

Ocena aberracji regionu q11-q13 chromosomu 15 oraz polimorfizmu genu kodującego podjednostkę *GABRB3* receptora GABA_A u osób z rozpoznaniem autyzmu dziecięcego i atypowego

Evaluation of q11-q13 locus of chromosome 15 aberrations and polymorphisms in the γ -aminobutyric acid receptor subunit B3 gene (*GABRB3*) in autistic patients

Agnieszka Słopeń¹, Andrzej Rajewski¹,
Bartłomiej Budny², Piotr Czernski³

¹ Z Kliniki Psychiatrii Dzieci i Młodzieży AM w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. A. Rajewski

² Z Katedry i Zakładu Genetyki Medycznej AM w Poznaniu
Kierownik: prof. AM dr hab. A. Latos-Bieleńska

³ Z Laboratorium Genetyki Psychiatrycznej Katedry Psychiatrii AM w Poznaniu
Kierownik: dr hab. J. Hauser

Summary: The aim of the study was the evaluation of chromosomal aberrations, especially locus q11-q13 of chromosome 15 and polymorphisms in the γ -aminobutyric acid receptor subunit B3 gene (*GABRB3*) and genetic aetiology of autistic disorder. We studied 20 probands (aged 4-27 years old) and their parents and siblings (73 persons). Following cytogenetic methods were used: conventional GTG-banding analysis, study of fra(X), fluorescence *in situ* hybridisation, with two specific probes: SNRPN and UBE3A/D15S10. Dinucleotide (CA)_n repeat polymorphism at the *GABRB3* gene was analysed using PCR-STR method.

Chromosomal analysis revealed paracentromere inversion –46, XX, inv(9)(p11q13) in 1 patient, but this is frequently found in population chromosomal variation. FISH didn't reveal abnormalities in 15q11-q13 region. ETDT analysis didn't reveal connection between autistic disorder and studied marker. Lack of anomalies in 15q11-q13 region may be related to small number of probands, heterogeneity of studied group and small number of studied locus and markers. So conclusions should be related only to this studied group, and not to all autistic patients.

Słowa kluczowe: autyzm dziecięcy, genetyka, chromosom 15

Key words: autistic disorder, genetics, chromosome 15

Wstęp

Mimo zainteresowania wielu klinicystów i badaczy, nadal nie można przedstawić jednolitej koncepcji etiopatogenetycznej autyzmu dziecięcego – żadna z dotychczasowych hipotez z osobna nie pozwala na pełne zrozumienie złożonych mechanizmów

powstawania, utrzymywania się i dynamiki objawów. Dlatego uważa się, że do jego rozwoju, podobnie, jak wielu zaburzeń psychicznych, może dochodzić w wyniku współdziałania kilku uwarunkowań, zarówno biologicznych, jak i pozabiologicznych.

Najwcześniej badacze zwrócili uwagę na częstsze występowanie tego schorzenia wśród chłopców, dlatego wysunięto hipotezę, że przyczyną mogłyby być mutacje w genach zlokalizowanych w chromosomie X. Dalsze badania sugerowały jednak, że musi istnieć też autosomalny sposób dziedziczenia lub występuje autosomalny region z płciowo specyficzną ekspresją, albo na chromosomie X pochodzącym od ojca są geny, które spełniają rolę ochronną w stosunku do genów autosomalnych podejrzanych o związek z autyzmem [1]. Badając rodziny osób autystycznych stwierdzono częstsze, w porównaniu z ogólną populacją, występowanie autyzmu dziecięcego wśród rodzeństwa (2%–6%) [2, 3], natomiast badania populacyjne dotyczące bliźniąt wykazały znaczącą różnicę we współwystępowaniu choroby między bliźniętami jednojajowymi i dwujajowymi (60%–90% vs poniżej 5%). Na podstawie tych danych stwierdzono, że autyzm ma najsilniejsze podłoże genetyczne ze wszystkich wieloczynnikowo uwarunkowanych zaburzeń psychicznych wieku dziecięcego [4].

