

# Az autizmus spektrum zavar genetikai hátterének vizsgálata egy magyar betegpopulációban

Doktori értekezés

**Dr. Varga Noémi Ágnes**

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Vellainé Dr. Takács Krisztina, PhD, egyetemi docens  
Dr. Szuromi Bálint, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Farkas Viktor, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sipos Ildikó, PhD, egyetemi docens

Dr. Liptai Zoltán, PhD, főorvos

Budapest

2020

## Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke.....	3
2	Bevezetés (irodalmi háttér) .....	5
2.1	Az ASD definíciója:.....	5
2.2	Az ASD tünettana: .....	6
2.3	Az ASD etiológiája.....	10
2.3.1	Monogénes vs polygénés etiológia.....	11
2.3.2	Monogénes formák: .....	11
2.3.3	A poligénés formák: .....	13
2.3.4	Epigenetikai tényezők – imprintált gének az ASD háttérében .....	43
2.4	A mitochondriális diszfunkció szerepe az ASD háttérében:.....	43
2.5	A genetikai diagnosztika szerepe a klinikai gyakorlatban .....	45
3	Célkitűzések: .....	46
4	Betegek és Módszer .....	47
4.1	Betegek: .....	47
4.1.1	Beválasztási kritériumok: .....	47
4.1.2	Kontroll egyének: .....	47
4.2	Neurológiai és belgyógyászati vizsgálat.....	49
4.3	A gépi tanulási módszertan az ASD kutatásban .....	50
4.4	Genetikai vizsgálatok.....	51
4.5	Bioinformatikai elemzés .....	52
4.5.1	Variáns prioritizálás, értékelés: .....	52
4.6	Statisztikai elemzés.....	53
5	Eredmények.....	56
5.1	A kohorsz demográfiai és fenotípus elemzése.....	56
5.2	Szindrómás formák: .....	61
5.2.1	Fargilis-X-szindrómás eseteink: .....	64
5.2.2	Egyéb monogénes háttérű ASD eseteink: .....	65
5.3	A ritka variánsok elemzése kohorsz szinten .....	73

5.3.1	A ritka variáns terheltség és az ASD súlyosságának korrelációja.....	76
5.4	Klaszteranalízis és a gének dúsulása a különböző fenotípus klaszterekben .....	78
5.5	Az ASD és mitochondriális dysfunkció korrelációja.....	81
6	Megbeszélés .....	89
6.1	A magyar ASD kohorsz viszonyulása a nemzetközi kutatási eredményekhez.....	89
6.1	A genetikai diagnózis jelentősége saját tapasztalatink alapján.....	90
6.2	A kohorsz szinten detektált ritka variánsok jelentősége .....	97
6.3	A fenotípus klaszter képzés jelentősége .....	99
6.4	A mitochondriális DNS érintettségének jelentősége ASD-ben .....	101
6.5	Átfedések más neurodevelopmentalis betegségekkel .....	104
7	Következtetések .....	109
8	Összefoglalás.....	111
9	Summary .....	112
10	Irodalomjegyzék .....	113
11	Saját publikációk jegyzéke .....	149
11.1	A disszertációhoz kapcsolódó publikációk .....	149
11.2	A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk .....	149
12	Köszönetnyilvánítás .....	150

## 1 Rövidítések jegyzéke

AAA	Diverz sejtfuncióval rendelkező ATPázok
aCGH	Komparatív genom hibridizációs array
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	Autoszomális domináns öröklésment
ADHD	Figyelemhiányos hiperaktivitás zavar (Attention deficit hyperactivity disorder)
ADI-R	Autism Diagnostic Interview-Revised
ADLTE	Autoszomális domináns laterális temporalislebeny epilepszia
ADOS	Autism Diagnostic Observation Schedule
AFD	Arcdiszmorfiával rendelkező ASD
ANFD	Arcdiszmorfiával nem rendelkező ASD
AOA4	Ataxia oculomotor apraxia 4 típusa
ASD	Autizmus spektrum zavar
BD	Bipoláris zavar
BERA	Agytörzsi kiváltott válasz audiometria (Brainstem Evoked Response Audiometry)
BNO	Betegségek nemzetközi osztályozása
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
C-ASD	Kontrollként használt non-mtdel-ASD csoport tagjai
C-H	Egészséges kontrollok
CHARGE	coloboma, heart defects, atresia choanea, growth retardation, genital abnormalities, ear abnormalities syndrome
CI	Konfidencia intervallum
CK	Creatinin kináz
CNV	Kópiaszám variáció (copynumber variation)
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EEG	Elektroencephalográfia
EIEE	Korai csecsemőkori epilepsziás encephalopathia (early infantile epileptic encephalopathy)
EMG	Elektromyográfia
ENG	Elektroenceurografía
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FS	Apai oldali felmenők (Father's side relative)
FXS	Fragilis-X-szindróma
GERD	Gastro-eosophageális reflux betegség
GERP	Genomic Evolutionary Rate Profiling
GWAS	Genome wide association study
HEMI	Hemizigóta mutáció
HET	Heterozigóta mutáció
HGMD	Human Gene Mutation Database

HOM	Homozigóta mutáció
HSP	Hereditær Spasticus Paraparesis
IKZ	Intellektuális képesség zavar
KIR	Központi idegrendszer
KO	Knock-out
LP	Likely pathogenic (valószínűleg patogén)
MAF	Minor allélfrekvencia
MDC	Mitochondrial Disease Criteria
MLPA	Multiplex ligációs próba amplifikáció
MPA	Minor fizikális anomáliák
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás
MS	Anyai oldali felmenők (Mother's side relative)
mtDNS	Mitochondriális DNS
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NGS	Újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)
OCA2	Oculocutan albinizmus 2
OCD	Obszesszív-kompulzív zavar
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Esélyhányados (Odds ratio)
OXPPOS	Oxidatív foszforiláció
PCR	Polimeráz láncreakció
PI3K/AKT	Foszfatidilinozitol 3-kináz/B protein kináz útvonal
PD	Parkinson kór
PM	ASD beteg mtDNS delécióval (Patient - mitochondrial)
PPH2	Polyphen 2 HViD 2
PSD	Posztszinaptikus denzitás (Postsynaptic density)
RhoA	Ras homolog family member A
RNS	Ribonukleinsav
RVIS	Residual variation intolerance score
SH	Src Homology
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
SORVA	Significance of rare variants
TSC	Tuberous Sclerosis
VEP	Vizuális kiváltott válasz
VUS	Variant of Unknown Significance
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
XL	X-hez kötött öröklődésment

## 2 Bevezetés (irodalmi háttér)

Az autizmus spektrum zavar (*Autism Spectrum Disorder*, ASD) prevalenciája az utóbbi 50 évben jelentősen növekedett, a századforduló előtt még ritka betegségnek számító tünetcsoport, ma már a populáció több mint 1%-át érinti [1]. A diagnosztizált betegek számának növekedését az érzékenyebb diagnosztikus kritériumok, a fokozott diagnosztikus éberség és a tünetcsoport pontosabb felismerése is magyarázza. Az egyre korábbi diagnózis mellett az is hozzájárul a prevalencia látszólagos növekedéséhez hogy a magasan funkcionáló ASD-vel élők is a spektrumba sorolódnak [2].

### 2.1 Az ASD definíciója:

Az autizmus kifejezés Eugen Bleuler svájci pszichiátertől származik, aki szkizofrén betegek önmagukba forduló viselkedését illetve ezzel a kifejezéssel. Leo Kanner 8 fiú és 3 lány esetében írt le egy mentális retardációtól elkülönülő, szociális izolációval járó tünetegyüttest 1943-ban, melyet infantilis autizmusnak nevezett el, utalva ezzel az állapot születéstől való fennállására [3]. Ekkor a betegségnek a prevalenciáját 2-5/10 000 becsülték. A vizsgált családok 2-3%-ban volt jelen egynél több érintett gyermek [4].

Ma az ASD definíció szerint, egy olyan élethosszig tartó állapot mely születéstől fogva fennáll és az idegrendszer fejlődési zavarának tekinthető. Korábbi felfogás szerint három viselkedési terület zavarának együttes fennállása hozza létre a spektrumot. A klasszikus triászt a reciprok szociális interakciók, a kommunikáció minőségi eltérései, és a sztereotip, repetitív elemeket tartalmazó, beszűkült érdeklődési kör és viselkedés alkotta [2]. A mentális rendellenességek diagnosztikai és statisztikai kézikönyve (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*, DSM V) szerint, a besorolás két kardinális funkció minőségi zavarával határozható meg. Ezek a társas kapcsolatokban és kommunikációban tartósan fennálló elmaradás, illetve a szűk körű, sztereotip, repetitív érdeklődési és cselekvési mintázatok [5]. A diagnózis teljes mértékben a klinikai képen alapszik, mely bár születéstől fogva fennáll, az élet előrehaladtával változhat, a legjellegzetesebb periódus a 4-5 éves korra tehető [6]. Mivel a tünetek megjelenési formája és súlyossága egyénenként jelentősen

különbözik, spektrum zavarnak tekintjük. Az új irányelv nem csak tüneti szempontból változtatott az állapot besorolásán, hanem a korábbi öt alcsoport egységes esernyő elvét is megbontotta. Míg a DSM IV. szerint, a pervazív fejlődési zavarok közé tartozott a Rett-szindróma is, az Asperger-szindróma, a gyermekkori dezintegratív zavar, az autizmus és a máshová nem besorolható pervazív zavar mellett, addig jelenleg DSM V. szerint, a Rett-szindróma már nem tartozik az ASD csoportba [5].

Magyarországon a DSM-beli változásoktól függetlenül, a betegségek nemzetközi osztályozására szolgáló kódrendszert (BNO) használjuk, mely nyolc altípust különböztet meg. Ezek a gyermekkori autizmus (melyet leírójáról Kanneri autizmusnak is neveznek), atípusos autizmus, Rett- és Asperger-szindróma, egyéb gyermekkori dezintegratív zavar, túlzott aktivitás mentális retardációval és sztereotip mozgászavarral, egyéb pervazív fejlődési zavar és nem meghatározott pervazív fejlődési zavar [7].

## **2.2 Az ASD tünettana:**

Bár a diagnosztikus kritériumok kellő segítséget nyújtanak a betegcsoport megfelelő körvonalazásához, az ASD-vel diagnosztizáltak tüneti és súlyossági szempontból is lényegesen különböznek egymástól. A diagnózishoz szükséges két fő terület károsodásának megállapításához a DSM V. további alkritériumok megjelölésével könnyíti a diagnózist. Ezeket az 1. Táblázat foglalja össze (**1. Táblázat**).

<b>1. Táblázat:</b> A DSM V. szerinti ASD kritériumok, melyek az állapot legjellemzőbb ismérveit foglalják össze.	
Társas kapcsolatokban és kommunikációban tartósan fennálló elmaradás észlelhető a	Kölcsönösségen alapuló verbális és non-verbális kapcsolatteremtésben, érzelmek megosztásának képességében, metakommunikáció értelmezésében
	Gesztusok, szemkontaktus és testbeszéd megértésében és alkalmazásában
	Kapcsolatok kialakításának, fenntartásának, megértésének képességében, ide sorolva a képzeleti játékok megjelenését és a szituációs feladatok megértését
Beszűkült érdeklődési kör, sztereotip, repetitív érdeklődési és cselekvési mintázatok észlelése (minimum 2)	Tárgyak, vagy beszéd használatában megnyilvánuló sztereotípiák (echolália, idioszinkráziás frázisok), repetitív motoros manírok
	Rituális cselekvési minták, rutinokhoz való ragaszkodás
	Beszűkült, nagyon speciális, extrémén fókuszált érdeklődési kör
	Kóros szenzoros érzékelés (hyper- vagy hypoaktivitás különböző érzékszervi ingerekre).

E két terület károsodása elégséges a diagnózis felállításához, mégis ezek ritkán fordulnak elő izoláltan. Az új diagnosztikus kritérium rendszer egyik legfőbb hiányossága, hogy az egyszerűsége miatt rosszul tükrözi az ASD jelentős fenotípusvariabilitását a klinikai diagnosztikában. A fenotípus pontosabb körvonalazása érdekében a gyakori társdiagnózisok tünettanát is vizsgálni kell, mint az intellektuális képességzavar (IKZ), a figyelemhiányos-hiperaktivitás zavar (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD), epilepszia vagy az alvászavar [8].

A széles fenotípus variabilitás miatt jelenleg az ASD diagnózis felállításához az Autizmus Diagnosztikus Interjú (Autism Diagnostic Interview – Revised, ADI-R), illetve az ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) standardizált tesztek alkalmazása javasolt gold-standard metodikaként [9]. ADOS pontszám alapján az ASD diagnózisa időbeni stabilitást mutat és egy életre szóló állapot [10].

Mivel az ASD nem egy statikus, hanem egy dinamikusan változó állapot, a kezdeti tünetek súlyosságából nem lehet következtetni az állapot súlyosságára. A sztereotip viselkedésformák, súlyosabb kényszercselekvésekké alakulhatnak át, de előfordulhat, hogy a szemkontaktus kezdeti hiánya, fejlesztés hatására, ismét visszajön. A beszédképesség területén is jelentős különbségek fordulnak elő ASD-vel élők között, a mutizmus, a



kommunikációs céllal alkalmazott beszéd teljes hiányán keresztül, az agrammatizmusig vagy különösen választékos és gazdag szókincsű nyelvhasználatig bármi előfordulhat [11]. A tünetek általában már kora gyermekkortól jelen vannak, viszont az esetek kb. 30%-ban a regresszió az első tünet ami a problémára utal [12].

Az állapot súlyosságát gyakran nem is a főbb ASD specifikus tünetek, hanem a társtünetek súlyossága határozza meg, mint a megkésett beszédfejlődés vagy kognitív diszfunkció [13]. Az ASD-vel élők leggyakoribb társhiagnózisa az intellektuális képesség zavar (IKZ), ez 38%-ban fordul elő [14], illetve az epilepszia, vagy ennek enyhébb formája, mikor csak EEG eltérés van jelen (kb 25%-ban fordul elő ASD-vel élők körében) [12]. Alvászavart, illetve gasztrointesztinális eltéréseket 60%-ban, illetve 45%-ban jeleztek [12]. Az ADHD a szülők bevallása szerint az ASD-vel élők több mint 60%-ban van jelen [15]. Gyakran más pszichiátriai tünetek is társulhatnak ASD-vel, mint az anxietás, depresszió vagy irritabilitás. Auto- és heteroagresszió az esetek 25%-ban manifesztálódik az élet valamely szakaszában, melyek minor-időszakos epizódoktól, súlyos, akár kifejezetten ön és közveszélyes tünetek megnyilvánulásához vezet [6]. A kifejezett autoagresszív viselkedés, mely öncsonkítási kényszerbe léphet át egy ritka monogénes formában jellegzetes, a Lesch-Nyhan-szindrómában [16].

ASD specifikus tünetek feltérképezése és a lehetséges társbetegségek tüneti feltérképezése mellett, fontos szerepe van a minor fizikális anomáliák (Minor physical anomalies, MPA) jelenlétének. Minor fizikális anomáliának nevezzük azokat a morfológiai elváltozásokat, melyek sem jelentős kozmetikai, sem egészségügyi terhet nem jelentenek hordozóik számára, többszörös jelenlétük azonban a központi idegrendszer (KIR) fejlődési zavarára utal, mivel mind a KIR, mind a kültakaró ektodermális eredetű [17]. Tágabb értelemben az MPA-t a diszmorf jegyek, kongenitális minor anomáliák szinonimájaként használjuk, szűkebb értelemben, viszont olyan, mindig kóros, eltéréseket jelentenek, melyek a terhesség első trimeszterében az organogenesis során alakultak ki. Bár a nemzetközi irodalomban a MPA-k feltérképezésére többnyire a Waldrop-skálát használják, Magyarországon a minor malformációk és fenogenetikai variánsok között különbséget tevő Méhes skálát szoktuk használni [17]. A Waldrop-skála összesen 19 jegyet tartalmaz, felvételéhez olyan mérésekre van szükség, melyek az ASD-vel élőket nyugtalanná tehetik (pl. intercanthális távolság ).

Az MPA-k gyakrabban fordulnak elő különböző idegrendszeri betegségekben [18], így ASD-vel élők között is. Ennek oka egyelőre kérdéses. Felmerül a kérdés, hogy az MPA-k emelkedett száma genetikai eredetű-e, ha igen, akkor a normál populációtól eltérő magasabb frekvenciájuk, nem egy ASD szubpopulációt jellemez-e, mintsem az egész kohorszt. Miles és mtsai. szerint tüneti szempontból elkülöníthetünk komplex és esszenciális ASD formákat [19]. Komplex esetről akkor beszélünk, ha az ASD specifikus tünetek mellett, generalizált diszmorfia is észlelhető, míg esszenciális ASD esetén ezek nem jellemzőek. Ilyen felosztás mellett észlelhető, hogy a komplex forma kedvezőtlenebb prognózissal rendelkezik, a fiú-lány arány alacsonyabb, viszont a családon belüli halmozódás, illetve a felmenők közötti ASD specifikus tünetek inkább az esszenciális típusra jellemzőek [12]. Tehát a két csoport esetén különböző genetikai tényezők állhatnak a tünetek hátterében, a komplex ASD formák esetén, erős hatású, de novo variánsok, míg esszenciális formák esetében genetikai hajlamosító tényezők jelenléte feltételezhető, melyek hozzájárulnak a családon belül halmozódó pszichiátriai tünetekhez is, az ASD-ért pedig kumulált hatásuk tehető felelőssé [12]. Az ASD négyszer gyakrabban fordul elő fiúkban, viszont az arány kiegyenlítettebbé válik különböző társtünetek megjelenése esetén. Olyan gyermekek esetén, akinél az ASD mellett IQ csökkenés is észlelhető a nemek közötti eloszlás 2:1, míg dysmorph tünetek jelenléte esetén, szindrómás autizmus formákban 1:1 [20]. Végül, de nem utolsósorban felmerül, hogy bizonyos minor malformációk kapcsolnak-e ASD specifikus viselkedéssjegyekhez, és ha igen, ezek alapján meghatározható-e bizonyos endofenotípusok jelenléte?

Endofenotípusnak nevezzük azokat a fontosabb személyiség- vagy dysmorph jegyeket melyek egy csoporton belül egy alcsoportot jellemeznek, genetikailag determináltak. Az endofenotípusok meghatározása közelebb vihet olyan komplex genetikai hátterű állapot megértéséhez mint az ASD, mivel ebben az esetben nem a komplex klinikai heterogenitás hátterében álló „egyetlen” génhibát próbáljuk azonosítani, hanem egy-egy olyan markáns tünet jelenléteért felelős genetikai eltérést/jelátviteli útvonalat, mely a fenotípusjegyet magyarázza [21]. Az endofenotípusnak megfeleltethető markáns jegyek feltérképezéséhez szükséges a probandon túl a családtagok részletes vizsgálata is a szélesebb ASD fenotípusos

jegyek tekintetében. ASD esetében a felmenők között ilyenek a depresszió, szorongás, ethylismus, megkésett beszédfejlődés, fóbiák, kényszerbetegség [22][23][24][25].

### 2.3 Az ASD etiológiája

Az ASD etiológiájával kapcsolatosan kezdetben több tévhit látott napvilágot, mely a szülői felelősséget helyezte előtérbe. Az első ikervizsgálatok azonban rámutattak az állapot nem-Mendeli öröklődéshez köthető genetikai hátterére [26]. A dizigóta ikerpárok konkordancia arányánál (0%-30%) sokkal magasabb, monozigóta ikerpárok konkordancia hányadosa (60-90%), ami azt valószínűsíti, hogy nem a születéskor vagy prenatálisan elszenvedett okok állhatnak az ASD hátterében [26]. Az ASD heritabilitását 64-91%-ra becsülik [27], ismétlődési valószínűsége testvérek esetén 3-10% közötti, 8,6% anyai féltestvér, 6,8% apai féltestvér, 2,6% unokatestvér esetén, mely a normális populációhoz képest 10,3; 3,3; 2,9 relatív ismétlődési arány növekedést jelent [28]. Kialakulásában a környezeti hatások közül inkább az egyéni, ikerpárok között nem osztott faktorok játszanak, a genetikához hasonló jelentőségű szerepet az ASD kialakulásában [28].

