel human RAB genes with near identical sequence each map to a telomere associated region: the subtelomeric region of 22q13.3 and the ancestral telomere band 2q13, *Genomics*, 59: 326–334.

Yi, F., Danko, T., Botelho, S. C., Patzke, C., Pak, C., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2016): Autism-Associated SHANK3 Haploinsufficiency Causes I<sub>h</sub>-Channelopathy in Human Neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6286): 2669.

Yi, Z., Pan, H., Li, L., Wu, H., Wang, S., Ma, Y., & Qi, Y. (2016): Chromosome Xq28 duplication encompassing MECP2: Clinical and molecular analysis of 16 new patients from 10 families in China, *European Journal Of Medical Genetics*, 59: 347-353.

<http://www.autismeurope.org/about-autism/prevalence-rate-of-autism/> navštíveno dne 19. 03. 2017

<http://www.autismus.cz/diagnostika/mkn-10-2.html> navštíveno dne 19. 03. 2017

<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/> navštíveno dne 19. 03. 2017

<https://decipher.sanger.ac.uk/index> navštíveno dne 19. 03. 2017

<https://gene.sfari.org/GeneDetail/MECP2#HG> navštíveno dne 19. 03. 2017

<https://gene.sfari.org/GeneDetail/UBE3A#GS> navštíveno dne 19. 03. 2017

[http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=\\_G1U3PYAOzf2SFuaxkiq4YjruAIwx3T3q8uAJJ\\_V-Ws](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_G1U3PYAOzf2SFuaxkiq4YjruAIwx3T3q8uAJJ_V-Ws). navštíveno dne 19. 03. 2017