Najwcześniej opisaną nieprawidłowością chromosomową występującą w autyzmie był zespół łamliwego X, fra(X), jego częstość w autyzmie nie przekracza jednak 5% [5]. Duże zainteresowanie wzbudzają też aberracje chromosomu 15, a w szczególności regionu 15(q11-q13). Autorzy donoszą o możliwości związku autyzmu dziecięcego m.in. z występowaniem dodatkowego chromosomu 15, którego fragment jest odwrócony i zduplikowany, dodatkowego chromosomu 15 z delecją regionu q11–q13 oraz chromosomu 15 z delecją lub duplikacją tego samego fragmentu [6]. Aktualnie prowadzone są wielośrodkowe badania, ale jak do tej pory nie wiadomo, jakie jest rozpowszechnienie powyższych anomalii wśród osób autystycznych, ich częstość jednak jest prawdopodobnie wyższa w porównaniu z osobami bez takiego rozpoznania [7]. Zainteresowanie nieprawidłowościami regionu q11–q13 chromosomu 15 spowodowało, że wielu badaczy zaczęło poszukiwać genów, zlokalizowanych w tym obszarze, które mogłyby odgrywać znaczącą rolę w etiopatogenezie autyzmu. Opisano polimorfizm genów dla podjednostek receptora GABA_A: *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3* w powiązaniu z autyzmem dziecięcym [8]. Nie wszystkie badania potwierdziły te doniesienia [9, 10].

Ostatnie badania wskazują także na możliwość występowania w autyzmie dziecięcym anomalii fragmentu ramienia długiego chromosomu 7, regionu zlokalizowanego blisko telomeru ramienia krótkiego chromosomu 16 [11, 12, 13, 14] oraz regionów na chromosomach 2q, 19p, a dodatkowo 4q, 5p, 6q, 10q, 18q i Xp [15]. Sugerowano także związek autyzmu z genami zaangażowanymi w rozwoju mózgu: protoonkogenem c-Harvey-ras (*HRAS*) [16], genami *HOXA1* i *HOXA11* [17, 18] oraz genem *E-2* [19].

Należy przypuszczać, że rozszerzenie wiadomości na temat genetycznego uwarunkowania autyzmu dziecięcego przyczyni się do uściślenia rozpoznania, rokowania, a także do optymalizacji postępowania terapeutycznego. Dlatego przeprowadzenie poniższych badań wydaje się uzasadnione.

Cel i założenia pracy

Celem pracy była ocena aberracji chromosomowych, dotyczących szczególnie locus q11-q13 chromosomu 15 oraz polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (CA)_n w genie kodującym podjednostkę *GABRB3* receptora GABA_A u osób z rozpoznaniem autyzmu dziecięcego i atypowego.

Przyjęto następujące założenia: 1 – w zaburzeniach autystycznych powinny występować nieprawidłowości w materiale genetycznym; 2 – nieprawidłowości spowodowane są aberracjami chromosomowymi, w szczególności dotyczącymi chromosomu 15; 3 – u części osób autystycznych obserwuje się związek choroby z polimorfizmem genu kodującego podjednostkę *GABRB3* receptora GABA_A.

Material i metody

1. Materiał

Badaną grupę stanowiło 20 pacjentów (17 z diagnozą autyzmu dziecięcego i 3 – autyzmu atypowego) oraz ich rodzice i rodzeństwo, łącznie 73 osoby. Wiek chorych wynosił od 4 do 27 lat (średnia wieku: 12,95; SD ± 6,66): wśród nich było 16 chłopców i 4 dziewczynki. Były to pojedyncze przypadki zachorowania w rodzinie. U 8 dzieci z badanej grupy pierwsze niepokojące objawy rodzice zauważyli przed 1 rokiem życia, u 11 między 1 a 3 rokiem życia, u 1 – po 3 roku życia. U 8 spośród badanych pacjentów stwierdzono opóźnienie rozwoju psychoruchowego (samodzielne siadanie: 9–10 miesiąc życia, chodzenie: 14–18 miesiąc życia). 6 pacjentów potrzeby fizjologiczne zaczęło kontrolować około 4 roku życia. 10 pacjentów w chwili badania klinicznego nie mówiło. 3 spośród badanych pacjentów, w wieku 8, 11 i 24 lat, wszyscy z rozpoznaniem autyzmu dziecięcego, posługuje się mową, przy czym nadal występują różne jej zaburzenia. Pozostałe 7 osób używa pojedynczych słów, prostych zdań oraz echolalii bezpośredniej i odroczonej, które sporadycznie służą porozumiewaniu się.