A gyakori és ritka variánsok egyaránt szerepet játszanak ASD kialakulásában. Az ASD-vel összefüggésben leírt genetikai elváltozások között kromoszóma rendellenességek, kópiaszám elváltozások (Copy Number Variation, CNV), szekvencia eltérések is kimutathatóak. Ezek méretbeli különbségei miatt különböző vizsgálati metodikákra lehet szükség a genetikai háttér megállapításához. A különböző genetikai elváltozás típusok kimutatására használt metodikákat és ezek mérethatárait, az ASD klinikai diagnosztikában betöltött szerepét a **2. Táblázat** foglalja össze.

<b>2. Táblázat:</b> Az ASD etiológiájának tisztázására alkalmazott módszerek és azok sikerrátái [29][30]. A nagyáteresztő képességű genetikai tesztek hatékonyságát a kiinduló adatmennyiség (duo, trio), az adatfeldolgozó metodikák és a variáns prioritizáló módszerek nagymértékben befolyásolják.			
Vizsgálati módszer	Elváltozás típusa (mérete)	Példák (ASD incidenciája)	Diagnosztikus ráta
Kariotípus vizsgálat	Kromoszómák strukturális elváltozásai (>5 Mb)	Down sz. (50 %) Turner sz. (12 %)	3%

		Klinefelter sz. (10 %)	
Microarray vizsgálat	CNV, microdeléciók, microduplikációk (>15 kb)	DiGeorge 22q11.2 (30 %) Williams 7q11.23 (6-10 %) Prader-Willi 15q11.2-q13 (19 %)	10%
Egyes gén vizsgálatok	SNP/CNV (>1bp)	FMR1 (>45%) MECP2 (>50%)	1-5% 4%
Targetált gén panel	SNP, indel		10-15%
WES	SNP, indel, CNV	Kandidáns gének	10-15%
WGS	SNP, indel, CNV, nem kódoló régiók	Kandidáns gének	N/A

### 2.3.1 Monogénes vs polygénes etiológia

Genetikai szempontból háttere nagyon heterogén, talán a legtöbb egészségügyi nyereséget hozó megközelítés a monogénes és polygénes formák elkülönítése. Ebben az esetben két csoport elkülöníthető, az egyik a szindrómás, illetve monogénes ASD csoport, a másik esszenciális vagy nem-szindrómás csoport, melyet polygénes multifaktoriális eredetűnek tartanak [31] [12]. A nagy áteresztőképességű paralel szekvenálási technikák alkalmazása óta a páciensek kisebb részében a kialakult tünetek egyedüli, súlyosan funkció károsító mutáció jelenlétére visszavezethetőek, nagyobb részben viszont (17%-60%) több, alacsony rizikójú, hajlamosító allél jelenlétével magyarázzák a tünetek létrejöttét [32][33][34].

### 2.3.2 Monogénes formák:

A monogénes ASD formák között megkülönböztethetünk szindrómás ASD formákat, illetve olyan monogénes ASD formákat, melyeknél bizonyított egy-egy gén idegrendszer károsító major szerepe, de ASD-n kívüli típusos, replikálódó fenotípusos jegy nem társul [35]. A klasszikus szindrómás ASD formák között szerepel a Fragilis-X-szindróma, Down-kór, Rett-szindróma, a Neurofibromatosis és a Sclerosis Tuberosa. Ezen szindrómák esetében a klinikai kép általában egyértelműen jelzi a genetikai hátteret, a szindrómával élők bizonyos hányadában az ASD, mint társuló neuropszichiátriai fenotípus kapcsolható [36].

A Fragilis X szindróma (FXS) genetikai háttere 1969 óta ismert. Felfedezése óta az FMR1 gén promóter régiójában lévő változó CGG repeatet tartalmazó eltérés több klinikai aspektusa is ismert [37]. Az IKZ-val diagnosztizált fiúkban az FXS a leggyakoribb genetikai eltérés a Down-szindróma után. ASD-vel élők között 2%-ra tehető a prevalenciája [37], ezért a szindrómára specifikus tünetek hiányában is javasolt a szűrése az ASD populációban [36]. Patomechanizmusát illetően a CGG full mutációs spektrumba eső repeat expanziója a DNS szakasz hypermethilációja miatt csökkent a transzkripció mértéke, ezáltal csökkent az FMRP szintézise. Az FMRP az agyban jelenlévő mRNS-ek 4-8%-val interferál (szabályzó szereppel bír), ezáltal komplex funkcióval rendelkezik. Egyrészt transzkripciós represszorként funkcionál, hiánya zajos transzkripciót eredményez, másrészt kóros dendrittüske képződéshez és a serkentő és gátló szinapszisok egyensúlyának a felborulásához vezet [38]. Egy másik gyakori monogénes ASD forma a Rett-szindróma, melyet kezdeti tünetei alapján nem lehet elkülöníteni az ASD-től, de a betegség progressziója következtében, a Rett-szindróma specifikus tünetek megjelenésével (fejkörfogat növekedésének elmaradása, középvonali kézmanírok, ataxia) egyre jobban elkülöníthető a két csoport [39]. A klasszikus Rett-szindrómás esetek 95%-ban, míg az atypusos Rett-szindrómás esetek 75%-ban *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) gén patogén mutációi állnak a háttérben [40]. A *MECP2* negatív Rett-szindrómás esetekben *FOXG1* (forkhead box G1), *CDKL5* (cyclin dependent kinase like 5) és *NTNG1* (netrin G1) mutációk oki szerepe is felvethető [41]. A X kromozómán elhelyezkedő *MECP2* gén protein terméke a hiszton deacetilálásában kulcsszerepet játszó komplexnek a része, tehát általános transzkripciós represszorként funkcionál [42]. A mutációk következményeként kialakuló kóros fehérjetermék a növekvő hiszton acetiláció miatt fokozott, zajos transzkripcióhoz vezet [43]. Bár elsődlegesen a szindrómás ASD formát létrehozó gének közé soroljuk, patomechanizmusán keresztül képet kapunk az epigenetikai tényezők (hiszton acetilálás) és gén-gén interakciók szerepére is ASD-ben. A *MECP2* több más KIR-i gén expresszióját szabályozza, mint az *UBE3A*, vagy *GABRB3*, de a *BDNF* és *CREBBP* közös jelátviteli útja miatt a mitochondriális funkció szabályzásában is szerepe van [44]. Micro-RNS expresszióra gyakorolt hatása által a gének poszttranszkripciós expressziójára is hat [45]. Az egyéb monogénes formák a gének funkció szerinti besorolásánál lesznek említve.

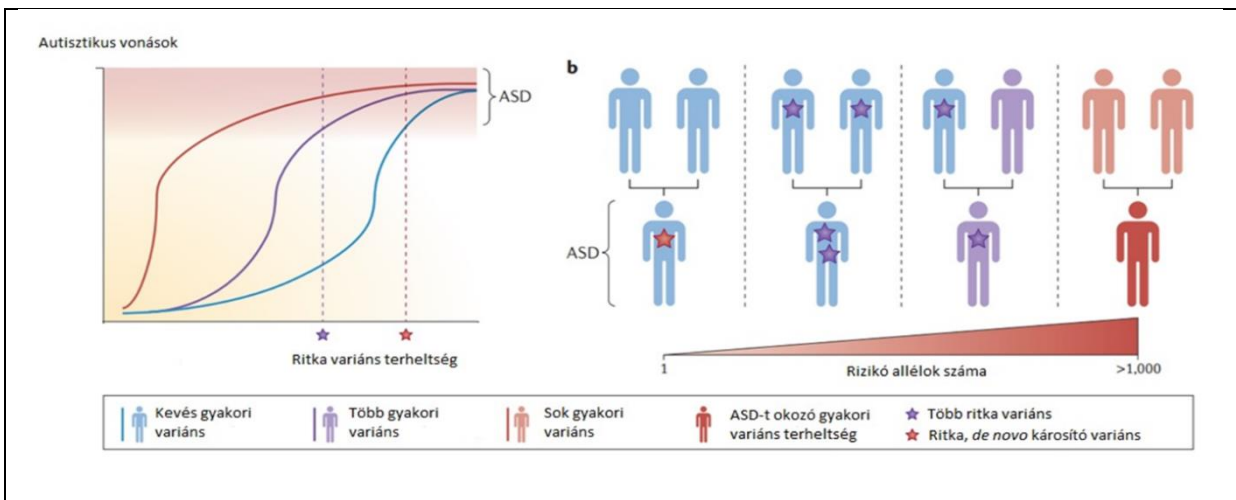
### 2.3.3 A poligénes formák:

A poligénes formákat komprehenzív genetikai vizsgálat esetén nehéz elkülöníteni a monogénes formáktól. Ez különösen akkor nehéz, mikor egy korábban ASD rizikójában szerepet játszó gén esetében monogénes forma is leírásra kerül, melynek pontos fenotípusa még körvonalazódik. Ilyen esetekben nehéz, egy ismeretlen klinikai jelentőségű variáns, esetre vonatkoztatott hatását prediktálni.

Neurobiológiai vizsgálatok igazolták, hogy az ASD háttérében, nem fokális károsodás, hanem a KIR összeköttetések minőségi és mennyiségi zavara mutatható ki. Ezt támasztják alá azok a genetikai vizsgálatok is melyek az ASD, ADHD, IKZ és szkizofrénia közös genetikai háttéréről szólnak [34][46]. Ezekben az esetekben a gén-környezet, gén-gén interakciók *second-hit* vagy *multiple-hit* mechanizmusok szerepelnek, így hozva létre a megfelelő fenotípus spektrumot [12][47].

A de novo CNV-k száma az ASD-vel élők esetében 5-15%, amely szignifikánsan magasabb mint az 1-2%-os populációs átlag [48]. A de novo SNP-k száma viszont nem különbözik szignifikánsan az egészséges testvérekben észlelt de novo SNP-k számától, viszont prediktált fehérje károsító hatás szempontjából az ASD populációban észlelt károsító de novo mutációk száma 2-3-szor magasabb volt mint a testvérekben észlelt hasonló mutációk [49].

A különböző poligénes ASD formák lehetséges kialakulását és a variáns terheltség szerepét a betegség kialakulásában Bourgeron és mtsai. által közölt ábrával tudjuk legjobban szemléltetni [47].



**1. Ábra:** A ritka és gyakori variánsok interakciójából származtatható fenotípus. Látható, hogy egy ritka, *de novo*, károsító mutációi jelenléte bizonyos esetekben elégséges a tünetek megjelenéséhez, viszont a magas mutációs terheltség, erősen penetráns mutáció nélkül is felelős lehet a tünetek jelenléteért. Mind a négy esetben a családban jelenlévő, köszüb alatti diagnózishoz tartozó, ASD fenotípusjegyek a genetikai háttérrel összevetve értelmezhetőek. [47]

Figyelembe véve, hogy az ASD pathogenezisét tekintve nem egységes, a panelünkön szereplő géneket igyekeztük funkcionalitásuk szempontjából öt csoportba sorolni: (1) a szinaptikus gének csoportja, (2) az ingerület átvédésben szerepet játszó gének csoportja, (3) a DNS remodellációjában és különböző transzkripciós folyamatokban résztvevő gének csoportja, (4) a növekedést szabályzó gének csoportja, amelyek fő feladata a fehérjék szintézisében és lebontásában történő egyensúly beállítása, (5) a sejten belüli transzport folyamatokban szerepet játszó, mikrotubulus funkcióhoz köthető génekek csoportja [47] [50] **(2. Táblázat).**

<b>3. Táblázat: A PhD munkában vizsgált ASD-vel asszociált gének jellemzői</b>						
<b>Gén</b>	<b>Lókusz</b>	<b>SFA RI</b>	<b>RVIS</b>	<b>Funkció</b>	<b>Szindróma</b>	<b>Öröklés- menet</b>
<i>ANKRD1 1</i>	16q24.3	1S	-4.38 (0.09%)	Hiszton deacetiláz komplex része	KBG	AD
<i>APIS2</i>	Xp22.2	no	0.06 (58%)	Golgi készülék vezikuláris transzport fehérje	Pettigrew, XLMR	XL
<i>ARX</i>	Xp22.1- 22.3	1	NA (NA)	Homeobox transzkripció faktor	Lissencephalia	XL
<i>ATRX</i>	Xq21.1	1S	-0.93 (9.75%)	Helicase transzkripció faktor	Alpha-thalassemia IKZ	XL
<i>AUTS2</i>	7q11.22	1	-1.97 (1.82%)	Transzkripció faktor	AUTS2	AD
<i>AVPR1A</i>	12q14- q15	3	-0.25 (35.99%)	Arginin-Vasopressin transzmembrán receptor		
<i>BDNF</i>	11p14.1	5	0.44 (77.57%)	Neurotrophin - growth and differentiation		
<i>BRAF</i>	7q34	1S	-0.6 (17.75%)	Citoplazma oncogén Extracelulár szignál	Cardiofaciocutaneous	AD
<i>C18orf1</i>	18p11.21	NA	-0.12 (45.13%)	LDL receptor alegység		
<i>CACNA 1C</i>	12p13.3	1S	-2.09 (1.57%)	Feszültség függő Ca <sup>2+</sup> csatorna	Timothy	AD
<i>CASK</i>	Xp11.4	1	-0.71 (14.4%)	Ca <sup>2+</sup> /CaM dependens kináz	MICPCH, FG	XLD
<i>CDKL5</i>	Xp22	1S	-0.67 (15.86%)	Ser/Thr protein kináz	Rett, EIEE	XLD
<i>CHD7</i>	8q12.1	1S	-2.92 (0.57%)	ATP-dependens chromatin remodelláció	CHARGE	AD



Gén	Lókusz	SFA RI	RVIS	Funkció	Szindróma	Öröklés-menet
<i>CHD8</i>	14q11.2	1	-2.34 (1.18%)	ATP-dependens chromatin remodelláció		AD
<i>CNTNA P2</i>	7q35-q36	2S	-2.25 (1.3%)	Contactin sejtheadheziós fehérje	Pitt-Hopkins like	AR
<i>CNTNA P5</i>	2q14.3	3	-0.99 (8.65%)	Contactin sejtheadheziós fehérje		AR
<i>CREBB P</i>	16p13.3	1S	-2.1 (1.54%)	Hisztin acetiltranszferáz	Rubinstein-Taybi	AD
<i>DHCR7</i>	11q13.2-q13.5	1	-0.86 (10.89%)	Koleszterin szintézis	Smith-Lemli-Opitz	AR
<i>DLGAP 2</i>	8p23	3	-1.61 (3%)	Állványfehérje - PSD-95		
<i>DMD</i>	Xp21.2	S	-0.84 (11.28%)	Postszinaptikus állványfehérje	Duchenne, Becker MD	XLR
<i>DOCK4</i>	7q31.1	3	-0.83 (11.53%)	Rho-GTP-áz		
<i>DPP10</i>	2q14.1	2	0.38 (75.65%)	Feszültségfüggő K <sup>+</sup> csatorna funkció		
<i>DPP6</i>	7q36.2	3	NA (NA)	Feszültségfüggő K <sup>+</sup> csatorna funkció		
<i>EHMT1</i>	9q34.3	1S	-1.58 (3.13%)	Hisztin metiltranszferáz	Kleefstra	AD
<i>FGD1</i>	Xp11.21	1S	-0.51 (21.56%)	Golgi készülék-Rho-GTP-áz utvonal	Aarskog-Scott	XLR
<i>FMRI</i>	Xq27.3	1S	0.26 (70.26%)	Transzlációs regulátor	Fragilis-X	XLD
<i>FOLR1</i>	11q13.4	1S	0.46 (78.28%)	Folsav kötő fehérje	Neuronal tube defect	AR
<i>FOXG1</i>	14q13	1	-0.25	Transzkripciós represszor	Rett, EIEE, West	AD

Gén	Lókusz	SFA RI	RVIS	Funkció	Szindróma	Öröklés- menet
<i>FOXP1</i>	3p14.1	1	-0.38 (28.01%)	Transzkripciós represszor	Mental retardation language impairment	AD
<i>FOXP2</i>	7q31	2	-0.82 (11.68%)	Transzkripciós represszor	Speech-language disorder1	AD
<i>GABRB3</i>	15q11.2-q12	2	-0.49 (22.36%)	GABA <sub>A</sub> Receptor funkció	EIEE, Angelmann	AD
<i>GABRG1</i>	4p12	no	-0.8 (12.24%)	GABA <sub>A</sub> Receptor funkció		
<i>GNAI4</i>	9q21	6	-0.13 (43.91%)	Transzmembrán fehérje		
<i>GRIN2B</i>	12p12	1	-2.41 (1.07%)	Glutamát receptor funkció	EIEE, Intellectual dysability	AD
<i>GRPR</i>	Xp22.2-p22.13	5	0.11 (61.73%)	G-fehérje kapcsolat ranszmembrán receptor		
<i>HOXA1</i>	7p15.3	3S	0.06 (58.74%)	Szekvencia specifikus transzkripciós faktor	Bosley-Salih-Alorainy, Athabaskan brainstem dysgenesis	AR
<i>HPRT1</i>	Xq26.2-q26.3	no	-0.01 (52.85%)	Phosphoribosyltranszferáz enzim - purin anyagcsere	Lesch-Nyhan	XLR
<i>IMMP2L</i>	7q31	3	-0.07 (48.12%)	Belső mitochondriális membrán fehérje		
<i>KATNAL2</i>	18q21.1	1	-1.09 (7.11%)	Mikrotubulos hasító aktivitás		
<i>KCTD13</i>	16p11.2	3	-0.34 (30.07%)	GTP-áz aktivitású transzmembrán		
<i>KDM5C</i>	Xp11.22-p11.21	2	-1.51 (3.5%)	Hiszton demetiláz	IKZ- Claes-Jensen típus	XLR
<i>KIRREL3</i>	11q24.2	2	-1.39 (4.27%)	Sejtadhéziós fehérje		
<i>KLHL3</i>	5q31.2	no		Ubiquitin ligase	Pseudohypoaldosteronism	AR

Gén	Lókusz	SFA RI	RVIS	Funkció	Szindróma	Öröklés- menet
<i>LICAM</i>	<i>Xq28</i>	1	-1.3 (4.92%)	Sejtadhéziós transzmembrán glycoprotein	Corpus callosum agenésia	XL
<i>LAMC3</i>	<i>9q31-q34</i>	5	0.64 (83.64%)	Extracelluláris mátrix fehérje		
<i>MBD5</i>	<i>2q23.1</i>	1	-2.12 (1.52%)	Heterochromatin kialakulás	IKZ, Epilepsy	
<i>MECP2</i>	<i>Xq28</i>	1S	-0.89 (10.46%)	Transzkripciós faktor	Rett, EIEE	
<i>MED12</i>	<i>Xq13</i>	no	-1 (8.47%)	Mediátor alegység az RNS Polymeráz II-höz	Ohdo, FG, Lujan-Fryns	XL
<i>MEF2C</i>	<i>5q14</i>	3S	0.06 (58%)	Transzkripciós faktor	Intellectual dysability	XL
<i>MET</i>	<i>7q31</i>	2	-0.46 (23.73%)	Tyroszin kináz aktivitás		AD
<i>MIDI1</i>	<i>Xp22.2</i>	1S	-0.78 (12.77%)	Ubiquitin ligase	Opitz	
<i>NEGR1</i>	<i>1p31.1</i>	3	-0.27 (34.6%)	GPI sejtadhéziós fehérje		XL
<i>NHS</i>	<i>Xp22.2-p22.1</i>	1S	-0.73 (14.24%)	Aktin remodeláció	Nance-Horan	
<i>NIPBL</i>	<i>5p13.2</i>	1S	-2.45 (1.01%)	Testvérokromatidák kohéziós komplexének része	Cornelia de Lange	XL
<i>NLGN3</i>	<i>Xq13.1</i>	1	-0.54 (20.54%)	Postszinaptikus sejtadhéziós fehérje		AD
<i>NLGN4 X</i>	<i>Xp22.32-p22.31</i>	2	-0.84 (11.18%)	Postszinaptikus sejtadhéziós fehérje		
<i>NRXN1</i>	<i>2p16.3</i>	1	-1.79 (2.25%)	Preszinaptikus sejtadhéziós fehérje	Pitt-Hopkins-like	
<i>NSD1</i>	<i>5q35</i>	1S	-1.55	Hisztin metiltransferáz	Sotos	AR

Gén	Lókusz	SFA RI	RVIS	Funkció	Szindróma	Öröklés- menet
<i>NTNG1</i>	1p13.3	3S	-0.67 (15.62%)	Axon növekedési útmutató	Rett	AD
<i>OPHN1</i>	Xq12	2	0.51 (80.2%)	Rho-GTP-aze		
<i>PAFAH 1B1</i>	17p13.3	no	-0.41 (26.23%)	Trombocyta aktiváló faktor, transzportszabályzás	Lissencephalia	
<i>PCDH19</i>	Xq13.3	1	-0.89 (10.43%)	Ca dependens sejtadhézió	EIEE	AD
<i>PCDH9</i>	13q21.32	3	-0.13 (44.09%)	Ca dependens sejtadhézió		XL
<i>PDE10A</i>	6q27	no	-0.98 (8.8%)	Transzkripció szabályozás		
<i>PHF6</i>	Xq26.2	no	-0.03 (51.04%)	Hiszton deacetiláz komplex része	Borjeson-Forssman-Lehmann	
<i>PIP5K1 B</i>	9q21.11	no	0.2 (67.19%)	Phosphatidylinozitol kináz		XL
<i>PNKP</i>	19q13.33	no	-0.53 (20.86%)	DNS repair	Microcephalia+IKZ/ AOA4	
<i>PON3</i>	7q21.3	no	0.64 (83.98%)	HDL asszociált G fehérje multienzimikus funkció		AR
<i>PQBPI</i>	Xp11.23	1	-0.03 (51.04%)	Polyglutamát traktus kötő transzkripciós aktivátor	Renpenning	XL
<i>PTCHD 1</i>	Xp22.11	1	-1 (8.32%)	Transzmembrán fehérje		
<i>PTEN</i>	1p36	1S	-0.23 (36.86%)	Tumor szupresszor PI3K/AKT inhibitor	Cowden	XL
<i>PTPN11</i>	12q24	1S	-0.43 (25.15%)	Tyrozín foszfatáz	Noonan	

<b>Gén</b>	<b>Lókusz</b>	<b>SFA RI</b>	<b>RVIS</b>	<b>Funkció</b>	<b>Szindróma</b>	<b>Öröklés- menet</b>
<b>RAB39B</b>	Xq28	3	0.01 (54.63%)	Vezikuláris transzport Golgi észülék	Waisman	AD
<b>RAI1</b>	17p11.2	1S	-3.68 (0.25%)	Sejtmagi protein	Smith-Magenis	AD
<b>RBFOX 1</b>	16p13.3	2	-0.47 (23.51%)	Transzkripció faktor		XL
<b>RELN</b>	7q22	1	-2.15 (1.46%)	Extracelluláris mátrix fehérje, sejt-sejt kölcsönhatás	Lysencephalia, ADEAF	AD
<b>RPL10</b>	Xq28	3	0.04 (56.25%)	Ribosomál protein - szintézis		
<b>SATB2</b>	2q33	4	-0.87 (10.65%)	Receptor funkció	Glass szindróma	AD/AR
<b>SCN1A</b>	2q24.3	1S	-1.43 (4.03%)	Feszültség függő Na <sup>+</sup> csatorna	EIEE, Dravet	
<b>SCN2A</b>	2q23- q24	1S	-1.99 (1.77%)	Feszültség függő Na <sup>+</sup> csatorna	EIEE	AD
<b>SHANK 2</b>	11q13.3- q13.4	1	NA (NA)	Állványfehérje		AD
<b>SHANK 3</b>	22q13.3	1S	NA (NA)	Állványfehérje	Phelan-McDermid	AD
<b>SLC6A4</b>	17q11.1- q12	3	-0.6 (18.06%)	Na <sup>+</sup> dependens szerotonin reuptake		
<b>SLC9A6</b>	Xq26.3	1	-0.18 (39.95%)	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> pumpa - mitochondriális membrán	IKZ Christianson Type	XLD
<b>SLC9A9</b>	3q24	3	-0.86 (10.89%)	ioncsatorna		
<b>SMC1A</b>	Xp11.22	1S	-0.49 (22.09%)	Testvérkromatidák kohéziós komplexének része	Cornelia de Lange	XLD
<b>SMG6</b>	17p13.3	3	-0.16	Telomer védő faktor		

<b>Gén</b>	<b>Lókusz</b>	<b>SFA RI</b>	<b>RVIS</b>	<b>Funkció</b>	<b>Szindróma</b>	<b>Öröklés- menet</b>
<i>SNRPN</i>	15q11.2	1S	-0.21 (38.28%)	Imprinting - transzkripciós faktor	Prader Willi	AD
<i>SOX5</i>	12p12.1	1S	-0.96 (9.09%)	Transzkripciós faktor	Lamb-Shaffer	
<i>SPAST</i>	2p24- p21	1	-0.07 (48.54%)	Mikrotubulos hasító	Hereditær Spasticus paraparesis 4	AD
<i>ST7</i>	7q31.1- q31.3	3	-0.25 (35.99%)	Tumor szupresszor		
<i>STK3</i>	8q22.2	no	-0.36 (28.93%)	Ser/Thr protein kináz		AD
<i>TCF4</i>	18q21.1	1S	-0.56 (19.54%)	Transzkripciós faktor	Pitt-Hopkins	
<i>TSC1</i>	9q34	1S	-1.04 (7.83%)	Tumor szupresszor	Sclerosis tuberosa komplex	
<i>TSC2</i>	16p13.3	1S	-2.54 (0.87%)	Tumor szupresszor	Sclerosis tuberosa komplex	AD
<i>UBE3A</i>	15q11.2	1	-0.56 (19.54%)	Ubiquitin ligase	Angelman	AD
<i>VPS13B</i>	8q22.2	1S	-0.61 (17.5%)	Transzmembrán fehérje	Cohen	AD
<i>ZEB2</i>	2q22.3	1S	-0.91 (10.03%)	Transzkripciós represszor	Mowat-Wilson	AD
<i>ZNF507</i>	19q13.11	no	-1.15 (6.33%)	Zink ujj protein alegység		AR
<i>ZNF804 A</i>	2q32.1	3	1.3 (93.91%)	Zink ujj protein alegység		AD
<i>ZNHIT6</i>	5q33	no	-0.4 (26.73%)	Transzkripciós faktor		

### 2.3.3.1 Szinaptikus gének

A szinapszis a KIR funkcionális alegysége. Az ASD alapvetően szinaptopátiának tekinthető [51] [52]. Az ASD-vel asszociált gének 88%-a KIR korai fejlődésében, sejtek differenciációjában, illetve a neurogenesisben játszik fontos szerepet. Ezen gének nagy része az idegrendszer érési folyamatának későbbi szakaszaiban (mind a szinapszisformálódás, dendrit arborizáció, stb.) is aktív marad [53]. Szinaptikus géneknek nevezünk azokat a géneket, melyek a szinaptikus rés megalkotásáért és fenntartásáért felelősek. Ezen folyamatokhoz sejt-adhézión fehérjék szükségesek, melyek a pre- és postszinaptikus membránok között fizikai kapcsolatot teremtenek.

A sejtadhézión komplexek preszinaptikus elemei a neurexinek. A panelünkön is szereplő neurexin-1 (*NRXN1*) egy olyan preszinaptikus transzmembrán fehérjét kódol, mely a postszinaptikusan elhelyezkedő neuroliginekhez (*NLGN*) kapcsolódik, ezáltal biztosítva a sejtek közötti adhézión [50][47][54]. Az idegi aktivitás  $Ca^{2+}$ /calmodulin (CaM) dependens IV kináz szignállal befolyásolja a neurexinek, főleg a *NRXN1* alternatív splicingját [55]. A depolarizáció hatására létrejövő transzkripción változás felismerése fontos tényezője az aktivitás dependens jelátviteli utak működésének, melyek során létrejönnek a szükséges összeköttetési körök és fenntartható az idegrendszeri plaszticitás [55]. A neuroligin-3 (*NLGN3*) a glutamáterg postszinaptikus denzitás (PSD) alkotóeleme, a neuroligin-4X (*NLGN4X*) által kódolt fehérjével együtt az idegsejt felszíni fehérjék családjába tartozik. Ezen család tagjai a béta-neurexinek specifikus ligandjai és részt vesznek a KIR szinapszisainak kialakulásában és dinamikájában [56]. Intracelluláris doménjei állványfehérjékhez kapcsolódnak. Neuroliginek aktivitás függvényében triggerelik a GABAerg és glutamáterg szinapszisok képződését, ezzel szabályozva a szinaptikus denzitás összetételét, illetve a szinapszis homeosztázist [57]. A *NRXN1* és *NLGN3* összekapcsolódása  $Ca^{2+}$  dependens szinaptikus komplex formációjához vezet, mely befolyásolja az alternatív splicingot, ezáltal facilitálva a megfelelő domének összekapcsolódását [58]. A neuroliginek mutációi destabilizálják a komplexet és ezáltal a szinaptikus rés stabilitását is befolyásolják, mely elengedhetetlen a szinapszis specifikációjában, érésében [58].

*CNTNAP2* (*contactin-associált-protein-like 2*) preszinaptikus elhelyezkedésének köszönhetően, szintén a neurexin szupercsalád közé sorolandó, mely a neuron-glia adhéziós komplex részeként a radiális glia által vezérelt migrációban játszik szerepet [54]. Knock-out egérkísérletekkel a corpus callosumban ectopiás neuronok megjelenését eredményezte [59]. Autoszomális recesszív formában, a *NRXN1* gén hibáival megegyezően epilepsziával, ADHD-val, IKZ-val járó Pitt-Hopkins like szindrómát hoznak létre (OMIM: 610042). *CNTNAP5* (*contactin-associált-protein-like 5*) az előzőhöz hasonlóan az immunoglobulin sejtadhéziós szupercsalád tagja, azonban humán betegséggel egyelőre még nem asszociálták [60].

*KIRREL3* (*KIRRE-like-nephrin family adhesion molecule 3*) által kódolt fehérje szintén egy immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós fehérje, mely az axon és dendrit kapcsolódás korai szakaszában a hippocampus mohasejt szinapszisainak formálódásában tölt be szerepet [61]. Monogénes szerepe IKZ-ban egyelőre még kérdéses, a CASK intracelluláris állványfehérjével való interakciója miatt, mely szindrómás ASD formával asszociált, felvethető szerepe ASD patomechanizmusában [62].

A *LICAM* (*L1-cell adhesion molecule*) szintén egy immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós transzmembrán glycoprotein, melyet egy evolúciósan konzervált gén kódol. A neurogenesis első lépéseitől, a nyúlvány képződéstől, a migrációs szakaszon keresztül, a szinaptogenezisen és myelináción át sok folyamatban játszik szerepet [63]. Főbb funkciói egy-egy funkcionális doménnek megfeleltethetők, ezért a klinikumban megjelenő tüneti peiotrópiát genotípus-fenotípus korreláltatás segítheti. Az aqueductus stenosis következtében kialakuló hydrocephalus, corpus callosum agenesia a trunkáns, jelentős fehérjefunkció veszteséhez vezető mutációkhoz kötött, melyek többnyire a fehérje sejtadhéziós doménjét károsítja. Az enyhébb fenotípus a cytoplazmatikus és reziduális sejt felszíni domének károsodásához köthető [64].

A panelünkön szereplő utolsó immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós fehérje a *NEGR1* (*neuronal growth regulator 1*). A gén által kódolt fehérje egy glycosylphosphatidyl-inositol horgonnyal csatlakozik a sejtmembránhoz [65]. Sejtadhéziós molekulaként alapvetően a szinaptogenezisben van szerepe, leszakadva a sejt felszínről azonban növekedést biztosító substrátként funkcionál az arborizációhoz [65]. Neurodevelopmentális szerepére a gén lokuszát érintő microdeléción világított rá, melynek során ADHD-val, tanulási nehézséggel, dyslexiával hozták összefüggésbe [66]. *NEGR1*



SNP-it egy másik magas heritabilitású pszichiátriai kórképpel is összefüggésbe hozták, monopoláris depresszióval. Egérkísérletekben pedig igazolható volt, hogy venlaflaxinnal való kezelés növelte a cortex negr1 expresszióját [67].

Az immunglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós fehérjék  $Ca^{2+}$  independent formában járultak hozzá az adhézióhoz, a cadherin szupercsaládba tartozó fehérjék azonban  $Ca^{2+}$  dependens glycoproteinek. A *PCDH19* (*protocadherin 19*) és *PCDH9* (*protocadherin 9*) a cadherin szupercsalád protocadherin alcsoportjába tartoznak. Ezek gyengébb adhéziót képeznek, mint a klasszikus cadherinek, viszont ennek köszönhetően, képesek heterophil kapcsolatokat is létrehozni, melynek következtében a sejtek felismerésében és az sejtadhézió modulációjában is szerepük van [68]. Bár expresszójuk kifejezett a KIR-ben, a különböző sejtpopulációkban más és más protocadherin rendszer jellemző, ami arra enged következtetni, hogy speciális szinaptikus összeköttetések megteremtéséhez járulnak hozzá [69].

A *PCDH9* egy 7 extracelluláris cadherin doménnel rendelkező protocadherin, mely hiánya esetén az egerek primér szomatoszenzoros cortexének mélyebb rétegszerkezete elvékonyodott [70]. Eddig a gén kópiaszám eltéréseit hozták összefüggésbe ASD-vel [71]. A *PCDH19*, bár az X kromoszómán elhelyezkedő gén, patogén mutációi heterozygóta formában kizárólag nőket értő epilepsziával és IKZ-vel járó szindrómás formát (OMIM:300088) okoznak. A betegség patomechanizmusát a protocadherinek sejt felismerő funkciójában szerepet játszó volta magyarázhatja. A heterozygóta patogén mutációt hordozó nőknél, illetve azon férfiak esetében akiknél mozaikus formában van jelen mutáció a *PCDH19*<sup>+</sup> és *PCDH*<sup>-</sup> sejtek jelenléte, nem alkot homológ rendszert, ezáltal károsítva azon összeköttetéseket, melyek a molekulát, mint jelző molekula ismerik fel [72][73]. A gén embryonális és felnőtt korban egyaránt expresszálódik, főleg a limbikus rendszer és cortex területén [73].

#### 2.3.3.2 Az ingerület áttevődésben szerepet játszó gének

A szinaptikus rés kialakulása után, a megfelelő ingerületátvitel a szinapszis fő feladata. Ez három fehérjecsoport összehangolt működése során alakul ki, melyek a transzmembrán receptorok, az állványfehérjék (scaffold protein) és az enzimek [51]. Az ingerület egy elektromos jel, melyet a membránon áthaladó töltéssel rendelkező ionok hoznak létre. Az ASD hátterében több ioncsatorna diszfunkciója is leírásra került [74][50]. Az ioncsatornák olyan transzmembrán fehérjék, melyek bizonyos ingerek

hatására nyílnak, illetve záródnak. A kiváltó inger függvényében beszélhetünk feszültség-függő, illetve ligand-függő ioncsatornákról. A feszültség függő csatornák esetében a kiváltó inger a membránban bekövetkező feszültségváltozás. A vezetett ionok függvényében  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  illetve más anion csatornákról beszélhetünk.

A depolarizáció kiinduló ionáramát a feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornák hozzák létre. Ezen csatornatípusok KIR-i legelterjedtebb formája az *SCN1A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 1) génhez kötött, mely a csatorna pórusformáló  $\alpha$  alegységét kódolja [74]. Az *SCN1A* mutációi több különböző betegséggel asszociáltak, köztük különböző típusú és súlyosságú epilepsziával (OMIM:604403,607208). Bár a detektált mutációk nem kizárólagosak 1-1 betegségcsoportban, mégis többségük esetében genotípus-fenotípus korrelációra van lehetőség. Az intracelluláris C-terminális szakasz mutációi valószínűleg a csatorna inaktivációját befolyásolják és csökkentik a Calmodulin (CaM) komplexhez való kötődését, ezeket ASD-vel, lázgörcsökkel hozták összefüggésbe. A transzmembrán szegmenseket érintő mutációk gyakrabban társulnak súlyosabb fenotípussal, mint például a súlyos myoclonusokkal járó infantilis epilepsziával, a Dravet-szindrómával [75].

Az *SCN2A* (sodium voltage-gated channel alpha subunit 2) az előzőhöz hasonlóan egy feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatorna  $\alpha$  alegységét kódolja és szerepe van az axon iniciálisokon keletkező akciós potenciál létrejöttében és propagációjában [76].

A depolarizációra bekövetkező sejten belüli változásokért azonban nem a  $\text{Na}^+$  csatornák felelősek, hanem a velük együtt nyíló  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákon beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  [74]. Egy szindrómás ASD formát okozó gén, a *CACNA1C* (calcium channel subunit alpha 1 C), mely az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna pórusformáló  $\alpha$  alegységét kódolja. A klasszikus Timothy-szindrómát okozó mutációk a pórus feszültség-függő záródását akadályozzák, ezáltal többlet  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz, mely cardiálisan a QT szakasz megnyúlásához vezet [74]. A szindróma extracardiális manifesztációjaként 80%-ban fordul elő ASD [77], ennek egyik oka, hogy a gén expressziós mintája szövetenként eltérő. Az eltérő fenotípus létrehozására jó példa a pórusformáló domén 6-os szegmentumát kódoló 8/8A exonok szövetenkénti kölcsönösen exkluzív splicingja, mely fejlődés során (embryonális korban) precízen szabályzott. A 8A minor allélon megnyilvánuló mutációk cután megnyilvánulással is járnak, syndactiliával, viszont a 8-as exon mutációjához syndactilia nem asszociálható [74]. A KIR-ben a kódolt fehérje a hippocampusz, az amygdala és a putamen területén expresszálód leginább [44].

A  $K^+$  csatornák képezik az ioncsatornáknak legheterogénebb csoportját, funkciójukat több járulékos alegység befolyásolja. A DPP10 (*Dipeptidyl peptidase 10*) Kv4 csatorna extracelluláris alegységét kódolja, ezáltal befolyásolja a csatorna elektrofiziológiai tulajdonságait és sejtfelszíni expresszióját, peptidáz aktivitással viszont nem rendelkezik [78]. Mivel a KIR-en kívül, a mellékvesékben és pancreasban is expresszálódik, valószínűsíthető, hogy a hormonális illetve neuroendokrin szekréció szabályozásában is van szerepe [79]. A DPP családból a DPP10-hez leginkább hasonló peptidáz aktivitással nem rendelkező, de Kv4 járulékos alegységét kódoló gén a DPP6 (*Dipeptidyl peptidase 6*), melynek CNV-it és missense mutációját microcephaliával járó IKZ-val hozták összefüggésbe (OMIM:616311).

A ligand függő ioncsatornákat transzmembrán receptoroknak is tekinthetjük. A *GABRB3* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta3*) a  $GABA_A$  hetero-pentamer ionotrop receptor  $\beta 3$  alegységeit kódolja. A gén az Angelman-szindróma specifikus lokuszon belül helyezkedik el, de biallélikusan expresszálódik, viszont epigenetikai tényezők, például MECP2 által okozott Rett-szindróma csökkentheti/eltolhatja az anyai, illetve apai allélok expresszióját [80]. A *GABRG1* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit gamma1*) a  $GABA_A$  receptor  $\gamma 1$  alegységét kódolja, mely a receptor benzodiazepin allosterikus kötőhelyének képzésében vesz részt. Az ASD-ben betöltött szerepét egyelőre csak esetközlés szintjén sikerült felvetni [81].

A glutamaterg rendszer fő ionotrop receptortípusai az AMPA és NMDA receptorok. Ezek konformáció változásai, szinaptikus denzitáson való expresszivitásai hozzák létre a szinaptikus plaszticitást, a memória és tanulási folyamatokhoz szükséges hosszú távú potenciációt (LTP), hosszú távú depressziót (LTD). A *GRIN2B* (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B*) az NMDA glutamát receptor *N2B* alegységét kódolja, mely prenatálisan dominál a receptor *N2A* alegységének expresszivitásával szemben, míg postnatalisan expressziója lecsökken [82]. Mivel az ionotrop NMDA receptorok alegységösszetétel változásai jelentősen befolyásolják a csatorna elektrokémiai tulajdonságait, az alegységek expressziójának időbeli kontrollja pontosan szabályzott. A receptor upregulációja a szinaptikus metaplaszticitás létrejöttének egy fő mozgató rugója [47]. A metaplaszticitás a szinaptikus plaszticitás előszobája, mely képessé teszi a sejtet a plaszticitás folyamataira, mint az LTP és az LTD. A *GRIN2B* mutációinak szerepe többszörösen alátámasztott komplex ASD formákban [49][83], patogén mutációit már

autoszomális domináns öröklődést mutató IKZ-val (OMIM:613970) és epilepsziás encephalopathiával (OMIM:616139) is összefüggésben hozták.