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu pochodziły z populacji polskiej. Projekt uzyskał akceptację terenowej komisji etycznej (Terenowa Komisja Etyki Badań Naukowych przy AM w Poznaniu; 975/98). Kryterium wykluczającym z badanej grupy było istnienie znanych czynników mogących wpłynąć na rozwój dziecka: stwierdzone wcześniej nieprawidłowości metaboliczne lub schorzenia uwarunkowane genetycznie (np. stwardnienie guzowate); dodatkowe choroby somatyczne, mogące wyjaśniać niepokojące objawy, m.in. padaczka występująca od wczesnego dzieciństwa, istnienie znacznego stopnia niedosłuchu lub niedowidzenia; współwystępowanie dodatkowych zaburzeń psychicznych.

2. Metodyka badań

2.A. Ocena kliniczna

Diagnozę postawiono na podstawie kryteriów DSM IV i ICD 10 oraz szczegółowego wywiadu uzyskanego od rodziców. Przeprowadzono badanie psychiatryczne i neurologiczne oraz obserwację zachowania dziecka w nowym dla niego otoczeniu (w gabinecie lekarskim), w grupie rówieśniczej oraz w środowisku domowym. Osoby z autyzmem były także konsultowane w Poradni Genetycznej przy Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

2.B. Metody cytogenetyczne

W badaniach wykorzystano: technikę prążkową GTG, badanie łamliwego chromosomu X, fra(X), fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH). Materiał do analiz uzyskiwano stosując standardowe procedury cytogenetyczne dotyczące prowadzenia hodowli komórkowych [20, 21]. W celu wykrycia fra(X) prowadzono dodatkowo hodowlę w środowisku wrażliwym (metotreksat o stężeniu 10 µg/ml hodowli).

FISH umożliwia identyfikację aberracji chromosomowych w chromosomach metafazowych i jądrach interfazowych, a jej głównym założeniem jest hybrydyzacja sondy molekularnej do komplementarnego fragmentu DNA zlokalizowanego w którymś z regionów chromosomów [22, 23]. Zastosowano dwie sondy molekularne: 1 – sondę SNRPN dla locus *SNRPN* w regionie 15q11-q13 wyznakowaną fluorochromem Cy3, 2 – sondę UBE3A dla loci *UBE3A/D15S10* w tym samym regionie wyznakowaną fluorochromem Texas Red oraz sondę kontrolną dla regionu 15qter wyznakowaną fluoresceiną. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym z odpowiednim zestawem filtrów, a uzyskany obraz został uchwycony przez kamerę CCD (charge-couple device). Obróbka komputerowa obrazu za pomocą programu „Cyto Vision ver.3.52” pozwoliła uwidocznić jednocześnie sygnały kilku sond oraz wyeliminować elementy tła mogące zakłócić interpretację wyników.

2.C. Badania molekularne

Analiza markera mikrosatelitarnego *GABRB3CA* umożliwia wytypowanie rejonu, w pobliżu którego może znajdować się gen związany z ryzykiem zachorowania. Izolację DNA z leukocytów krwi obwodowej wykonano metodą wysalania wg Millera [24]. Amplifikację sekwencji mikrosatelitarnych (CA)_n przeprowadzono metodą PCR-STR (PCR – polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy). Techniki oparte na analizie polimorfizmów STR (short tandem repeats; krótkie powtórzenia tandemowe) charakteryzują się występowaniem dużej liczby alleli oraz wysoką zmiennością w populacji. Amplifikacji poddano rejon zlokalizowanych 60 000 par zasad od końca 3' genu *GABRB3* (marker mikrosatelitarny *GABRB3CA*), używając starterów opisanych przez Mutirangurę [25]. Uzyskano produkty PCR o długości 179–199 par zasad. Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 0,1 mg genomowego DNA, 0,25 mM starterów (*GABRB3-F* i *GABRB3-R*), 0,15 mM dNTP, 1,25 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8% NP40, 0,5 U polimerazy Taq. Do analizy PCR wykorzystano termocykler PTC-100, a produkt reakcji rozdzielano elektroforetycznie na sekwenatorze AlfExpress. Analizę danych przeprowadzono za pomocą programu Fragment Analyser V1.01.

2.D. Metody statystyczne

Do analizy statystycznej wykonanych badań molekularnych zastosowano test ETDT – extended transmission/disequilibrium test for multi-allele marker loci (rozszerzony test transmisji nierównowagi skupisk wieloallelicznych markerów) [26].