Az aktív ionáramlásban résztvevő, pumpafunkciót betöltő fehérjék közül három gén került vizsgálatra. Az *SLC6A4* (*solute carrier family 6 member 4*) egy Na<sup>+</sup> dependens szerotonin transzportert gátol, mely preszinaptikus elhelyezkedésének köszönhetően a szerotonin (5-HT) visszavételéért és újrahasznosításáért felelős. A szerotonin ASD-ben betöltött szerepe többszörösen megalapozott, egyrészt a fejlődésben betöltött funkciója miatt, másrészt, mivel az ASD-vel diagnosztizáltak közel egyharmadában észlelhető emelkedett szérumszerotonin szint [84]. A gén által kódolt fehérje bizonyos triciklikus antidepresszánsok és szerotonin re-uptake gátlók célpontja [74]. Az *SLC9A6* és *SLC9A9* gének által kódolt fehérjék az Golgi-apparátus, endoszóma membránjában jelenlévő Na/H<sup>+</sup> pumpákat (NHE) kódolják, melyeknek fő feladata az endoszómában lévő savas közeg megteremtése. Az endoszómában betöltött szerepük funkcionális redundanciára utal [85]. Az *SLC9A6* mutációi X-hez kötött súlyos fokú IKZ-val, microcephaliával, epilepsziával és ataxiával jellemzett Christianson-szindrómát okoznak (OMIM:300243). A transzmembrán receptorok közül, nem csak az ioncsatorna funkciójú, de a G-fehérje kapcsolt, illetve enzim aktivitással rendelkező fehérjék is érintettek lehetnek ASD-ben. A *GRPR* (*gastrin releasing peptide receptor*) a gasztrin felszabadító peptid (GRP) neuronális receptora, mely hét transzmembrán doménjének köszönhetően, a G-fehérje kapcsolt transzmembrán receptorok csoportjába tartozik [86]. Mivel expresszióját elsősorban a sejtesten és a dendriteken tudták igazolni, axonokban viszont nem, valószínűsíthető, hogy szabályzó szereppel bír a szinaptikus transzmisszióban [87]. Legtöbbet vizsgált funkciója a viszketés érzetéhez kötött, mely a gerincvelő hátsó szarvi GRPR pozitív neuronjain keletkezik [88], azonban limbikus rendszerben való expressziójának köszönhetően, állatmodelleken, a félelem memóriában és az emocionális stresszreakcióban is szerepe van [87]. Széles körű expressziójának köszönhetően több neurodegeneratív és neurodevelopmentális betegséggel asszociálták, de genetikai eltérései egyelőre nem támasztották alá egyik betegségcsoportban sem [86][87]. A *C18orf1*, mai nevén *LDLRAD4* (*low density lipoprotein receptor class A domain containing 4*) egy lipoprotein receptor domént kódol, TGF- $\beta$  jelátviteli út blokkolása kapcsán a GABAerg interneuronok képződésében szabályzó szereppel bír. Lókusza

szkizofréniára való hajlammal kapcsolatos, valószínűleg a serkentő-gátló szinaptikus egyensúly megváltozása miatt [89].

Az enzim funkcióhoz kötött gének közül két szindrómás ASD formával asszociált gén patomechanizmusa kerül itt leírásra, a Lesch-Nyhan-szindrómát okozó *HPRT1* (*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase 1*) és a Noonan-szindrómát okozó *PTPN11* (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 11*). A *HPRT1* gén a purin mentő útvonal egyik enzimjét kódolja, mely visszakanalizálja a guanint és hypoxanthint a DNS szintézis helyére. A gén funkcióvesztő, hypomorph mutációi X-hez kötött recesszív öröklődésmenettel egy multisztémás betegséget okoznak, a Lesch-Nyhan-szindrómát. A neurológiai tünetek már csecsemőkorban észlelhetők, a pszichomotoros fejlődésbeli késlekedés után extrapyramidális tünetek jelentkeznek. A diagnózist az uraemia és a hyperuricosuria kimutatása alapozza meg. Speciális neurobiológiai alapú fenotípusa az öncsonkításig fajuló önsértő magatartás [16]. A mihamarabbi húgysavcsökkentő terápia alapja a korai felismerés, de a tünetek kialakulását ez is csak késleltetni tudja, a neurológiai tünetek megjelenését viszont nem befolyásolja [90].

A *PTPN11* egy intracelluláris elhelyezkedésű tyrozin foszfatázt kódol, melynek N terminális *SH2* (SRC homology 2) katalitikus doménje felelős az aktív és inaktív konformációk közötti átkapcsolásért, A tyrozin-phosphatáz (Y-phosphatase) domén regulátorként működik a PI3K/AKT útvonalon [91]. A mutációi esetében kimutatható emelkedett malignitásra való hajlam a PI3K/AKT útvonalban játszott szabályzó szerepére vezethető vissza [91][92]. Patogén mutációi Noonan szindróma megjelenéséhez vezethetnek (OMIM:163950), mely esetében a kardiológiai érintettség, alacsony növekedés és a bőrtünetek jelenlétének túl, a leggyakoribb eltérés a különböző mértékű pszichomotoros fejlődésbeli késlekedés és neuropszichiátriai tünetek megjelenése.

Az állványfehérjék fő szerepe az, hogy az eddig ismertett sejtmembráni receptorokat, csatornákat és sejtadhéziós molekulákat a citoplazma egyéb alkotó részeihez kapcsolják. A *PTCHD1* (patched domain containing 1) által kódolt fehérje egy transzmembrán fehérje, mely a PSD különböző állványfehérjéivel lép interakcióba, és ezáltal van szerepe a serkentő szinapszisok működésében [93]. Funkcióvesztő mutációi nem szindrómás ASD-vel asszociáltak (OMIM:300830). Az állványfehérjék, azáltal hogy különböző fehérjéket hoznak egymás fizikai közelségébe, passzív platformot teremtenek a jelátviteli utak kialakulására, azonban aktívan is részt vesznek komplex kaszkádok működésében

és szabályozásában. Az olyan zsúfolt helyeken, mint a PSD különösen fontos szerep jut az állványfehérjéknek. Nem meglepő tehát, hogy az őket kódoló gének mutációit, különböző neuropszichiátriai betegségekkel is asszociálták [94]. A SHANK (*SH-3 és multiplex ankyrin repeat domének*) géncsalád tagjai, illetve a PSD-95-höz kapcsolódó *discs-large-associated protein (DLGAP2)* rizikógéneknek tekinthetők ASD-ben [95][94]. A *DLGAP2 (discs-large-associated protein)* a glutamáterg szinapszisok részeként, állványfunkciójából adódóan, stabilizálja a szinaptikus összeköttetéseket, segít a jelátviteli komplexek összeszervezésében, a Shank fehérjékkel alkotott komplexek keresztül a szinaptikus morphogenesisben is részt vesz [94]. A *Shank* fehérjék regulátor szerepet töltenek be mind a metabotrop, mind az ionotrop glutamát receptorok által indukált jelátviteli úton, illetve multiprotein komplexek kialakításában vesznek részt más állványfehérje családba tartozó fehérjékkel összekapcsolódva. Állatmodellekben kortikális sejt kultúrákon igazolták, hogy *SHANK3* gén kiütése az NMDA receptorok membránba jutását gátolja [96]. A *SHANK3* által kódolt állványfehérje a PSD posztszinaptikus részén helyezkedik el, *SH3* doménjein keresztül kapcsolódik a transzmembrán glutamát receptorokkal, neuroligin-neurexin komplex-szel és ankyrin repeatein keresztül az intracelluláris citoskeleton aktin filamentumaival [54]. In vitro vizsgálatok alátámasztották, hogy *SHANK3* mutációk miatt csökken a tüskék aktin felhalmozódása, mely csökkenti a nyúlványok hosszát és a tüskedenzitást is [47]. Ez a gén az elsők között szerepelt azon gének között, mely komplex ASD formák kialakulásához vezet, amilyen a Phelan-McDermid microdeléciós szindróma is. A Phelan-McDermid-szindróma *22q13* kritikus régiója a *SHANK3* lókusza, melynek haploinsufficienciája során, az önkifejező beszéd hiánya, IKZ és ASD komplex fenotípusa alakul ki [97]. A *SHANK2* lokuszt érintő eltéréseket is összefüggésbe hozták már ASD-vel, de monogénes etiológia nem nyert megerősítést. A monogenitás helyett a „multiple hit” hipotézist erősítette, hogy más, major genetikai eltérések is előfordultak *SHANK2* mutációt hordozó egyéneknél, illetve, hogy a variánsok nem szegregáltak a tünetekkel [50]. A gátló szinapszisok állványfehérjéje a *gephyrin (GPHN)* [54]. Az állványfehérjék membrán-asszociált guanilát kináz (MAGUK) családjába tartozó *Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependens serin protein kináz (CASK)* multidomén szerkezetének köszönhetően részt vesz a sejten belüli jelátviteli utak szabályozásában [62]. Funkcióvesztő és hypomorph mutációinak köszönhetően különböző súlyosságú,

fenotípus spektrumú betegségek létrehozásáért felelősek. Funkcióvesztő mutációi, heterozigóta formában, lányokat érintő, súlyos microcephaliával és változó mértékű pontocerebelláris hypopláziával járó IKZ-t hoznak létre (OMIM:300749). Hypomorph, missense mutációi X-hez kötött öröklődésű, nystagmussal járó IKZ-hoz vezetnek (OMIM:300422).

A dystrophin (*DMD*) által kódolt fehérje nem egy szó szoros értelemben vett állványfehérje. Azért mutatjuk be mégis az állványfehérjék között, mivel a dystrophin-glycoprotein komplex alkotásában vesz részt, a PSD alkotóelemeként, géntermékei a serkentő szinapszisok szerveződésében és plaszticitásában játszanak szerepe [98]. Funkcióvesztő mutációi X-hez kötött, elsősorban férfiakat érintő izomdystrophiát okoznak, kifejezetten emelkedett kreatin kináz (CK) értékekkel. A Duchenne típusú izomdystrophiában szenvedők 30%-ában ASD tünetei is észlelhetők [99].

#### 2.3.3.3 Növekedést szabályzó, fehérjék translációjában szerepet játszó gének

A fehérje szintézisét és lebomlását befolyásoló mRNS funkciót szabályzó géneket soroltuk ebbe a csoportba, amelyeknek szerepük van az apoptózis szabályozásában és a növekedésben is. A növekedés egyik legfontosabb szabályzó útvonala az mTOR jelátviteli útvonalhoz kapcsolható, mely több szindrómás autizmusforma létrehozásában játszik szerepet, ilyen a sclerosis tuberosa, illetve a neurofibromatosis. A sclerosis tuberosa egy multisisztémás, autoszomális domináns öröklődésű betegség, melyben a *TSC1* (*TSC complex subunit 1*), illetve a *TSC2* (*TSC complex subunit 2*) gének patogén mutációi involválódnak. A *TSC1* által kódolt hamartin egy növekedést gátló protein, mely a *TSC2* által kódolt tuberin stabilizációjában játszik szerepet. A *TSC2* tumor szupresszor génként funkcionál. A *TSC2* expressziójának csökkenése a neurontestek növekedéséhez és a tüskeképződés fokozódásához vezet [100]. A fokozott tüskeképződés miatt a dendritműködés rendszertelen lesz és ez vezet a tünetek megnyilvánulásához. Klinikai alapon az etiológiát nem lehet meghatározni, mivel mindkét gén hibájából fakadóan jellegzetes bőrtünetek alakulnak ki, melyek a betegség diagnosztikus kritérium rendszerét is megalapozzák (hypomelanotikus foltok, faciális angiofibroma, shagreen foltok, unguális fibromák). KIR érintettsége miatt subependymális nodusok, corticális dysplázia, kiterjedt fehérállományi laesio, ektópiás szürkeállomány jelenhet meg, azonban az élettartamot legjobban befolyásoló tényező a subependymális óriás sejtés astrocytoma (SEGA) [101]. A TSC-vel diagnosztizáltak esetén az átlagpopuláció

prevalenciájához képest jelentősen magasabb a viselkedésbeli tünetekkel járó betegségek prevalenciája, az ASD akár 61%-ban, ADHD 21-50%-ban, tanulási nehezítettség 36-58%-ban fordulhat elő [101].

A *TSC1* és *TSC2* mellett a *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) is a PI3K/AKT/mTOR jelátviteli út szupresszoraként hat. A *PTEN* egy tumorszupresszor gén, amely elősegíti a sejtciklus leállítását az interfázisban és az apoptózist, miközben egyensúlyba hozza a sejtek proliferációjára és a test növekedésére gyakorolt stimulációt a rendelkezésre álló tápanyaggal, az inzulin felszabadulással és a gyulladást elősegítő citokinekkal az mTOR útvonalon [102]. A funkcióvesztő mutációknak köszönhetően csökken az apoptózis mértéke és a sejtek növekedése aktiválódik [103]. Haploinsufficienciája macrosomiához, súlyos macrocephaliához vezethet, autisztikus tünetek és IKZ megjelenése mellett, a fejkörfogat méretei +2,5 SD-vel meghaladják az átlagot. Több szindróma és betegség hátterében is leírták monogénes okként a *PTEN* mutációkat, ezek közös jellemzője a macrocephalia. A fejkörfogat növekedése súlyos esetekben már intrauterin is észlelhető [104]. Minden macrocephaliával társuló ASD esetet javasolt szűrni *PTEN* mutáció irányában, mivel a társuló daganatképződési rizikó terápiás következményeket von maga után. A mutációt hordozó egyéneket évente pajzsmirigy és bőrgyógyászati konzultációra kell irányítani, illetve, 30 éves koruk után teljes tumorkutatást kell végezni szűrő jelleggel [36]

A *PTEN* génnel ellentétben az mTOR jelátviteli út aktivátoraként funkcionál a *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*), mely neurotrofinként, kulcsszerepet játszik a neuronok túlélésében, differenciálódásában, növekedésében és fejlődésében [105].

A citoplazmatikus fehérjék mennyiségi szabályozásában kulcsszerepe van az ubiquitinációnak, amely során a fehérjék ubiquitin ligáz segítségével ubiquitinálódnak és így kerülnek lebontási helyükre, a proteasomába. Az *UBE3A* (*E3 ubiquitin-protein ligase*) a rendszer egyik fő komponense, mely imprintált - maternális formában expresszálódik a neuronokban, míg a szervezet egyéb területein biallélikusan [106]. A gén patogén mutációi Angelman-szindrómát okoznak, amely gyakran társul ASD-vel, de kifejezett IKZ és egyéb neurológiai tünetek is megjelenhetnek, mint az ataxia és a végtagremegés. Fontos, patognomikus magatartásbeli manifesztáció a gyakori indokolatlan nevetés, mosolygás és az ingerlékenysége. Komplex ASD formának tekinthetjük a microcephaliámikrocefalia és az epilepszia társulása miatt. A fejlődésbeli



elmaradás már hat hónapos korban jelentkezhet, azonban a speciális tünetek csak több év után indulnak [107].

A *KLHL3* gén által termelt protein a CUL3-mediált ubiquitinizációban szubsztrát adaptor szerepet tölt be, az E3 ubiquitin ligáz komplex részeként [108]. Patogén mutációi pseudohypertrophia okoznak.

Az E3 ubiquitin ligáz másik fontos eleme a *KCTD13*, melynek ASD-ben betöltött szerepére a 16p11.2 lokuszt érintő CNV-k mutattak rá. A gén által kódolt nukleáris protein ubiquitinálisan expresszált a szervezetben. Állatkísérletek során igazolódott, hogy a gén deléciója egerek esetében csökkent szinaptikus transzmisszióhoz vezetett, mely korrelált az RhoA emelkedésével, ez potenciális terápiás célpont lehet, amennyiben igazolódik, hogy a RhoA szint emelkedése vezet a *kctd13* knock out állatok tüneteire [109]. A gén az RhoA degenerációjában játszik szabályzó szerepet, mely az aktin citoskeleton aktivációja során szinaptikus transzmisszió fokozódásához vezet. A *KCTD13* dózisfüggőségére enged következtetni az a tanulmány, miszerint zebrahalakban a *KCTD13* overexpressziója microcephaliával, szupressziója macrocephaliával asszociált. A gén kromoszóma lokuszán létrejövő deléciók esetében humán mintában is észlelhető volt a macrocephalia jelenléte [110].

Az *OPHN1* (*oligophrenin 1*) gén is az RhoA útvonalon kapcsolható az idegrendszer fejlődéséhez, GTP-aktiváló tulajdonsága révén. Az Rho-GTPáz útvonal repressziós faktoraként működik az inaktív, GDP kötő konformáció támogatásával [111]. Kulcsszerepe van az aktivitás dependens dendrit fejlődésben és az excitatoros szinaptikus plaszticitásban, az AMPA receptorok stabilitásában. Működése az NMDA receptorok aktivitásától függ. Csökkent expressziója az AMPA receptorok destabilizációjával a szinaptikus plaszticitás csökkenéséhez vezet [112]. Az *OPHN1* magasan expresszálódik neurális velőcső neuroepitheliumában és később különböző agyi területek működése során is észlelték expresszióját, pl a hippocampális CA1 neuronok eseté [113].

Az Rho-GTPáz jelátviteli útvonal represszoraiként funkcionáló *KCTD13* és *OPHN1* mellett, két Rho-GTPáz aktivitását szabályzó, guaninet cserélő faktorként (GEF Guanine nucleotide exchange factor) funkcionáló gént is vizsgáltunk. Az első, egy komplex ASD formához, Aarskog-szindróma (OMIM:305400) kialakulásához vezető *FGDI* (*RhoGEF and PH domain containing 1*). A protein N-terminális doménje a filopoda képződést gátolja az Rho-GTPáz aktivitásnak köszönhetően [114][115]. Az *FGDI* gén mutációi

faciogenitális dysplasiához és , multiplex szkeletális eltérések kialakulásához vezetnek, amely X-hez kötött öröklődésmentet követ (OMIM: 305400). A *DOCK4* (*Dedicator of cytokinesis 4*) gén szintén GEF aktivitáson keresztül szabályozza a Rho-GTPáz útvonalat, olyan módon, hogy katalizálja a GDP-GTP átalakulást [111].

A *MIDI* (*midline 1*) génterméke a mikrotubulusok felszínén helyezkedik el és a citoskeleton asszociált mRNS transzport és mTOR kaszkád transzlációs szabályzásában van szerepe [116]. Mivel a mutáns fehérje a cytosolban marad, így károsodik a mikrotubulus asszociált mRNS transzport és nem jön létre a ribonucleoprotein komplex. A gén mutációi az E3 ubiquitin ligáz károsodásának következtében a katalitikus funkciójú 2A-phosphatáz akkumulációjához vezetnek [117], X-hez kötött öröklődésmenttel az Opitz-szindrómáért (OMIM:300000) felelősek, mely hypertelorizmussal, hypospadiasissal és más kongenitális középvonali malformációval jár együtt. A középvonali malformációk jelenléte kulcsfontosságú a diagnózis felállításában.

#### 2.3.3.4 A sejten belüli transzportfolyamatok génjei

A KIR kialakulása során a neuronok a ventriculáris zónából glia-vezérelt migráció segítségével hozzák létre a neocortexet és helyüknek és környezetüknek megfelelően differenciálódnak [54]. Migrációjuk során több konformáció változáson mennek keresztül, mely a mikrotubulusok kialakulásán, fenntartásán és állandó átalakulásán keresztül valósul meg. A már kifejlődött, rendeltetés szerinti helyükre migrált és hálózatokba szerveződött neuronok megfelelő működését a sejten belül transzportfolyamatok határozzák meg, melybenszintén kulcsszerepe van a citoskeleton alkotó elemeinek [118].

A *PAFAH1B1* (*platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1*) egyike azon géneknek, melyet a legkorábban azonosítottak a cortex morfológiai elváltozásának hátterében. A gén által kódolt acetyl-hydroláz a trombocytá aktiváló factor (PAF) inaktivációjában játszik szerepet. A sejten belüli transzportfolyamatokban játszott szerepét a dynein mikrotubulus motor proteinre gyakorolt szabályzó szerepe adja [119]. A géntermék dimerizációja, majd más fehérjékkel való tetramerizációja következtében mikrotubulusok dinamikájában van szerepe, ezért konformáció változása következtében súlyos migrációs zavar a lissencephalia alakul ki [119]. Patomechanizmusát illetően haploinsufficienciája a kóros neuronális migráció és differenciálódás következtében, az

átlagosnál vastagabb, négy rétegű primitív cortexet felépüléséhez vezet, ezzel pachy- és agyriát hozva létre [120].

A *SPAST* gén által kódolt spastin fehérje az idegrendszer egyik legfontosabb mikrotubulus hasító fehérjéje, mely az evolúciósan konzervált AAA doménje révén ATPase aktivitással rendelkezik [121]. A mikrotubulusok dinamikájának fenntartása révén szerepe van az axon képződésben és az elágazódások létrehozásában, ezáltal a transzportfolyamatokban. Patogén mutációit hereditér spastikus paraparesis 4-es típusának hátterében írták le [122]. A *KATNAL2* (katanin catalytic subunit A1 like 2) szintén a mikrotubulus hasításban játszik szerepet, de novo funkcióvesztő mutációi simplex ASD-s esetekkel asszociáltak [123].

Az aktin citoskeleton dinamikáért felelős gének közül több esetben találtak asszociációt IKZ és ASD vonatkozásában [48]. A Nance-Horan-szindrómát okozó gén (*NHS*) például az aktin remodelációban játszott szerepének köszönhetően meghatározza a sejtek alakját és ezáltal modulálja a sejtek összekapcsolódását, a fokális adhéziók kialakulását [124]. X-hez kötött domináns módon öröklődik, ezért fiúkban súlyos, már születéstől fogva jelenlévő diszmorfológiai tünetekkel jár, melyhez congenitális cataracta társul látásvesztéssel, de női hordozók esetében is számítani kell cataracta kialakulására (OMIM: 302350). Az esetek 30-80%-ban különböző mértékű IKZ társul a kórképhez, súlyosabb esetekben markáns ASD tünetekkel [125].

A mikrotubulusok betörése a lammelipódiumokba, a stabil mikrotubulusok és az aktin filamentumok felhalmozódása a nyúlványképződés helyszínén indítja el az axon specifikációt [118]. A *MET* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) által kódolt tyrosine kináz az idegrendszer korai fejlődési stádiumában az axonok végein jelenlévő növekedési kúpokban expresszálódik [126]. MET szignál hiánya morfológiai eltérésekhez vezet, hosszútávú túlexpressziója végül a glutamáterg szinapszisok csökkenését eredményezi [126]. Ezért a MET szignál időbeni szabályozása kritikus jelentőségű a különböző szinapszisok és a lokális összeköttetések kialakulásához.

A neuronális migráció egyik legismertebb extracelluláris szabályzó eleme a *RELN* által kódolt Reelin glycoprotein, melyet a marginális zóna Cajal-Retzius sejtjei expresszálnak [54]. Mutációi recesszív öröklődésmenettel major morfológiai elváltozásokat eredményeznek a KIR-ben, ezáltal lissencepháliához vezetnek, míg domináns formában epilepszia megjelenését eredményezik [127]. A *LAMC3* (*laminin subunit gamma 3*) az

extracelluláris mátrix alkotóelemeként szintén irányítóként funkcionál a neuronális migrációban. Csúcs expressziójának ideje is egybeesik ezzel, valamint a kortex szerveződésével [128]. Autoszomális recesszív formában mutációi occipitális területi cortikális malformációval asszociáltak (OMIM:614115), mely tükrözi a funkcionális géntermék temporo-occipitális régióban kimutatott domináns lokalizációját [128].

A KIR jól differenciált, érett neuronjainak belső transzportfolyamata az endoplazmatikus retikulum sejtmaggal és Golgi-készülékkel alkotott összeköttetésein keresztül valósul meg. Az *AP1S2* (*adaptor related protein complex 1 subunit sigma 2*) az adaptor protein 1 legkisebb, szigma, alegységét kódolja, melynek Golgi-készülék cytoszoli részében jelen lévő clathrin burok kialakításában van szerepe [129]. Az X kromoszómán elhelyezkedő gén exoni régiójának randomizált vizsgálata során derült fény monogénes szerepére szindrómás, fiúkat érintő IKZ hátterében [129]. A *VPS13B* (*vacuolar protein sorting 13 homolog B*) egy cis-Golgi-készülékkel asszociált fehérje, melynek az intracelluláris vezikula transzport során, a szintetizálódó fehérjék eloszlásának irányításában van szerepe. Különböző interakciói révén hozzájárul a Golgi-készülék szerkezeti egységéhez és működéséhez, illetve a neurogenesis során a nyúlványképződésben is szerepe van [130]. Autoszomális recesszív öröklődésmenettel Cohen-szindrómát eredményez, mely a szindrómás ASD formák csoportjába tartozik [35], mivel a globális fejlődésbeli elmaradás, hypotonia és IKZ mellett a súlyos, már gyermekkorban manifesztálódó szembetegségek jelezhetik a szindróma fennállását. A pubertás korban megjelenő obezitás differenciál diagnosztikai nehézséget jelent a Prader-Willi és a Bardet-Biedl-szindróma irányában. Típusos diszomofológiai jegyeik az alacsony növekedés, ízületi hypermobilitás, microcephalia tárulása, arcbenrendezésük esetén vastag szemöldök, lefelé ívelő szemrések jelenléte, illetve a rövid philtrum és myopathiás arcküllem észlelhető [131].

A *DHCR7* (*7-dehydrocholesterol reductase*) a koleszterin bioszintézis utolsó lépésének katalitikus enzimjét kódolja. A KIR minden sejtciklusában a koleszterinnek és származékainak szerteágazó szerep jut, a perifériás koleszterin hatástól függetlenül [132]. Az enzim kóros/hiányzó működése során emelkedik a 7-dehydrocholesterol szint, a koleszterin szint lehet alacsony, de eshet a normális tartományba is [133]. Az anyagcserebetegségek esetében jellemző, autoszomális recesszív öröklődésmenettel, patogén mutáció a Smith-Lemli-Opitz-szindrómát (SLOS, OMIM: 270400) okozzák, melynek cardinális tünetei között az autisztikus vonások megjelenése is szerepel. A

gyanút az anyagcsere vizsgálatok előtt a jellemző klinikai tünetek jelenléte már felkeltheti, ilyen a microcephalia, súly- és pszichomotorosfejlődésbeli elakadás, illetve a többszörös morfogenetikai eltérések jelenléte. Morfogenetikai eltérések közül jellemző a keskeny homlok, az epicantusredő, a micrognathia, a szájpadhasadék és a syn-/polydactylia jelenléte [134].

A velőcső záródási rendellenesség és folsav hiány asszociáció miatt, több neuropszichiátriai betegséggel hozták már összefüggésbe a genetikailag vagy immunológiai okokból létrejövő cerebrális folsav deficienciát [135]. A *FOLR1* (*folate receptor alpha*) gén mutációi súlyos, infantilis kezdetű epilepsziával, fejlődésbeli regresszióval és myelinizációs zavarral járó betegséget képesek létrehozni, melyhez a liquorban súlyosan csökkent 5-methyltetrahydrofolát deficiencia társul [136]. Nem felismert esetekben ez ASD specifikus tünetek megjelenéséhez vezet az ASD specifikus életkorban [136]. A genetikai és immunológiai, folsav receptor antitesttel asszociált betegség elkülönítése fontos az optimális menedzsment és terápia szempontjából [135].

#### 2.3.3.5 A chromatin remodellációban szerepet játszó gének és transzkripció faktorok

Az emberi DNS hiszton fehérjékre tekeredve, nukleoszómák formájában van jelen a sejtekben. A gének transzkripciójához a nukleoszómába rendeződött kromatinnak (heterokromatin) az RNS-polimeráz számára hozzáférhetővé kell válnia, vagyis eukromatinná kell alakulnia, ezt a dinamikus átalakulást nevezzük kromatin remodellációnak. A transzkripció faktorok olyan fehérjék, amelyek a DNS-hez kötődve elősegítik vagy éppen gátolják a gének átíródását mRNS-sé. A KIR kromatin remodellációjában és ezáltal a transzkripcióban szerepet játszó gének, növelhetik, illetve csökkenthetik a szinaptikus rés génjeinek expresszióját, ezáltal modulálva a szinaptikus plaszticitást. A génexpresszió változásának hátterében álló tényezőket epigenetikai faktoroknak nevezzük. Epigenetikai faktorok hatására a DNS szekvencia sorrendjének megváltozása nélkül módosulhat egy gén funkciója. A gén által hordozott információ kifejeződésében, a meghatározott bázissorrenden felül, fontos szerepe van a DNS lánc metilációjának, hisztonok acetilációjának és metilációjának, illetve a nem-kódoló RNS transzkripteknek. Mivel a szinaptogenezissel egyidőben a CpG szigeteken kívüli metiláció észlelhető, feltételezhető, hogy az idegrendszer különböző érési fázisaiban az epigenetikai szabályozásnak fontos szerepe van [137]. Epigenetikai szempontból három különböző folyamat típusban szerepet játszó gént lehet elkülöníteni: azokat amelyek

„írják” a kódot, tehát különböző oldalláncokat illesztnek a DNS-re vagy hisztonra, ezáltal befolyásolva a DNS és hiszton közötti kötéseerősséget, azokat amelyek „törlik” ezt a kódot, tehát leválasztják az oldalláncokat, illetve azokat amelyek „olvassák” és megértik ezt a kódot, tehát a tényleges konformáció változást idéznek elő [138]. A panelünkön szereplő transzkripciós faktorokat és chromatin remodellációban szereplő géneket e szerint a szempont rendszer szerint mutatjuk be [138].

#### 2.3.3.5.1 Az írók

Az „írók” közül a *CREBBP* (*CREB binding protein*) hiszton acetiltranszferáz (HAT) doménje a hisztonok lysin reziduumának acetilációjáért felel, mely aktiválja a transzkripciót, mivel a chromatin kondenzáltságát a hiszton acetiláció csökkenti [139]. A *CREBBP* koaktivátorként funkcionál bizonyos DNS kötő transzkripciós faktorok és RNS polimerázok között [139]. Patogén mutációi vagy genomi lókusának deléciója a Rubinstein-Taybi-szindrómáért felelősek, amely jellemző fenotípusos jegyeivel (széles 1. ujjak, lefelé ívelő szemnyílások, alacsony növény, vastag szemöldök és lecsüngő columella) szindrómás ASD formaként ismert [140].

A hiszton metilációnak transzkripcióra gyakorolt hatása nem annyira egyértelmű, mint a hiszton acetilációé. A panelünkben vizsgált gének közül az *NSDI* (nuclear receptor binding SET domain protein 1) és *EHMT1* (*euchromatic histone lysine methyltransferase 1*) géneknek a hiszton metilációban van szerepük, metiltranszferáz aktivitásuk révén [138]. Az *NSDI* haploinsufficienciája túlnövéssel, IKZ-vel és jellegzetes arcdiszmorfiával járó Sotos-szindróma (OMIM: 117550) megjelenését eredményezi. Bár patomechanizmusa még nem teljesen tisztázott, expressziója és specifikus H3-lizin hiszton metiláló képessége szükséges az intragénikus DNS szakasz metilációjának fenntartásához [141]. Az *NSDI* daganatképződésben játszott szerepét is az intergénikus szakaszok hypometilációjával hozzák összefüggésbe [141]. Az *EHMT1* a H3 hiszton farkok metilációja által szabályozza a chromatin fonal szerkezetét, ezáltal megváltoztatva a DNS hozzáférhetőségét a transzkripciót közvetítő fehérjék számára [142]. Haploinsufficienciája ASD-vel és faciális diszmorfiával járó Kleefstra-szindróma megnyilvánulását eredményezi, melynek patomechanizmusában a nonsense-mediálta mRNS lebomlás áll [143].

Az *AUTS2* (*activator of transcription and developmental regulator AUTS2*) a polycomb repressziós komplex (PRC1) alkotóelemeként a H2A hiszton monoubiquitinációjában

vesz részt. A komplex repressziós aktivitásának semlegesítése révén transzkripciós aktivátorként funkcionál [144]. Rac1-re gyakorolt szerepe által a mikrotubulusok formálódásában és dinamikájában, tehát a citoskeleton remodelációjában is részt vesz [145]. Beunders és mtsai. munkássága révén igazolódott, hogy kópiaszám eltérései fenotípusosan jól körvonalazható szindrómás ASD formát hoznak létre (OMIM:615834), melyeknek fő jellemvonása az ASD mellett az IKZ, a microcephalia és az epilepszia jelenléte [146].

#### 2.3.3.5.2 Radírok

Hisztionok deacetilációja konzerválja a chromatin szerkezetet, ezért a transzkripcióra negatív hatással van. A *PHF6* (*PHD finger protein 6*) gén a nukleoszóma remodeláció és deacetiláz (NuRD) komplex része [147]. Patogén mutációi Börjeson-Forssman-Lehmann-szindrómáért (OMIM:301900) felelősek, amely súlyos IKZ-val, epilepsziával, hypogonadizmussal, gynecomastiával, illetve obezitással jár. Arcdiszomorfológiai szempontból az arc bőrének subcutan megvastagodása, a szűk szemrések és a nagy, nem deformált fülek jelenléte alapján megismerhető [148].

A Cornelia de Lange-szindróma (OMIM:122470) patomechanizmusában is megfigyelhető a hiszton deacetiláció zavara, mely során a cohesin komplex szerkezete megváltozik [149]. A cohesineknek köszönhető, hogy az anafázisig a testvérkromatidák összekapcsoltak. A Cornelia de Lange-szindróma háttérében leírt összes génhiba különböző útvonalakon de mindig a cohesin komplex diszfunkcióját eredményezi [150]. *SMC1A* (*structural maintenance of chromosomes 1A*) gén a cohesin egyik magfehérjéjét kódolja [151]. A *NIPBL* (*NIPBL cohesin loading factor*) pedig a DNS szál cohesin komplexbe való betöltődéséért felel [150]. Bár kézenfekvőnek tűnik, hogy atestvérkromatidák kohéziójának károsodása oki szereppel rendelkezik, mégis a szindróma patomechanizmusának háttérében a távolhatási enhancer-promotor interakció sérülése szerepel, melynek során az génexpresszióaktív hurokkonstrukciója károsodik [151]. A Cornelia de Lange-szindrómát a szindrómás ASD formák csoportjába soroljuk, mivel a jellegzetes felső végtagi destruktív tünetek, az alacsony növés és az arcdiszomorfia mellett, gyakori az ASD jelenléte is [152]. A *NIPBL* haploinsufficienciájához társuló tünetek súlyosabb, míg a *SMC1A* mutációkhoz társuló fenotípus kevesebb minor anomáliával és enyhébb növekedésbeli következményekkel jár [150].

Az *ANKRD11* (*ankyrin repeat domain 11*) az ankyrin repeat tartalmú kofaktor család tagja, ami hiszton deacetilázokkal való kötődése által a ligandfüggő transzkripció aktivációt gátolja [153]. Hypertelorismussal, a felső metszőfogak macrodonciájával és IKZ-val járó KBG szindróma hátterében ismerhetőek fel mutációi (OMIM:148050), mely egyike a leggyakoribb autoszomális domináns öröklődésű IKZ-nak. A gén neurodevelopmentális betegségekben betöltött szerepét az is alátámasztja, hogy kromoszomális lokuszát érintő heterozigóta deléciók ASD és IKZ társulásával asszociáltak [154].

Az epigenetikai „radírok” csoportjában sorolandó a hiszton demetilációjában szerepet játszó *KDM5C* (*lysine demethylase 5C*) gén is, mely a H3K4 tri-, dimetilált formájának demetilációja által csökkenti a transzkripció mértékét [155]. A *KDM5C* több száz gén enhancer régiójához kapcsolódik, expressziójára az *ARX* gén serkentő hatással bír. Nem szindrómás IKZ monogénes formájában írták le funkció vesztő mutációit, amely X-hez kötött öröklődés menetet mutat, de nők is érintettek (OMIM:300534). Erre két eltérő magyarázat létezik, az egyik a mutáció kancsal X inaktivációt eredményező hatása [156], a másik az onkogenesis során észlelt X inaktivációtól független expressziója [157]. A *KDM5C* mutáció fenotípusjegyei között az IKZ és ASD mellett, több esetben említik a microcephalia és epilepszia társulását, egyéb minor fizikális anomáliák mellett [156].

#### 2.3.3.5.3 Olvasók - Chromatin remodelláció effektorai

Az epigenetikai kód olvasóinak azokat a géneket tekintjük, melyek a chromatin remodellációi által elérhetővé teszik a chromatin a leolvasására. Szélesebb körben ide soroljuk az összes transzkripció faktort, melyek DNS kötő doménjeiken keresztül kapcsolódni képesek egy a specifikus DNS szakaszhoz, ezáltal befolyásolva a transzkripciót.

Az ASD patomechanizmusában leginkább szerepet játszó „olvasó” a *MECP2*, amely a metilált CpG gazdag régiókhoz kötődik több száz gén expresszióját befolyásolja [158]. A transzkripció represszoraként szorosan együttműködik a hiszton deacetilázokkal [159]. Az *MBD5* (*methyl-CpG binding domain protein 5*) által kódolt fehérje, szintén tartalmaz metilált CpG kötő domént, viszont azt, hogy ő is kötődne metilált vagy demetilált DNS-hez nem sikerült igazolni. Mivel a heterochromatinnal kolokalizált, ezért valószínű, hogy ennek a kialakulásában és funkciójában van szerepe [160]. Mutációi és deléciója által okozott haploinsufficiencia IKZ, microcephalia és epilepszia megjelenésével asszociált.



A 2q23.1 microdeléciós szindrómában is a *MBD5* lókuszának deléciója hozza létre ezen fenotípusjegyeket [161].

A hatékony és gyors chromatin átrendeződés energia igényes folyamat. A *CHD7* (*chromodomain helicase DNA binding protein 7*) és *CHD8* (*chromodomain helicase DNA binding protein 7*) gének az ATP dependens chromatin remodellátorok helicase családjába tartoznak [162]. A *CHD7* a családra jellemző, N-terminális chromodoménon és a centrális helikáz doménon kívül, más funkcionális doménnel is rendelkezik, mely megteremti más chromatin remodellátorokkal való kapcsolódását [162]. Az előbbi két domén pedig a nukleoszóma DNS mentén történő remodellációjában játszik szerepet. Ubiquitinális expressziójára utal a mutációihoz köthető többszervrendszert érintő fenotípus, mely a CHARGE szindróma megjelenéséhez vezet (lsd. később) [163]. A *CHD8* mutációit az utóbbi 5 évben hozták összefüggésbe monogénes ASD formával [164], korábban ATP dependens hiszton-DNS kötéseket oldó (DNS helicase) enzimként volt ismert, mely a *wnt* (homeobox) jelátviteli útvonalban betöltött funkciója miatt játszott szerepet a korai morphogenesisben [165]. A helicase ATP dependens chromatin remodellátor család egy másik tagja, az *ATRX* (*alpha-thalassemia mental retardation X-linked*) gén terméke, amelyet szintén szindrómás, alpha-thalassémiával járó, ASD forma háttérében írtak már le (OMIM:301040).

Homeobox géneknek nevezzük azokat a géneket melyek egy 180 bp hosszú evolúciósan konzervált homeodómot tartalmazznak. Ezen szakasz megfelelő átíródása és konformációja képes kapcsolódni a DNS-hez. A géncsalád tagjaira különösen jellemző, hogy a szöveti morphogenesis során igen aktívak, mivel különböző kópiáik a test megfelelő szelvényezettségét hozzák létre. Az *ARX* (*aristaless related homeobox*) egy homeobox transzkripciós faktor, melynek hatását az előagy, a pancreas és a herék fejlődésében írták le [166]. A gén mutációit több, major morphológiai eltéréssel társuló, neuropszichiátriai betegség háttérében azonosították, mint a lissencephalia (OMIM:300215), az epilepsziás encephalopathia (OMIM:308350), a corpus callosum agenesia és genitália eltérések társulása (OMIM:300004), illetve a szindrómás és nem-szindrómás IKZ, melyek közül bármelyik társulhat ASD-vel. Transzkripciót befolyásoló hatása mai napig nem teljesen tisztázott, bizonyos mértékű fenotípus-genotípus korreláció viszont észlelhető. Trunkáns mutációi esetében morphológiai eltéréseket, míg polyalanin régió expansiójával járó eltéréseit IKZ és epilepsziás encephalopathia háttérében

azonosítottak [167]. A *HOXA1* (*homeobox A1*) gén terméke az agytörzs, fül, n. abducens, cardiovascularis morphogenesisben játszik szerepet, expressziója az embryogenesis során térben és időben pontosan meghatározott [168]. Homozigóta trunkáns mutációit az Athabascan agytörzsi dysgenesisia szindrómában (OMIM:601536), illetve Bosley-Salih-Alorainy-szindrómában (OMIM:601536) azonosították. Bár a szindrómákat különböző névvel illetik, fenotípusjegyeik nagyon hasonlóak, mindkettőben dominál az agyi morfológiai eltérés, a congenitális horizontális tekintés gyengeség, illetve a sensoneurális halláscsökkenés. Az esetek egy részénél ASD is társult a Bosley-Salih-Alorainy-szindrómához [168]. A *SATB2* (*SATB homeobox 2*) által kódolt, speciális AT gazdag szekvenciákhoz kötődő nucleáris mátrix protein C terminális végén szintén megtalálható a homeodomén szekvencia. Heterozigóta mutációi, az előzőekhez hasonlóan, szintén morfológiai elváltozásokat eredményeznek főleg cranio-faciális részen, illetve IKZ-val társulnak, így létrehozva a Glass-szindróma klinikai képét (OMIM:612313).