Wyniki badań

Badania molekularne przeprowadzono w całej badanej grupie (73 osoby), a

badania cytogenetyczne wyłącznie u pacjentów (20 osób). W czterech rodzinach przeprowadzenie badań molekularnych obojga rodziców było niemożliwe, w dwóch przypadkach ojcowie zmarli, jedna z matek nie wyraziła zgody na badanie, a jedna nie zajmuje się wychowaniem dziecka (ojciec nie znał miejsca pobytu matki dziecka). W 10 przypadkach rodzice lub rodzeństwo nie wyraziło zgody na przeprowadzenie badania molekularnego. Dwoje spośród badanych pacjentów nie miało rodzeństwa, jeden miał brata bliźniaka (bliźnięta jednojajowe), rodzice nie wyrazili zgody na przeprowadzenie u niego badania molekularnego.

1. Wyniki badań cytogenetycznych

Pierwszym krokiem było wykonanie badania techniką prążkową GTG, następnie prowadzono hodowlę w obecności metotreksatu w celu wykluczenia zespołu łamliwego X, w dalszej kolejności przeprowadzano badanie FISH.

1.1 Wyniki badania kariotypu

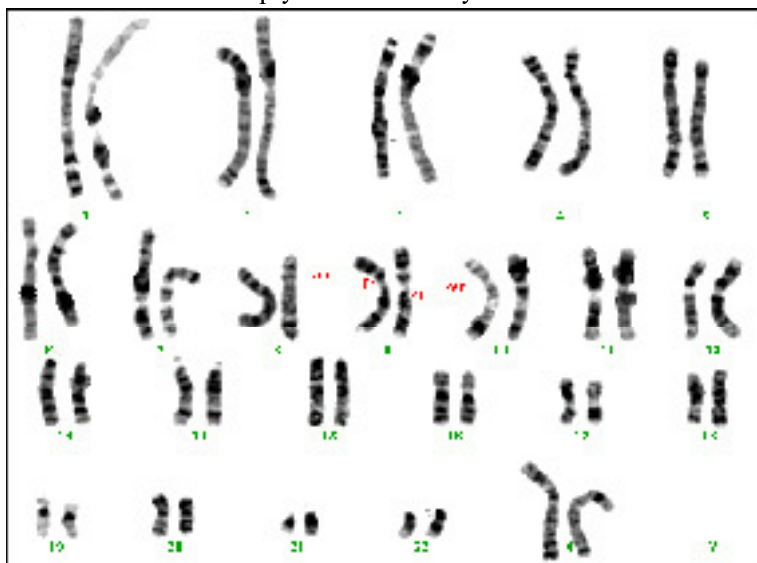
W 20 przypadkach udało się uzyskać płytki metafazalne, w każdym wypadku możliwa była klasyfikacja chromosomów (analizowano i liczono 15 płytek metafazowych).

U 14-letniej dziewczynki z rozpoznaniem autyzmu dziecięcego wykryto aberrację struktury, tj.: inwersję okołocentromerową chromosomu 9, 46, XX, inv(9)(p11q13) (rys.1 i 2).

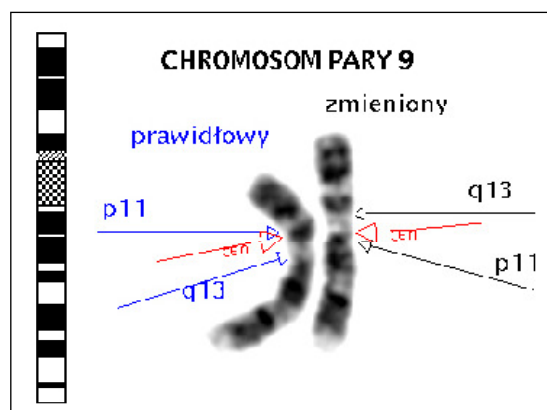
W pozostałych dziewiętnastu przypadkach wynik kariotypu był prawidłowy: dla chłopców – 46, XY, dla dziewczynek – 46, XX.