A *RAI1* (*retinoic acid-induced protein 1*) egy sejtmagi fehérjét kódol, mely különböző DNS régiók aktív promoter szekvenciája iránt mutat affinitást [169]. A gén funkcióvesztő mutációi szindrómás ASD formához, a Smith-Magenis-szindrómához (OMIM:182290) köthetőek, ahol az ASD, az ADHD és a társuló neurológiai tünetek mellett, rendkívül gyakori az alvászavar jelenléte [170]. A gén a 17-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el, lokusza specifikus lehet mentális betegségek tekintetében, mivel nem csak funkcióvesztése, haploinsufficienciája, de duplikációból adódó többlet is viselkedésbeli tüneteket von maga után [171]. A géntermék a sejtmagban több gén expresszióját segíti. Leginkább kutatott funkciója a cirkadián ritmusban betöltött szerepe [172]. Ezen kívül a Smith-Magenis-szindrómához társuló, életkorral változó expresszivitást mutató dysmorfológiai jegyek miatt valószínűsíthető, hogy a RAI1 protein szerepet játszik az agy, valamint a fej és az arc csontok fejlődésében is [170].

A *MED12* (*mediator complex subunit 12*) olyan a szerepet tölt be a transzkripcióban, mint az állványfehérjék a jelátviteli utakban. A mediátor komplex, amelynek alkotóegységét kódolja egy platformot képez a szekvencia specifikus transzkripciós faktor és a nem specifikus RNS polymeráz II között. Annak függvényében, hogy milyen transzkripciós faktorokhoz kötődik aktivátor és represszor szerepét is betöltheti [173]. A gén hibáját három, különböző fenotípusban megnyilvánuló, szindróma hátterében is kimutatták, a Lujan-Fryns (OMIM:309520), az Opitz-Kaveggia által leírt FG (OMIM:305450) és Ohdo

(OMIM:300895) szindróma hátterében. Mindhárom társulhat IKZ-al, viszont míg az első kettő esetében a macrocephalia, corpus callosum érintettség jellemző, de nem túl specifikus, addig az Ohdo-szindróma esetében a blepharophimosis patognomikus [174]. A kommunikációs céllal használt beszéd eltérései az egyik legfontosabb endofenotípus jegyek ASD-ben. Több olyan ASD kandidáns gént ismerünk, melyek elsődlegesen súlyos beszédzavarral, beszédképtelenséggel asszociáltak. A forkhead transzkripciós faktorokra jellemző a család villa alakú, névadó, DNS kötő doménjének jelenléte, amely mellett egy stabilizáló cink ujj domén is jelen van [175]. A leucin zipzár doméneknek köszönhetően a *FOXP1* (*forkhead box P1*) és *FOXP2* (*forkhead box P2*) hetero- és homodimerek alkotására képes [175]. Eleinte a *FOXP2*, majd a *FOXP1* gén mutációit hozták összefüggésbe különböző mértékű beszédzavarral, mely a megtartott nonverbális IQ szinttel járó gyermekkori verbális dyspraxiától (OMIM:602081), egészen a csökkent IQ szinttel és ASD-vel társuló beszédzavarig (OMIM:613670) terjedhet. Transzkripciós represszor funkciójáért a DNS kötő FOX domén felelős, mely mutációját hotspotként tartják számon a neurodevelopmentális fenotípus hátterében. A betegséggel összefüggésbe hozott mutációk 80%-a ebben a doménben található [175]. Transzkripciós faktorként több jelátviteli út szabályzásában vesz részt, például csökkenti a *CNTNAP2* preszinaptikus sejtadhéziós gén expresszióját, melyet szintén beszédhibával és IKZ-vel járó betegséggel asszociáltak (OMIM: 610042).

A *ZNF804* (*zinc finger protein 408A*) gén bizonyos polymorphismusai rossz verbális képességgel asszociáltak [176]. A *ZNF804A* expressziója a terhesség második trimeszterében volt kimutatható a neocortexben, míg érett KIR esetén hiányzott [177]. Ez az expressziós különbség is támogatja azt az elméletet, miszerint a fejlődés fázisainak csúszása [126], bizonyos kulcsingerek kimaradása vezethet az ASD kialakulásához [177]. A cink ujj proteinek széles funkcionális platformja miatt a *ZEB2* (*zinc finger E-box binding homeobox 2*) által kódolt fehérje is szindrómás ASD forma létrehozásáért felelős [177]. A Hirschprung-kórral, corpus callosum agenesiával, microcephaliával és IKZ-vel járó Mowat-Wilson-szindróma (OMIM:235730) pontos patomechanizmusa ugyan nem ismert, de az igazolódott, hogy a *ZEB2* által kódolt transzkripciós factor hiánya a striatális interneuronok differenciációjához vezet, a corticális interneuronok kárára [178].

### 2.3.4 Epigenetikai tényezők – imprintált gének az ASD hátterében

Egyes állatmodellek arra engednek következtetni, hogy az ASD úgy is tekinthető, mint az agy imprintált betegsége [179]. A KIR génexpressziója során észlelt imprintingnek fontos szerepe van a viselkedés megnyilvánulásában [180]. A szindrómás ASD formával leggyakrabban asszociált imprintált kromoszóma lokusz a *15q11-13* [180]. A lokuszon szereplő *UBE3A* maternális formában expresszálódik a neuronokban, míg a szervezet egyéb területein biallélikusan [106]. Az *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) ugyan ezen a lokuszon elhelyezkedő, kizárólag paternális expresszálódó gén [180]. Ennek megfelelően az *UBE3A* mutációja, ahogy a maternális allél hiánya, illetve a paternális allél uniparentális diszómiaja, intersticiális duplikációja Angelman-szindróma megjelenését eredményezi, ezzel szemben a *SNRPN* delécióna, maternális allél uniparentális diszómiaja, intersticiális duplikációja Prader-Willi-szindróma megjelenéséhez vezet [180]. A Prader-Willi-szindróma kialakulásának hátterében álló mechanizmus eltérő gyakorisággal vezet ASD tünetek megjelenéséhez, uniparentális diszómia esetén magasabb (38%) a valószínűsége, míg delécióna esetén 19% [181].

### 2.4 A mitochondriális diszfunkció szerepe az ASD hátterében:

A mitochondriumok a sejtek energiaellátásáért felelős sejtszervecskék, melyeknek saját, 37 gént kódoló, DNS állományuk van, amelyet mitochondriális DNS-nek (mtDNS) nevezünk. A mitochondriumok rendellenes működése esetén leginkább a nagy energiaigényű szervek károsodnak, ilyen a KIR, az izom, a retina és a vese. Ebből adódóan több KIR-i betegség hátterében feltételezték mitochondriális etiológiát [182]. Klinikai és biokémiai paramétereket monitorozó vizsgálatok is találtak kapcsolatot mitochondriális diszfunkció és az IKZ [183] illetve az epilepszia [184] között.

Az ASD esetében elsőként Lombard és mtsai. feltételezték, hogy mitochondriális diszfunkció következtében alakulhatott ki [185]. Több tanulmány erősített meg ezt a feltevést biokémiai vizsgálatokkal, melyek során emelkedett kreatin kináz, laktát, piruvát, karnitin, alanin és ammonia szinteket észleltek ASD betegek szérumában [183][186][187]. Más esetekben szövettani minták enzimaktivitási méréseivel igazolták a légzési lánc elektrolitranszportjának csökkenését [188], illetve az oxidatív foszforilációban (OXPHOS) szerepet játszó gének csökkent expresszióját figyelték meg [189]. Napoli és mtsai. ASD-s betegek granulocytáinak OXPHOS rendszerében irtak le csökkent aktivitást [190]. Tehát biokémiai vizsgálatokkal jól alátámasztott a

mitochondriális diszfunkció ASD-ben betöltött szerepe. A kérdés az, hogy a mitochondriális diszfunkció jelenléte genetikai okra vezethető-e vissza, tehát primer, vagy valamilyen komplex patofiziológiai hatás következménye, azaz szekunder eredetű [182]. A primer okoknak azokat a sejtmagi- vagy mtDNS-t érintő genetikai eltéréseket tekintjük, melyek valamilyen mitochondriális fehérjét kódolnak és károsodásuk primer mitochondriális betegség (MD) megjelenéséhez vezet. Szekunder okok között környezeti és genetikai hatások is felmerülnek, olyanok melyek direkt módon nem kapcsolhatóak a mitochondriumokhoz, viszont indirekt módon kóros mitochondriális működést eredményeznek [182]. Tekintettel arra, hogy az mtDNS esetében védő funkciót betöltő hisztonok és hibajavító mechanizmusok hiányoznak, a mtDNS deléciók környezeti és egyéb patofiziológiai tényezőkre is okozhatnak, mint az öregedés vagy krónikus betegségek [191][192]. Az ASD esetében kevés olyan komplex genetikai vizsgálat történt, mely a mitochondriális diszfunkciót próbálta magyarázni. Palmieri és Persico [193] és Rossignol és Frye [184] összefoglalói arról tanúskodnak, hogy az esetek csak kis százalékában lehet a biokémiailag kimutatott mitochondriális dysfunkciót speciális genetikai eltérésekhez kötni. Primer MD-t az ASD-vel élők 5%-ban tudtak kimutatni, melyek közül 23%-ban volt jelen mtDNS eltérés [184]. Az mtDNS eltérések közül, mtDNS deléciót (mtdel) négy tanulmány vizsgált ASD háttérben [186][188][194][195], illetve ötödikként munkacsoportunk [196]. A mtDNS deléció lehet major vagy multiplex. Major mtDNS deléciókat progresszív külső szemizombénulás, Kearns-Sayer és Pearson-szindróma háttérben irtak le [207], a multiplex mtDNS deléciók általában nucleáris DNS mutációk következtében másodlagosan alakulnak ki.

Korábbi vizsgálatok szerint mitochondriális dysfunkcióval rendelkező ASD betegeket fenotípus alapján nem lehetett elkülöníteni más idiopathiás/esszenciális ASD betegektől [187]. Weissman és mtsai viszont a mitochondriális dysfunkcióval rendelkező ASD populáció 80%-ban (20/25) talált, olyan klinikai eltérést, mely jellemzőbb a mitochondriális etiológiai háttérre, ilyen a viselkedésbeli regresszió, mely főként infekciók után alakul ki [197].

Korábban a nem-szindrómás ASD formák esetében véleményeztek mitochondriális etiológiát [198], viszont az utóbbi időben szindrómás formák közös útvonalaának példaként is ismert [183]. Erre jó példa a Fragilis X szindrómát okozó *FMRI* gén

fullmutációjához köthető csökken mitochondriális fúzió, mely a FXS-ben leírt károsodott dendrit arborizációjáért felelős [199].

## **2.5 A genetikai diagnosztika szerepe a klinikai gyakorlatban**

Az ASD genetikai háttere nagyon komplex. Az újgenerációs szekvenálási technikák (NGS) elérhetősége óta jelentősen bővült az ASD-vel asszociált gének száma. Annak ellenére, hogy az egyes genetikai eltérések csak az esetek elenyésző hányadát képesek egyesével megmagyarázni, a monogénes formák tisztázása több család esetében jelentős segítség a további gyermekvállalás tekintetében, illetve lehetőséget biztosít a prenatális diagnosztika lehetőségére [36]. Olyan genetikai betegség esetén mely jelentős autizmus rizikóval jár együtt (pl. Fragilis-X, CHARGE, Down syndroma) a megszületés után azonnal lehet készülni tünetek megjelenésére és a lehető leghamarabb el lehet kezdeni a fejlesztést. A genetikai háttér feltérképezése hozzásegít a komplex jelátviteli utak pontosabb megismeréséhez és ezáltal célzott terápia lehetőségével kecsegtet [30][200].

A nemzetközi irányelvek, egyelőre a kiterjedt genetikai vizsgálatok költségvonzata miatt, csak pár ajánlást fogalmazznak meg, mint a Fragilis-X szindróma szűrése, lányok esetében, ahol az ASD IKZ társulása észlelhető, a *MECP2* szekvenálás, macrocephaliával járó ASD formában a *PTEN* szekvenálás [35][30]. Ahhoz, hogy a nemzetközi irányelveket hazánkban is követni tudjuk, szükség esetén kiegészítsük fontos, hogy ismereteket szereznünk a hazai ASD kohort jellemzőiről, genetikai stratifikációjáról.

### 3 Célkitűzések:

Vizsgálatunk célja, hogy az autizmussal korábban asszociált gének eltéréseit és a társuló fenotípust elemezzük magyar autista gyermekekben. A ritka monogénes formák gyakoriságának elemzése mellett a poligénes formák genetikai architektúrájának elemzését tűztük ki célul, valamint arra szerettünk volna választ kapni, hogy az alapos fizikális vizsgálat, a mély fenotípezálás segít-e a szindrómás formák prediktálásában, illetve, hogy eredményeink alapján tudunk – e ajánlást tenni arra vonatkozóan, hogy az ASD diagnózis felállítását követően mikor érdemes – e genetikai vizsgálatokat végezni, illetve, hogy milyen legyen a genetikai diagnosztika vizsgálati algoritmus.

Kohorsz szinten következő kérdéseket igyekeztünk megválaszolni:

- Önmagukban a fenotípus jegyek prediktálják-e a szindrómás formákat?
- A vizsgált betegcsoportban szignifikáns-e a detektált variánsok száma és ez elégséges-e ahhoz, hogy alátámassza egy gén patogenicitását ASD-ben?
- A ritka variáns terheltség korrelál-e az ASD súlyosságával?
- Észlelhetőek-e fenotípus klaszterek és ezek közös genetikai háttérre vezethetőek vissza?
- Azonosíthatóak-e ASD subfenotípusok a fenotípus klaszterek és a detektált ritka variánsok alapján?
- Van-e szerepe az mtDNS eltéréseinek ASD-ben és van-e olyan ritka variáns mely magyarázza ezek jelenlétét?

## 4 Betegek és Módszer

### 4.1 Betegek:

Betegeinket a Vadaskert Alapítvány által működtetett Vadaskert Gyermek- és Ifjúságpszichiátriai Kórház és Szakambulancia illetve saját intézetünk betegei közül szelektáltuk. A gyermekek szülei, hivatalos gondozói beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki Helsinkai Declaráció (1975) értelmében. Vizsgálatunk a ETT-Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével zajlott (44599-2/2013/EKU). 174 beteg (45 lány és 129 fiú, medián életkor 6 év, IQR=7) tett eleget a beválasztási kritériumoknak és tudott részt venni a vizsgálatban sikeres vérvétel után. A beválasztott betegek közül négy testvérpár és egy egypetéjű ikerpár is beválasztásra került. Etnikai hovatartozás szintjén a kohorszunk nagyrészt kaukázusi fehér volt (n=171). Ezen felül két roma származású (n=2) és egy ázsiai gyermek vizsgálatára került sor.

A mitochondriális diszfunkció ASD-ben betöltött szerepének vizsgálatához 60 gyermeket (6 lány és 54 fiú, medián életkoruk 7 év volt, IQR = 7.25) vizsgálatunk meg. Etnikai szempontból 58 beteg kaukázusi fehérnek, 2 romának vallotta magát. Ebbe a vizsgálati kohorszba csakis azok a gyermekek kerültek be, akiknél a Fragilis-X-szindróma (FXS) kizárásra került.

#### 4.1.1 Beválasztási kritériumok:

Az ASD diagnózisát a vizsgálatban közreműködő szakambulancia állította fel standardizált kérdőívek segítségével. A diagnózis felállításához az Autizmus Diagnosztikus Interjú (Autism Diagnostic Interview – Revised, ADI-R) standardizált kérdőívet használtuk, mely jelenleg, az ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) mellett, arany standardnak tekinthető [10]. A kérdőívek, magyar, hiteles fordítását az Autizmus Alapítványon keresztül a Kapocs Kiadótól szereztük be.

#### 4.1.2 Kontroll egyének:

Egészséges kontroll csoportot csak a mitochondriális diszfunkció autizmusban betöltött szerepének tisztázásakor alkalmaztunk. 60 európai, 45 éves kor alatti felnőttet vizsgáltunk meg (26 nő, 34 férfi, medián életkor 28 év, IQR=13,75), melyeket a rendelkezésre álló biobankunkból (Nepsybank <http://molneur.webdokter.hu>) választottunk. A beválasztás



szükséges feltétele az élvezeti szerektől és ismert organikus betegségektől való mentesség és a pszichiátriai betegségek hiánya volt.

Az ASD-ban detektált mtDNS eltérések etiológiájának tisztázása érdekében két NGS panel vizsgálatára került sor, melyekkel 4 különböző csoportot vizsgáltunk. A vizsgálat szerkezetét az negyedik táblázatban mutatjuk be (4. Táblázat). Tíz mtDNS deléciót hordozó ASD-vel diagnosztizált gyermek (PM) genetikai eredményeit hasonítottuk össze, hét mitochondriális delécióval nem rendelkező, ASD-vel diagnosztizált gyermek eredményeivel (C-ASD) eredményeivel, illetve hét ASD-vel nem rendelkező primér mitochondriális beteg (C-MD) eredményeivel és hat egészséges kontroll személy eredményeivel. A C-ASD betegeket az 50 mtDNS delécióval nem rendelkező ASD eset közül válogattuk és kor szerint illesztettük a mtdel-ASD csoporthoz. A C-MD csoport tagjai mind rendelkeztek mtDNS delécióval. A beteg és a kontroll csoportok között rokon kapcsolat nem állt fenn. Az mtdel-ASD csoportban 8 fiút, 2 lányt vizsgáltunk (medián életkora 5 év, IQR = 6,50). A C-ASD csoportban 6 fiú és 1 lány mintájának elemzésére került sor (medián életkora 8 év, IQR = 5.50). Ez a két csoport korban illesztett volt, és az utóbbi csoportba csak nem szindómás ASD eseteket válogattunk. A hét igazolt primér mitochondriális beteg medián életkor 18 év volt, IQR=19, nemek közötti eloszlása 4 férfi, 3 nő. A hat egészséges kontroll csoportban 1 férfit és 5 nőt vizsgáltunk (medián életkora 27, IQR = 2.25).

**4. Táblázat:** Az ASD és mitochondriális diszfunkció korrelációjának vizsgálatához alkalmazott beteg csoportok bemutatása és a vizsgálat mente. Intergenomiális kommunikációt (IG NGS) és ASD-t vizsgáló (ASD NGS) panel vizsgálat csak kisebb esetszámon került elvégzésre (a, b). Primér mitochondriális betegek esetében csak az intergenomiális panel (IG NGS) volt elérhető.

Csoportok	m.3243 A>G, m.8993 T>C/G, m.8344 A>G	mtDNS deléció	IG NGS (51 gén)	ASD NGS (101 gén)
ASD csoport (n=60)	✓	✓	✓ <sup>a</sup>	✓ <sup>a</sup>
Egészséges kontroll (n=60)	✓	✓	✓ <sup>b</sup>	✓ <sup>b</sup>
C - MD (n=7)	✓	✓	✓	-

<sup>a</sup> 10 mtdel-ASD beteg (PM) és 7 non-mtdel ASD beteg (C-ASD) esetében került sor mindkét NGS panel elvégzésére (n=10+7)

<sup>b</sup> az egészséges kontroll csoportból csak 6 egészséges, fiatal felnőtt esetében NGS vizsgálatára került sor

#### **4.2 Neurológiai és belgyógyászati vizsgálat**

Az összes beteg fizikális vizsgálati státuszát két ugyanazon orvos rögzítette. A vizsgálatot megelőzően részletes kérdőívvel igyekeztünk az anamnesztikus adatokat is összegyűjteni (Klinikai Kérdőív). Ezt követte a minor fizikális anomáliák (MPA) feltérképezése a Méhes skála alapján [201]. Ezt az 57 morfológiai eltérést tartalmazó skálát kiegészítettük macro-, microcephalia pontokkal, az általános ízületi mobilitásra utaló kérdéssel illetve, egy-egy az arcot érintő gyakori, több esetben nagy jelentőséggel bíró anomáliával, mint például a hosszúkás arc, özvegy csúcs (Widow's peak).

A belgyógyászati vizsgálat során, mindazoknál a gyerekeknél, akiknél lehetett az esetleges vezetési zavarok, hosszú QT-szindróma felismerése érdekében EKG-t készítettünk, a rendelkezésre álló hasi ultrahang leletet rögzítettük. Az addig már esetleg sebészileg megoldott fejlődési rendellenességet is rögzítettük, mint a rejtettheréjűség, fitymaszűkület vagy a letapadt nyelv.

A neurológiai vizsgálatkor neurológiai gócjeleket kerestük, melyek az ASD mellett egyéb KIRi strukturális eltérésére engednek következtetni. A szenzoros rendszer vizsgálata során a kooperáció hiánya miatt sokszor nem tudtunk informatív adatokat nyerni.

A pszichiátriai státusz felmérés során az autizmus specifikus tünetek mellett (szemkontaktus hiánya, sztereotip mozgásformák, beszédzavar) rákérdeztünk egyéb gyakori társtünetek jelenlétére, pl. önsértő magatartás, memória romlás, hiperaktivitás. Az intelligencia hányados számszerű rögzítésére nem került sor, a társuló IKZ-t tájékozódó vizsgálattal és korábbi szakvéleményekre alapozva azonosítottuk.

Családi anamnéziszről az ADI-R, és az általunk kidolgozott kérdőívek is szolgáltatottak adatot. A szülői életkorról és a szülők iskolázottsági fokáról, egyéb szocio-kulturális és környezeti tényezőkről a szülőknek adott önkitöltős kérdőív nyújtott adatot.

Koponya MRI nem volt szükséges a projektben való részvételhez, azonban 39%-ban rendelkezésre állt, így ezeket is rögzítettük.

#### **Standard diagnosztikus eszközök:**

Az ADI-R autizmus-specifikus standardizált, félig strukturált, formális, szülő/gondozó interjú alapultó terjedelmes kérdőív, mely célzottan térképezi fel a gyermek fejlődését és

viselkedését. Célja, hogy életre szóló fejlődéstörténeti keretet mutasson a vizsgált páciensről és, hogy információt adjon a beteg aktuális (legutóbbi 3 hónap) funkcionális állapotáról. A teszt pontozása erre speciálisan képzett szakembert igényelt. A teszt 18 hónapos kortól alkalmazható. BNO rendszer diagnosztikus kritériumain alapul, ezért 3 fő téma körül csoportosulnak a teszt kérdései: 1.) szociális interakciók ( $A \geq 10$ ), 2.) kommunikációs képességek ( $B \geq 7$ ), 3.) sztereotip mozgás/viselkedésformák ( $C \geq 3$ ). A tesztnek van egy negyedik pillére is, mely pontozandó ( $D \geq 1$ ), ez a gyermek 3 éves kor előtti időszakára kérdez rá, mivel a diagnózis szerves részét képezik azok az információk is, melyek a gyermek diagnózisának felállítása előtti időszakban történtek.

Az ADOS egy standardizált, félig strukturált megfigyelésen alapuló teszt, mely során egy előzetesen képzett szakember különböző feladathelyzetekbe, szociális nyomás alá helyezi a vizsgált személyt. A vizsgálatához az ADOS 4 különböző modulja áll rendelkezésre, melyből a beteg kora és verbális képességei szerint kell választani. Az első modult 31 hónapos kortól ajánlják nem beszélő egyéneknek, a második modul gyermekkorban ajánlott nem folyamatos beszéd esetén, a harmadik és negyedik modul jó verbális képességekkel rendelkező egyének esetén ajánlott attól függően, hogy még szívesen használ-e szórakozásképpen játékokat, vagy már kinőtte e szokásokat. Összesen 47 esetben került sor ADOS vizsgálatra, 16 esetben az 1-es, 18 esetben 2-es, 5 esetben a 3-as és 8 esetben a 4-es modul felvételére. Mivel az ADOS jól alkalmazható minden korcsoportú és képességű autizmussal élő esetében, standardizáltsága miatt autizmus súlyosságával korreláltható. Vizsgálatunkban az autizmus súlyossági mutatójaként totál ADOS pontszámot illetve, Gotham és mtsai. alapján kalibrált ADOS súlyossági értéket számoltunk (Calibrated Severity Score, ADOS CSS) [13].

### **4.3 A gépi tanulási módszertan az ASD kutatásban**

A kohorszunk kis részénél ( $n=49$ ) lehetőségünk nyílt külföldi kollaboráció keretén belül a Face2Gene (<https://www.face2gene.com/>) mestersége intelligencia alapú döntéstámogató rendszer vizsgálatára is, mely elvégezte a betegek által rendelkezésünkre bocsátott fényképek alapján kinyert antropometriai adatok illesztését, egy gépi tanulást implementáló algoritmus segítségével, az ismert arcdiszmorfiák keresési terében. Összesen 27 arcdiszmorfiával rendelkező (autism with facial dysmorphism, AFD) és 22 arcdiszmorfiával nem rendelkező (autism without facial dysmorphism, ANFD) beteg esetében került sor az elemzésre, 50 kontroll személy mellett, melyeket a kollaborációs

partnerünk saját adatbázisából választott ki. Az AFD csoportban 24 fiút 3 lányt vizsgáltunk, medián kor 9, IQR=9,5, az ANFD csoportban 21 fiút és 1 lányt vizsgáltunk, medián kor 6, IQR=3.

#### **4.4 Genetikai vizsgálatok**

A vizsgálat során vérből izoláltunk DNS-t QIAamp DNA blood kit-el, a gyártó által megadott használati útmutató szerint.

Elsőként a FXS kizárására került sor, mivel ez NGS metodikával nem vizsgálható, mert repeat betegség. Az FMR1 gén repeat expansio vizsgálatára Amplidex FMR1 PCR kit-et alkalmaztunk. A pozitív eseteket kivettük a fenotípus klaszter-analízisből. A további genetikai tesztek NGS panel vizsgálatok voltak. Az NGS alapú technológiák segítségével lehetőségünk nyílt sok DNS szakasz (gén) egyidejű elemzésére. A vizsgálatot Illumina MiSeq platformon végeztük, az Illumina által forgalmazott TruSight Autism Panel-el, mellyel 101 ASD szindrómás és nem szindrómás formái háttérében álló gén vizsgálható. A vizsgált gének listáját, ezek ASD-ben betöltött szerepét és az evidencia erősségét mutató “sfari gene score”-t (<https://gene.sfari.org/>) a Bevezetés c. fejezet 3. Táblázatban került bemutatásra.

A mtDNS hotspotok vizsgálata során az mtDNS deléció vizsgálatokat long range PCR-rel végeztük a Reményi és mtsai által alkalmazott technika szerint [202]. A 3 leggyakoribb mtDNS pontmutáció (m3243 A>G, m.8993 T>C/G, m.8344 A>G) [188] szűrését PCR-RFLP-vel végeztük.

Azokban az esetekben, ahol mtDNS deléció igazolódott, az ASD panelen túl, az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének panel vizsgálata is megtörtént (IG-NGS), annak érdekében, hogy egy esetleg primér mitochondriális betegség felismerhető legyen. Ehhez a Pentelényi Klára által összeállított, az mtDNS fenntartásában fontos szerepet játszó 51 gén került vizsgálatra [203]. A vizsgálathoz SureSelect QXT könyvtárkészítő kit-tet használtunk.

Az ASD panel vizsgálata során a TruSight Autism Rapid Capture Kit-tel történt a könyvtárkészítés (Illumina, CA, USA). Az analízis 3 fő lépésben zajlott. Könyvtárkészítés során a DNS molekulát enzimatis módon, transzpozáz segítségével, 100-150bp-os szakaszokra fragmentáljuk, melyekhez ligáció során adapter szekvenciákat illesztünk. Az adapter szekvenciák a DNS fragmenst a flowcell-re horgonyzott szekvenáló primerhez illesztik, majd hídamplifikáció során megtörténik a szakaszok

felsokszorozása. A klonális amplifikáció Illumina platformon PCR alapon történik, így szintézis során polimerázok segítségével épülnek fel a láncok, melyekbe az egyes szekvenáló ciklusokban egy-egy fluoreszcens reverzibilis terminator nucleotid épül be. A jelölt nucleotidok beépüléséből adódó fényfelvillanást a CCD kamera detektálja. Ebből a képi információból a szekvenáló platformhoz kapcsoltn generálódik a FASTQ file, mely a nyers szekvencia adatok standard formátuma. Megfelelő lefedettség érdekében ASD panel során 24 mitát futtattunk MiSeq reagens Kit-tel, v2, 300 Ciklus (Illumina, CA, USA). Az átlagos lefedettség ASD panel esetében 135x-ös, míg IG panel esetében 152x-es volt, a target szekvenciák 90%-ban legalább 20x lefedettséget értünk el.

Azokban az esetekben ahol felmerült a detektált ritka variáns alapján szindrómás ASD lehetősége, Sanger szekvenálással elemeztük az elérhető szülői mintákat is.

#### **4.5 Bioinformatikai elemzés**

Az NGS-ből származó nagy mennyiségű adat csak további bioinformatikai elemzés után válik értékelhetővé. A nyers szekvencia adatokat Picard parancssori alkalmazás lépéseivel szűrtük (Picard tools version 2.1.0) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). A kapott FASTQ fájlok már tartalmazzák a szekvenciák minőségi mutatóit is, ezek hg19 referencia genomhoz való illesztése utána BAM fájlokat nyerünk. Az illesztéshez BWA-mem szoftvert használtunk [204]. Mivel a BAM fájlok vizualizálhatóak, ezekből lefedettségi adatok is kinyerhetőek. A variáns hívás 3 lépésben a GATK HaplotypeCaller (3.3-0) szoftver alkalmazásával történt [205]. A VCF file (variant calling file) által tartalmazott variánsok értékeléséhez annotációra van szükség, melyhez a SnpEff (4.1) szoftvert használtuk [206]. Csak a gén kanonikus transzkriptjében szereplő variánsok kerültek elemzésre, ezek közül is azok melyeket a bioinformatikai elemzés megfelelőként (PASS) jelölt (RD>10, Mapping quality>40, Quality by depth>2).

##### **4.5.1 Variáns prioritizálás, értékelés:**

A variánsok értékelése során a pár százas annotált variáns listából ki kellett választanunk azokat, melyek a tünetek, az öröklődésmenet és a fehérjefunkciót befolyásoló hatás szempontjából szóba jöhetnek, mivel monogénes betegségek esetén egy-két, tünetekért felelőssé tehető, variánst keresünk. Variant Analyzer szoftver használatával először kizártuk a *samesense* eltéréseket, majd a megmaradt *missense* variánsok közül szűrtük a HGMD [207] és ClinVar [208] adatbázisokban patogénnek minősített variánsokat. Ezek mellett megtartottuk a nagy és a közepes hatású variánsokat (*stop-*, *framshiftet* okozó

mutációkat), majd kizártuk az 5% minor allél frekvenciánál (MAF) gyakoribb variánsokat. A variánsok allél frekvencia adatát a szoftver az 1000Genom és ExAC adatbázisokból annotálta. Ezen a gondolatmeneten továbbhaladva kizártuk azokat a nem szinonim variációkat melyek a vizsgált kohorszunkban több mint négy betegben voltak jelen. Továbbá az allélgyakoriságot ellenőriztük saját 200 teljes exom adatbázisunkon is. *Missense* mutációk esetében, melyek klinikai hatásáról a különböző adatbázisok nem-, vagy csak kevés információval rendelkeztek, fehérje funkciót befolyásoló hatást prediktáló szoftverek által meghatározott scoreokat is figyelembe vettünk. Ilyen predikációs szoftverek, például, Polyphen 2 HVID [209], SIFT [210], Mutation t@ster [211], mutation accessor [212], CADD [213], radial SVM [214]. Ezen felül a nukleotid evolúciós konzerváltságát figyelembe vevő GERP score-t is használtuk [207]. A variánsokat végül az American College of Medical Genetics (ACMG) irányelvek alapján rangsoroltuk patogén (P), valószínűleg patogén (likely pathogenic, LP), ismeretlen klinikai jelentőségű (Variant of Unknown Significance, VUS), valószínűleg benignus és benignus osztályokba [215]. Megegyező fenotípusú testvérek esetében csak azt a variáns vettük figyelembe, mely a testvérpár mindkét tagjában jelen volt. Mivel variáns specifikus annotációk alapján gyakran nem sikerült közelebb jutni simplex esetekben egy specifikus variáns klinikai jelentőségéhez, gén specifikus annotációkat is alkalmaztunk kohorsz szinten.

#### **4.6 Statisztikai elemzés**

A ritka variánsok elemzésére egy multifaktoriális hypothesis keretén belül, kohorsz szinten a következő módszereket alkalmaztuk. A módszerek kidolgozását és alkalmazását Bolgár Bence (Budapesti Műszaki Egyetem) és Balicza Péter (Semmelweis Egyetem) végezték. Először a Rao és Nelson által leírt módszerrel teszteltük, hogy egy adott génen belül a detektált funkcionális variánsok száma nagyobb-e az elvárhatónál [216]. Funkcionális variánsoknak tekintettük a missense, nonsense, frameshift és splice-site mutációkat. Szignifikancia szinthez a SORVA (Significance Of Rare Variants) szoftver (<https://sorva.genome.ucla.edu/>) által számolt P-értéket használtuk. A ritka variáns terheltség meghatározása céljából a géneket a mutációkkal szembeni genetikai intoleranciájuk szerint rangsoroltuk [217], úgy hogy az RVIS értékük alapján egy súlyszámot rendeltünk a génekhez, az inverz RVIS percentilis meghatározásával. Ez utóbbit a következő képlet alapján határoztuk meg:  $[1-(RVIS \text{ percentile} \div 100)]$ . Ez azt

jelentette, hogy amennyiben egy gén RVIS értéke 2%-os tartományba esett, a gén 0,98 súlyszámot kapott. A génekhez rendelt RVIS értéket a <http://genic-intolerance.org/> oldalon keresztül értünk el. (3. Táblázat) Ez után, ahhoz, hogy betegre lebontva a variánsok számát összegezni tudjuk, vagyis meghatározzuk az egyénekenkénti variáns terheltséget, a következő képletet használtuk:  $[\sum(\text{variáns } x \text{ gén súlyszáma})]$ . A variáns terheltség vizsgálatánál a testvéreket külön-külön elemeztük, mivel feltételezhető, hogy a különböző ritka variánsok hozzájárulhatnak a családon belüli eltérő fenotípus jegyekhez. A ritka variáns terheltség és az ASD súlyossága közötti korreláció megítélésére lineáris regresszió analízist végeztünk. Hasonlóképpen a variáns terheltség és a MPA-k száma közötti kapcsolat feltérképezéséhez is. Az ASD súlyosságának számszerűsítéséhez össz-ADOS pontszámot és kalibrált súlyossági pontszámot (ADOS CSS) használtunk, utóbbit a Gotham és mtsai. által leírt módszer alapján számoltuk [218]. A ritka variáns terheltség nemek közötti különbségének megítélésére, illetve a szindrómás és nem-szindrómás ASD formák közötti MPA terheltség összehasonlításához kétmintás T-próbát alkalmaztunk. Tekintettel a kis esetszámba, a mtDNS deléció ASD-ben betöltött szerepének megítéléséhez  $\chi^2$ -próbát végeztünk Yates féle korrekcióval, illetve a Fisher egzakt próbát a csoportokon belüli különbségek megítélésére. Különböző gépi tanulási technikák alkalmazásával (spektrális klaszterezés, PCA) fenotípusos klasztereket azonosítottunk és vizsgáltuk a homogén genetikai háttér lehetőségét a fenotípus klasztereken belül. A fenotípus klaszterezés során 149 klinikai kérdőív adataiból dolgoztunk, melyek tartalmaztak információt családi anamnézis, társbetegség, farmakológiai anamnézis tekintetében is, a neurológiai tünetek és MPA-k feltérképezésén túl. A fenotípusra vonatkozó klaszteranalízishez, tekintettel a kohorsz méretére és arra, hogy a klaszterek várható száma alacsony, két kernel-alapú adatbányászati eljárás került alkalmazásra, nevezetesen kernel főkomponens analízis (PCA) és spektrális klaszterezés. A kernel módszerek egyik előnye, hogy nem-lineárisak, azaz képesek a klinikai változók nem-lineáris kombinációját, mint releváns tulajdonságot azonosítani. Ehhez egy ún. kernel mátrixot kell definiálni, amely tekinthető a minták felett értelmezett páronkénti hasonlósági mátrixnak. A korábbi tanulmányoknak megfelelően a spektrális klaszterezés során használt klaszterek számát négyre állítottuk. Megvizsgáltuk az egyes klaszterekre jellemző változókat is olyan módon, hogy kiszámoltuk az egyes tulajdonságok jelenlétének relatív gyakoriságát (minden egyes klaszter esetében). A kernel PCA-val az

adatokat egy három dimenziós térbe képeztük le azért, hogy ábrázolni tudjuk a transzformált mintákat és azt, hogy melyik minta melyik klaszterbe sorolódik. Felvetődött a kérdés, hogy van-e korreláció az alfenotípusok és a detektált ritka variánsok között, amely arra utalhat, hogy bizonyos géneknek a fenotípusos jegy létrehozásában oki szerep tulajdonítható. Esetünkben a fenotípus klaszterek klinikai jegyeit a klinikai kérdőívekből nyertük, míg a genetikai háttérre vonatkozó adatokat a megfigyelt ritka variánsok jelentették, génenkénti összesített formában. A fenotípusok altípusai és a genetika háttér közötti korreláció értékelésére megvizsgáltuk, hogy a jelölt gének megfigyelt ritka variánsai megnövekedett gyakorisággal fordulnak-e elő valamelyik klaszterben. Vizsgálatunkhoz ANOVA-t és páros t-próbát használtunk Bonferroni korrekcióval a többször hipotézis-vizsgálat miatt.