1.2. Wynik badania łamliwego chromosomu X

Analizowano od 18 do 50 płytek metafazowych w celu stwierdzenia złamań w



Rys. 1 Kariogram przedstawiający inwersję okołocentromerową inv(9)(p11q13) (strzałka) u chorej z autyzmem dziecięcym; wzór prążkowy GTG, limfocyt krwi obwodowej



Rys. 2 Inwersja okołocentromerowa chromosomu 9, $inv(9)(p11q13)$; strzałką zaznaczono fragmenty, które uległy odwróceniu

chromosomie X, w miejscu q 27.3, charakterystycznym dla zespołu łamliwego X. W 5 (25%) przypadkach nie uzyskano podziałów komórkowych w prowadzonych hodowlach. W 1 przypadku (4-letni chłopiec z diagnozą autyzmu dziecięcego) na 50 analizowanych mitozach znaleziono jedną z charakterystycznym dla zespołu łamliwego X punktem pęknięcia. U 14 (70%) chorych wyniki były prawidłowe.

1.3 Wynik badania FISH

Badania przeprowadzono u 20 pacjentów, dla każdego pacjenta po jednej próbie z każdą sondą. We wszystkich przypadkach otrzymano sygnały hybrydyzacyjne. Analizowano 15 jąder interfazowanych i płytek metafazowych. Oddzielnie badano sygnał sondy SNRPN oraz UBE3A (w tym przypadku – jednocześnie sygnał sondy badanej oraz kontrolnej).

Za pomocą badania FISH nie stwierdzono nieprawidłowości w regionie 15q11-q13. Wynik prawidłowy: dla chłopców – 46, XY.ish 15q11.2-q13 (SNRPNx2, UBE3Ax2), dla dziewczynek – 46, XX.ish 15q11.2-q13 (SNRPNx2, UBE3Ax2).

2. Wyniki badania molekularnego

Badano marker mikrosatelitarny *GABRB3(CA)* zlokalizowany w regionie 15q11-q13, przy końcu 3' genu, u 20 rodzin mających jedno chore dziecko. Uzyskano allele o wielkości 179–199 par zasad. Wyniki analizowano za pomocą testu ETDT. Do obliczeń ETDT wykorzystano genotypy rodziców oraz pacjentów (nie wykorzystano bezpośrednio genotypów rodzeństwa). W przypadku jednej rodziny znajomość genotypu rodzeństwa pacjenta umożliwiła odtworzenie brakującego genotypu jednego z rodziców (ojca). W jednym przypadku nie udało się oznaczyć genotypu rodziny, a w dwóch – rodzeństwa pacjentów, niemniej znajomość genotypów rodzeństwa nie była w tym przypadku konieczna do obliczeń, gdyż oznaczono poprawnie genotypy obojga rodziców. Jedna rodzina została wyłączona z obliczeń ze względu na to, iż obydwójce

rodzice byli homozygotami (nie byli informatywni). Dodatkowo wyłączone z obliczeń trzy rodziny, ponieważ nie wykonano oznaczenia genotypu jednego z rodziców (odpowiednio 2 matek i 1 ojca). W przypadku ojca było to niemożliwe – zmarł; matki nie wyraziły zgody na badanie. Do obliczeń ETDT włączono więc 15 rodzin, w których oznaczono poprawnie genotypy chorych dzieci oraz obojga rodziców, z których przynajmniej jedno było heterozygotą (miało 2 różne allele).

Nie obserwowano znaczącego statystycznie zaburzenia w przekazywaniu alleli badanego markera mikrosatelitarnego ($\chi^2 = 0,33$; $p=0,56$).

Tabela 1

Liczba alleli *GABRB3(CA)* przekazanych oraz nie przekazanych przez rodziców chorym dzieciom. Zastosowano następujące oznaczenia: N – liczba alleli u heterozygotycznych rodziców, T – allele przekazane (transmitted), NT – allele nie przekazane (nontransmitted)

Allel	179	181	183	185	187	189	191	193	195	197	199
N	8	6	6	2	1	2	12	4	5	6	2
T	3	3	3	1	1	1	7	2	1	4	1
NT	5	3	3	1	0	1	5	2	4	2	1

Omówienie badań

U czternastoletniej dziewczynki z rozpoznaniem autyzmu dziecięcego wykryto aberrację struktury, tj. inwersję okołocentromerową chromosomu 9; 46, XX, inv(9)(p11q13). Chociaż inwersja chromosomu 9 jest uważana za powszechną rearanżację chromosomową bez specyficznego fenotypu, to jednak ostatnie doniesienia pokazują, że występuje wiele jej form z różnymi punktami złamania. To wskazuje, że fenotyp może zmieniać się zależnie od ich lokalizacji. Opisano przypadek rodzinnego występowania schizofrenii i inwersji okołocentromerowej chromosomu 9 [27], znacznie częstsze występowanie tej wersji u chorych ze schizofrenią, w porównaniu z populacją ogólną [28], jej obecność u osób z zaburzeniami typu schizofrenii [29], chorobą afektywną dwubiegunową typu II [30], upośledzeniem umysłowym [31], męską niepłodnością. Nie znaleziono doniesień na temat występowania tej aberracji u osób autystycznych. W świetle powyższych danych (możliwości rodzinnego występowania tej aberracji chromosomowej) ważne byłoby przeprowadzenie dalszych badań u najbliższych krewnych dziewczynki.

W pozostałych dziewiętnastu (95%) przypadkach wynik kariotypu był prawidłowy. Aberracje chromosomowe, stwierdzone wyłącznie w klasycznym badaniu cytogenetycznym, opisywane są najczęściej u pojedynczych pacjentów.

W pięciu (25%) przypadkach nie uzyskano podziałów komórkowych w prowadzonych z metotreksatem hodowlach, stąd potwierdzenie lub wykluczenie zespołu łamliwego X, fra(X) wymagałoby powtórzenia procedury albo przeprowadzenia badań molekularnych. U jednego chłopca, na 50 analizowanych mitoz, znaleziono jedną z charakterystycznym dla zespołu łamliwego X punktem pęknięcia. Wyciągnię-

cie na tej podstawie wniosków co do obecności $\text{fra}(X)$ jest niemożliwe i konieczne jest wykonanie dodatkowych badań molekularnych. Fenotyp pacjenta różni się od fenotypu osób z tą aberracją chromosomową, jednak charakterystyczne cechy pojawiają się często dopiero w okresie przedszkolnym lub szkolnym. U pozostałych 14 (70%) pacjentów nie stwierdzono złamań charakterystycznych dla zespołu łamliwego X, $\text{fra}(X)$.

Badania regionu 15q11-q13, za pomocą badania FISH, przeprowadzono u wszystkich pacjentów, przy czym dla każdej osoby wykonano po jednej próbie z każdą sondą. We wszystkich przypadkach otrzymano sygnały hybrydyzacyjne. Nie stwierdzono nieprawidłowości w badanym regionie. Wyniki te są sprzeczne z doniesieniami wielu autorów, którzy opisywali m.in. dodatkowy marker chromosomu 15 z inwersją i duplikacją w tym rejonie, dodatkowy marker z duplikacją omawianego locus, delecję lub duplikację badanego regionu [32, 33, 34]. Nadal nie jest jednak znana częstość występowania wymienionych aberracji chromosomowych, dlatego należy przypuszczać, że rozszerzenie badanej grupy mogłoby się przyczynić do ich stwierdzenia.

U wszystkich pacjentów oraz ich rodziców i rodzeństwa badano marker mikrosatelitarny *GABRB3(CA)* zlokalizowany w regionie 15q11-q13. Do obliczeń ETDT wykorzystano genotypy rodziców oraz pacjentów. Do obliczeń ETDT włączono 15 rodzin, w których oznaczono poprawnie genotypy chorych dzieci oraz obojga rodziców, z których przynajmniej jedno było heterozygotą (miało 2 różne allele). Nie znaleziono istotnych dowodów na związek zaburzeń autystycznych z badanym markerem mikrosatelitarnym. Pokazuje to, że jest mało prawdopodobne, aby gen *GABRB3* odgrywał większą rolę w ich etiologii w badanej grupie. Jest to zgodne z niektórymi doniesieniami, wykonanymi wśród większej populacji pacjentów i ich rodziców, które wskazują również na brak związku z innymi markerami zlokalizowanymi w regionie 15q11-q13 [9, 10], jest natomiast sprzeczne z innymi badaniami, które zwracają uwagę na powiązanie autyzmu z badanym markerem *GABRB3(CA)* lub innymi zlokalizowanymi w tym samym regionie [35]. Odmiennie wyniki mogą być związane z liczebnością badanych grup, włączania do badań rodzin tylko z jednym lub kilkoma chorymi dziećmi, być może również ze stosowaniem różnych metod statystycznych, a także niejednorodnością samej populacji osób z autyzmem dziecięcym.

Krótkie powtórzenia tandemowe, tzw. mikrosatelity, są rozpowszechnione w genomie człowieka i charakteryzują się znacznym polimorfizmem. Zlokalizowane są zwykle w nie kodujących fragmentach genów, włączając w to introny oraz regiony nie ulegające translacji [36]. Chociaż ich znaczenie funkcjonalne nadal nie jest poznane, niektórzy badacze wskazują, że mogą one odgrywać rolę np. w regulacji transkrypcji genu. Aktualnie nie znaleziono takiego związku dla badanego markera mikrosatelitarnego *GABRB3(CA)*.

Przeprowadzone badania, z zastosowaniem wybranych metod cytogenetycznych i molekularnych, nie wykazały nieprawidłowości w regionie 15q11-q13. Może to wynikać zarówno z niejednorodności badanej grupy osób z autyzmem (m.in. różne nasilenie objawów klinicznych oraz rozpoznanie), jej liczebności, jak i z ograniczonej liczby badanych miejsc oraz markerów zlokalizowanych w tym regionie. Dlatego

3. Fombonne E, Bolton P, Prior J, Jordan H, Rutter M. *A family study of autism: cognitive patterns and levels of parents and siblings*. J. Child Psychol. Psychiatry 1997; 38: 667–683.
4. Rutter M, Silberg J, O'Connor T, Simonoff E. *Genetic and child psychiatry: II empirical research findings*. J. Child Psychol. Psychiatry 1999; 40(1): 19–55.
5. Fisch G. *Is autism associated with the fragile X syndrome?* Am. J. Med. Genet. 1992; 43 (1–2): 47–55.
6. Schroer R, Phelan M, Michaelis R, Crawford E, Skinner S, Cuccaro M, Simensen R, Bishop J, Skinner C, Fender D, Stevenson R. *Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q*. Am. J. Med. Genet. 1998; 76: 327–336.
7. Maddox LO, Menold MM, Bass MP, Rogala AR, Pericak Vance MA, Vance JM, Gilbert JR. *Autistic disorder and chromosome 15q11-q13: construction and analysis of a BAC/PAC contig* Genomics 1999; 62(3): 325–331.
8. Cook EH jr, Courchesne RY, Cox NJ, Lord C, Gonen D, Guter SJ, Lincoln A, Nix K, Leventhal BL, Courchesne E. *Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers*. Am. J. Hum. Genet. 1998; 62(5): 1077–1083.
9. Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, Cook EH, Weeks DE, Monaco AP. *Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families*. The International Molecular Genetic Study of Autism. Am. J. Med. Genet. 1999; 88(5): 492–496.
10. Salm on B, Hallmayer J, Rogers T, Kalaydjieva L, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, McMahon W, Spiker D, Lotspeich L, Kraemer H, McCague P, Dimiceli S, Nouri N, Pitts T, Yang J, Hinds D, Myers RM, Risch N. *Absence of linkage and linkage disequilibrium to chromosome 15q11-q13 markers in 139 multiplex families with autism* Am. J. Med. Genet. 1999; 88(5): 551–556.
11. Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J. *An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism*. Am. J. Med. Genet. 1999; 88(6): 609–615.
12. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium *A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q*. Hum. Mol. Genet. 1998; 7(3): 571–578.
13. Vincent JB, Herbrick J, Gurling H, Bolton PF, Roberts W, Scherer SW. *Identification of a novel gene on chromosome 7q31 that is interrupted by a translocation breakpoint in an autistic individual*. Am. J. Hum. Genet. 2000; 67: 510–514.
14. Warburton P, Baird G, Chen W, Morris K, Jacobs BW, Hodgson S, Docherty Z. *Support for linkage of autism and specific language impairment to 7q3 from two chromosome rearrangements involving band 7q31*. Am. J. Med. Genet. 2000; 96: 228–234.
15. Philippe A, Martinez M, Guilloud Bataille M, Gillberg C, Råstam M, Sponheim E, Coleman M, Zappella M, Aschauer H, van Maldergerme L, Penet C, Feingold J, Brice A, Leboyer M. *Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study*. Hum. Mol. Genet. 1999; 8(5): 805–812.
16. Hérault J, Petit E, Martineau J, Perrot A., Lenoir P, Cherpi C, Barthélémy C, Sauvage D, Mallet J, Müh JP. *Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of HRAS gene*. Am. J. Med. Genet. 1995; 60(4): 276–281.
17. Ingram JL, Stodgell CJ, Hyman SL, Figlewicz DA, Weitkamp LR, Rodier PM. *Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders*. Teratol. 2000; 62(6): 393–405.
18. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. *Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei*. J. Comp. Neurol. 1996; 370: 247–261.
19. Petit E, Hérault J, Martineau J, Perrot A, Barthélémy C, Hameury L, Sauvage D, Lelord G, Müh

- JP. *Association study with two markers of a human homegene in infantile autism* J. Med. Genet. 1995; 32: 269–274
20. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 3rd ed. Philadelphia; 1997.
 21. Rooney DE, Czepulowski BH. *Human cytogenetics: a practical approach*. Oxford: IRL Press; 1986.
 22. Bal J. *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Warszawa: Springer–PZWL; 1998.
 23. Connor JM, Ferguson-Smith MA. *Podstawy genetyki medycznej*, wyd. 1 polskie. Warszawa: Springer–PZWL; 1999.
 24. Miller SA, Dykes D, Plesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucl. Acids Res. 1988; 16 (3): 1215.
 25. Mutirangura A, Ledbetter SA, Kuwano A, Chinault AC, Ledbetter DH. *Dinucleotide repeat polymorphism at the GABA_A receptor β 3 (GABRB3) locus in the Angelman/Prader – Willi region (AS/PWS) of chromosome 15*. Hum. Mol. Genet. 1992; 1(1): 67.
 26. Sham PC, Curtis D. *An extended transmission disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci*. Ann. Hum. Genet. 1995; 59: 323–336.
 27. Lee KB, Kunugi H, Nanko S. *Familial schizophrrenia with pericentric inversion of chromosome 9: case report*. Schizophr. Res. 1998; 32(2): 123–126.
 28. Kunugi H, Lee KB, Nanko S. *Cytogenetic findings in 250 schizophrrenics: evidence confirming an excess of the X chromosome aneuploidies and pericentric inversion of chromosome 9* Schizophr. Res. 1999; 40(1): 43–47.
 29. Miyaoka T, Seno H, Itoga M, Ishino H. *A case of small cerebral cyst and pericentric inversion of chromosome 9 that developed schizophrrenia-like psychosis*. Psychiatry Clin. Neurosci. 1999; 53(5): 599–602.
 30. McCandless F, Jones I, Harper K, Craddock N. *Intrafamilial association of pericentric inversion of chromosome 9, inv(9)(p11-q21), and rapid cycling bipolar disorder*. Psychiatr. Genet. 1998; 8(4): 259–262.
 31. Cora T, Demirel S, Acar A. *Chromosomal abnormalities in mentally retarded children in the Konya region-Turkey*. Genet. Couns. 2000; 11(1): 53–55.
 32. Cook EH jr, Lindgren V, Laventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. *Autism and atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication* Am. J. Hum. Genet. 1997; 60: 928–934.
 33. Flejter WL, Bennett-Baker PE, Ghaziuddin M, McDonald M, Sheldon S, Gorski JL. *Cytogenetic and molecular analysis of inv dup(15) chromosomes observed in two patients with autistic disorder and mental retardation*. Am. J. Med. Genet. 1996; 61(2): 182–187.
 34. Martinsson T, Johannesson T, Vujic M, Sjöstedt A, Steffenburg S, Gillberg C, Wahlström J. *Maternal origin of inv dup(15) chromosomes in infantile autism*. Eur. Child Adolesc. Psychiatry 1996; 5: 185–192.
 35. Martin ER, Menold MM, Wolpert CM, Bass MP, Donnelly SL, Ravan SA, Zimmerman A, Gilbert JR, Vance JM, Maddox LO, Wright HH, Abramson RK, DeLong HR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. *Analysis of linkage disequilibrium in α -aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder*. Am. J. Med. Genet. 2000; 96: 43–48.
 36. Wei J, Ramchand CN, Hemmings GP. *Possible control of dopamine b-hydroxylase via a co-dominant mechanism associated with the polymorphic (GT)_n repeat at its gene locus in healthy individuals*. Hum. Genet. 1997; 99: 52–55.

Otrzymano: 8.01.2002

Zrecenzowano: 21.02.2002
Przyjęto do druku: 27.08.2002

Adres: Klinika Psychiatrii Dzieci i Młodzieży
60-572 Poznań, ul. Szpitalna 27/33
Tel. +48 61 849 13 58; Fax. +48 61 848 03

92