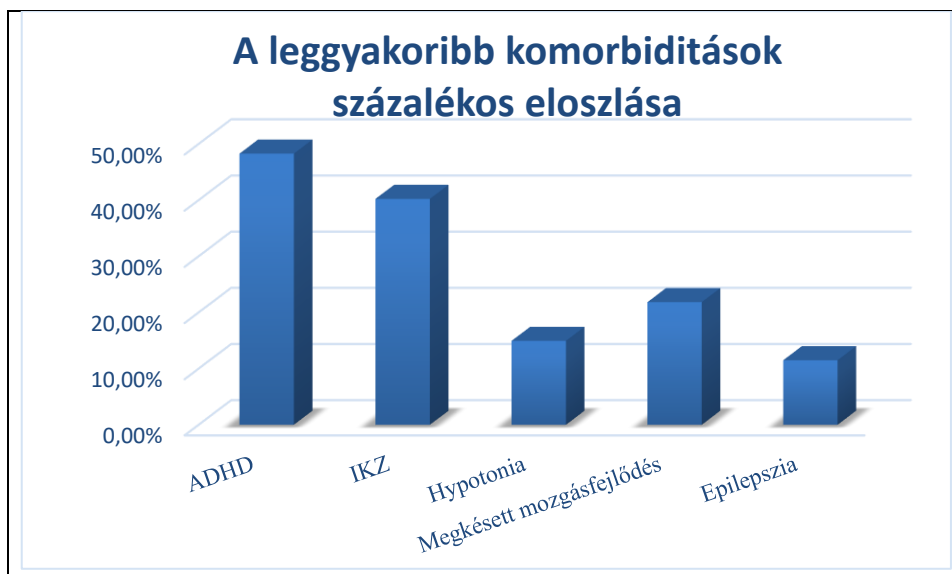


## 5 Eredmények

### 5.1 A kohorsz demográfiai és fenotípus elemzése

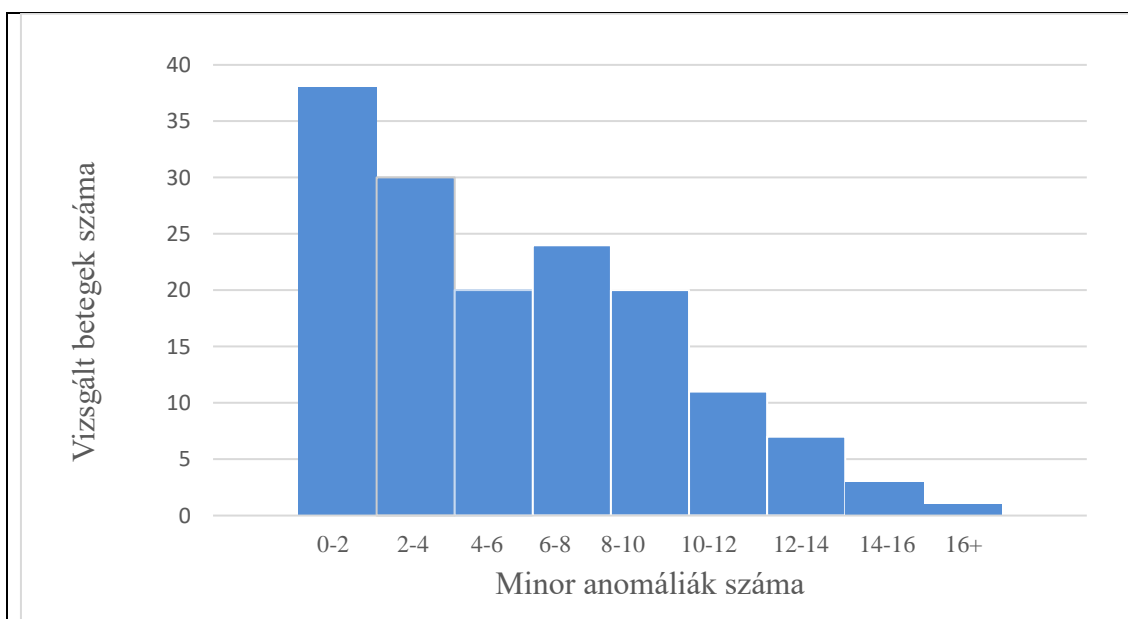
A vizsgálati kohorszba 174 ASD beteg került beválasztásra, 45 lány és 129 fiú, melyek között öt testvérpár volt. A kohorszunk klinikai-demográfiai adatait az 5. Táblázatban foglaljuk össze. Az ASD mellett leggyakrabban észlelt komorbiditásokat az 2. Ábrán szemléltetjük.

<b>5.Táblázat: A vizsgált betegpopuláció főbb demográfiai jellemzői</b>	
Nemek	Fiú/lány= 129/45 =2.86/1
Median Életkor (IQR)	6 (7) /5 (7)
Átlag ADI-R modulok pontszámai:	
Reciprok társas interakciók	23±5,2
Reciprok kommunikáció (Verbalis/ NonVerbalis)	13,95±4,2 / 18,48±2,5
Repetitív, beszűkült viselkedés	6,66±2,1
Átlag ADOS pontszám	21,2±5,7
Etnikumok:	
Magyarnak vallott	171
Romának vallott	2
Egyéb	1
Anyai életkor a fogantatáskor (95% CI)	30,7±1,05
Apai életkor a fogantatáskor (95% CI)	33,4±1,29
Szülők iskolázottsági foka	
Főiskola vagy afeletti végzettség mindkét szülő esetén	34 %
Főiskola vagy afeletti végzettség egyik szülő esetén	27 %
Középiskolai vagy ez alatti végzettség mindkét szülő esetén	39 %

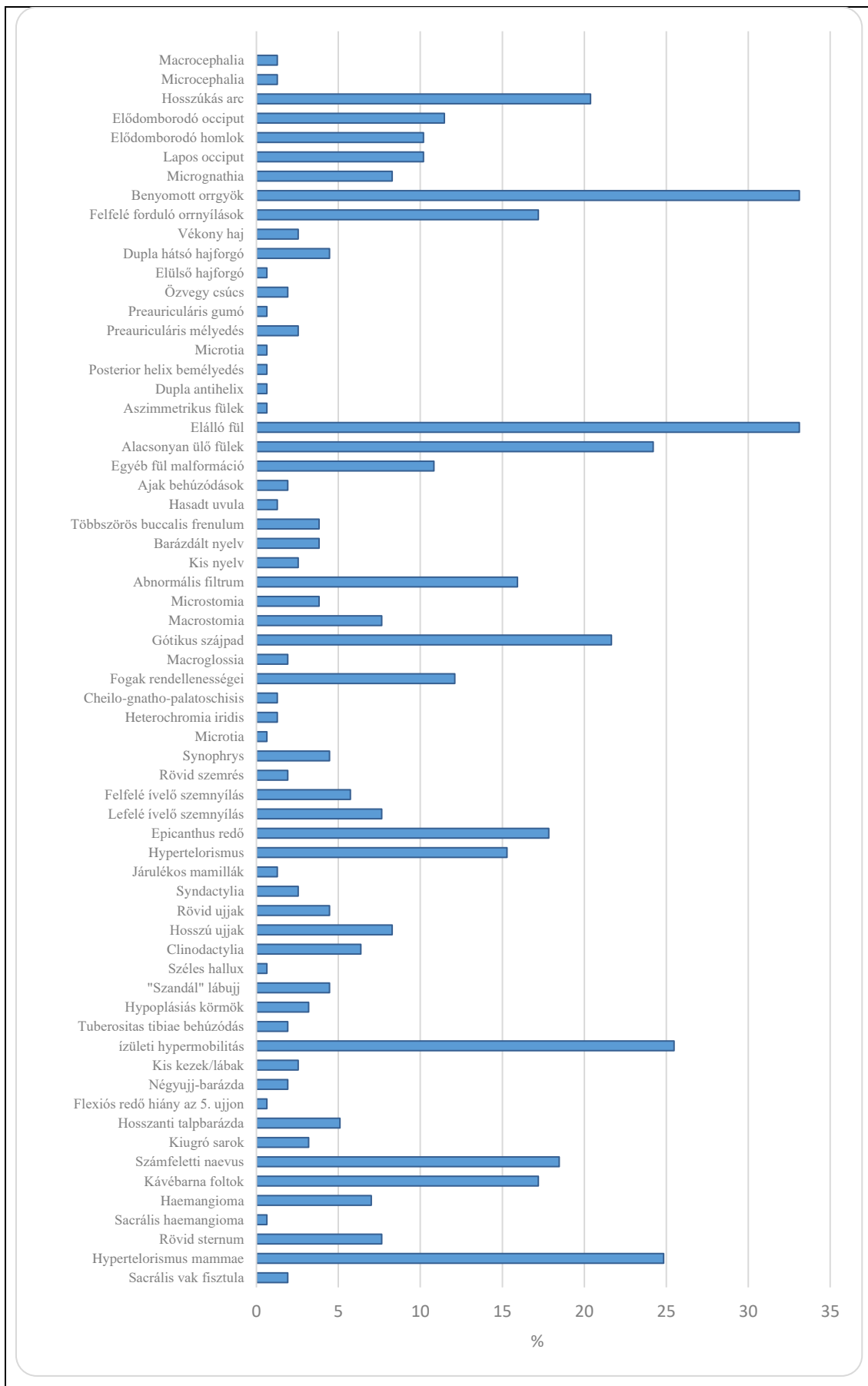


**2. Ábra:** A diagramm a kohorszunk leggyakoribb komorbiditásait mutatja be, százalékos eloszlásban.

A MPA-k feltérképezése során azt találtuk, hogy a kohorsz 84%-a rendelkezett legalább egy morfogenetikai rendellenességgel. A molekuláris háttérrel megerősített szindrómás ASD esetek átlagosan nem rendelkeztek több MPA-val mint a nem szindrómás ASD-vel rendelkező betegeink (szindrómás formáknál a minor malformációk aránya 4,9/egyen volt, míg a nem szindrómás eseteknél 5,03/egyen, T teszt  $p=0,91$ ). A kohorsz MPA telítettségét a 3a. Ábrán mutatjuk be, míg a különböző MPA-k prevalenciáját a 3b. Ábrán.



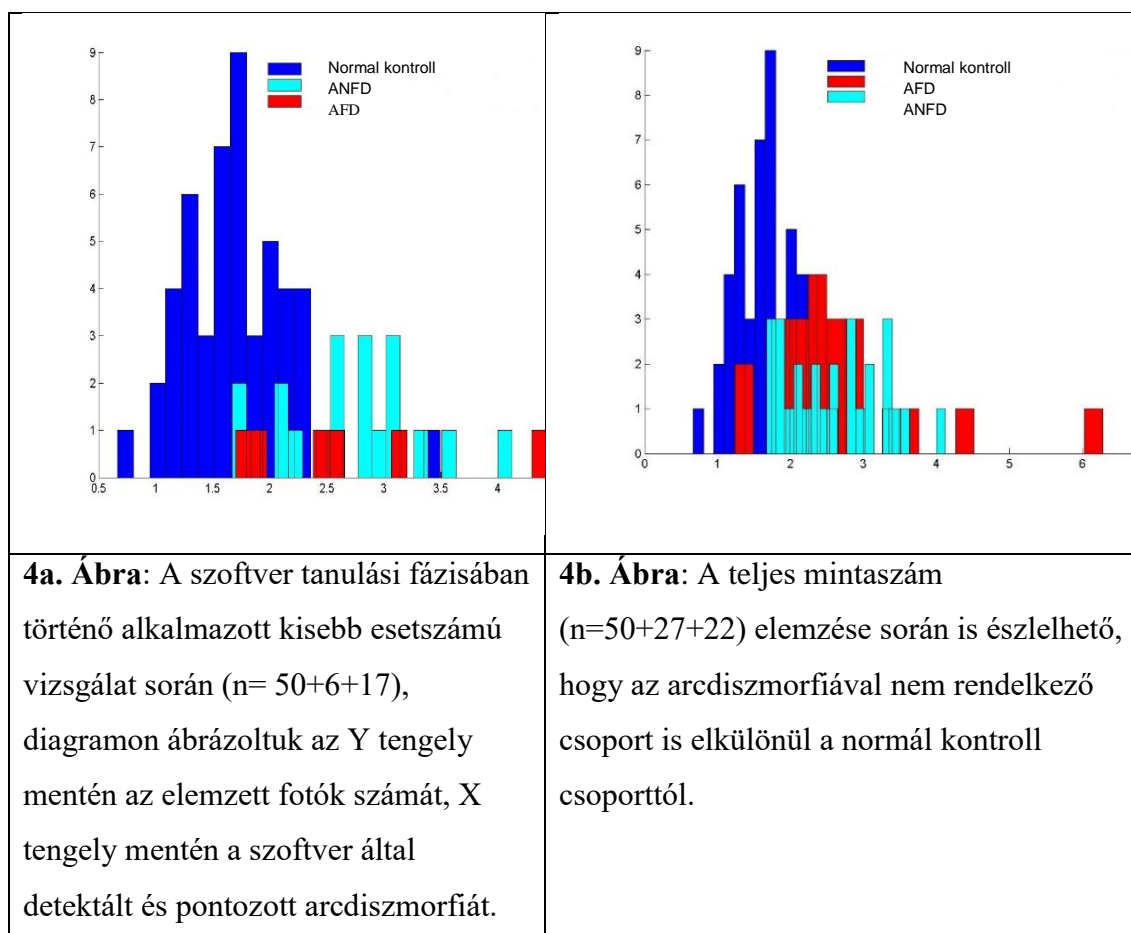
**3a. Ábra:** A hisztogram a kohorszunk MPA terheltségét mutatja be. Egyénenként általában több MPA fordult elő.



**3b. Ábra:** A különböző MPA-k prevalenciája a vizsgált populáción belül.

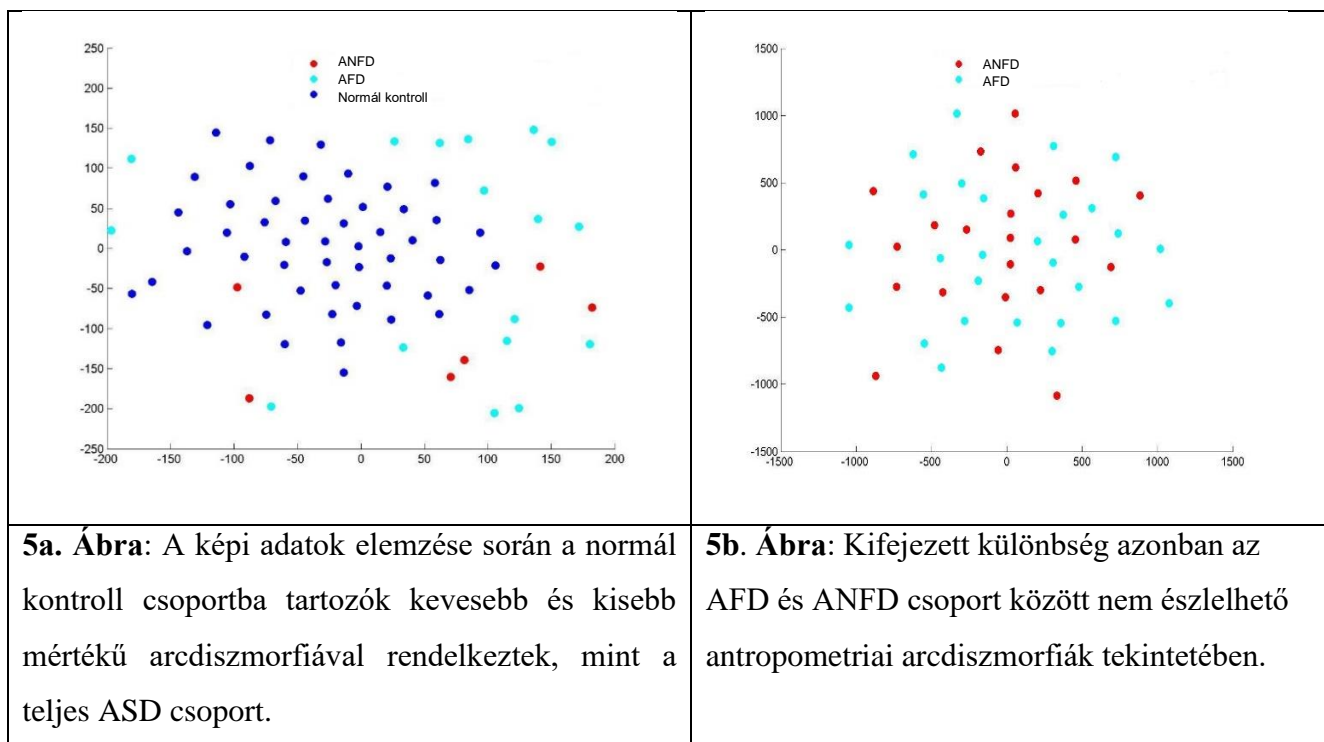
A monogénes háttér legerősebb indikátorai az ASD mellett jelenlévő IKZ, epilepszia voltak, illetve a társuló neurológiai tünetek (pl. ataxia). Bár önmagában az MPA-k halmozott jelenléte alapján nem lehetett következtetni szindrómás ASD formára a MPA-k specifikus konstellációi alapján már lehetett következtetni monogénes háttérre, mint például a Fragilis-X szindróma vagy CHARGE szindróma esetében.

A Face2gene szoftver segítségével, a külső fenotípusos jegyek mesterséges intelligencián alapuló vizsgálata során, a három különböző csoportban (AFD, ANFD, kontroll) egyértelmű trendek mutatkoztak diszmorfológiai variációk tekintetében. Annak ellenére, hogy az ANFD kohorszot arcdiszmorfiát nem mutató csoportnak tekintettük a szoftver ezt mégis automatikusan elkülönítette a nem érintett kontrolloktól. (4. Ábra)

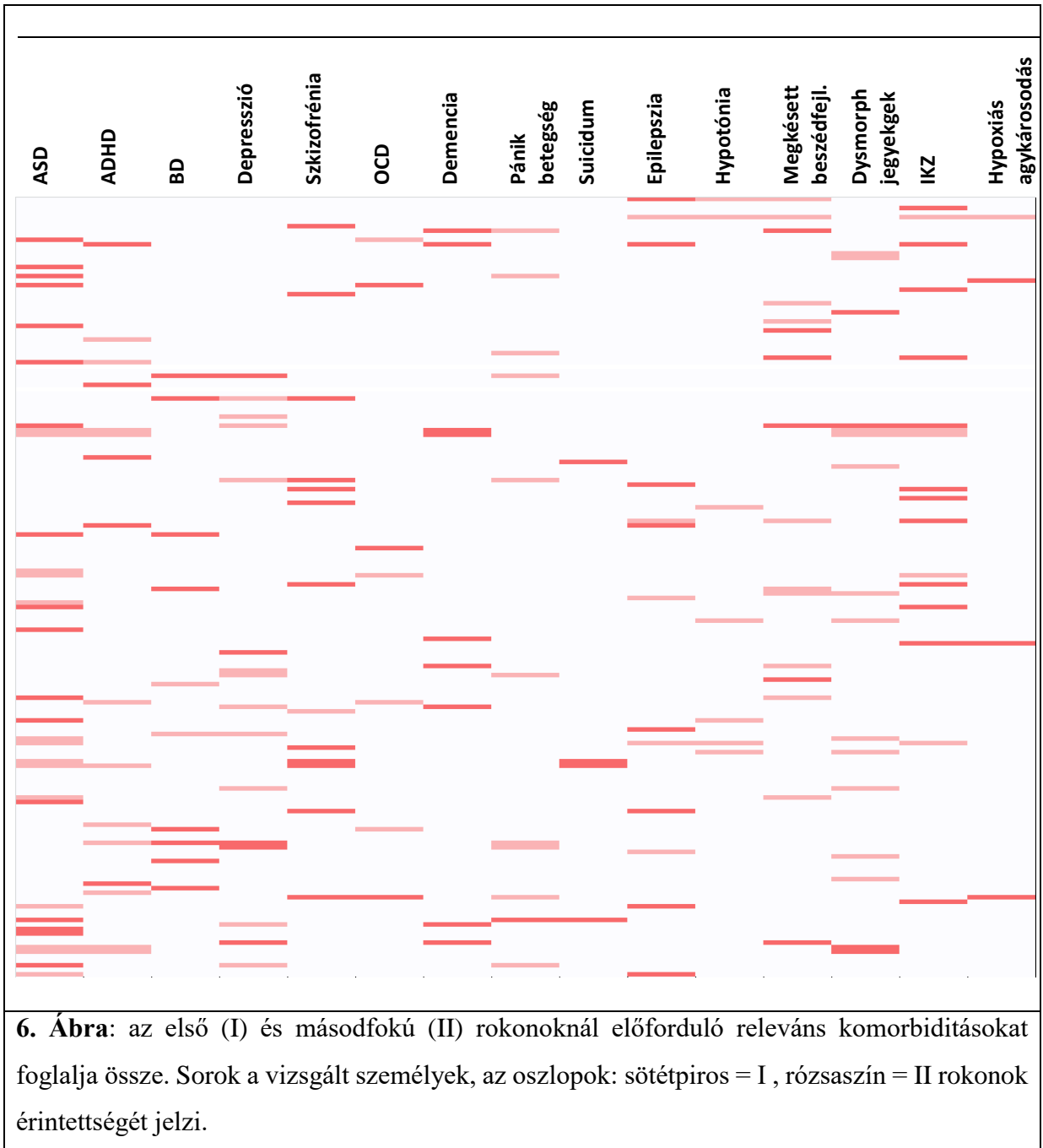


Pontdiagramon ábrázolva a különböző vizsgált egyéneket arcdiszmorfiájuk alapján, a tanulási fázisban szintén észlelhető, hogy kontrollokat inkább a [0,0] középpont köré

értékeli a szoftver (5a. Ábra), viszont a teljes kohorsz vizsgálata során már nem tudott antropometriai különbséget azonosítani az AFD és ANFD csoportok között. (5b. Ábra)



Sok esetben számoltak be pozitív családi anamnézistről a kérdőívet kitöltő szülők a pszichiátriai, illetve neurológiai betegségek tekintetében. A családban előforduló betegségeket az 6. Ábrán mutatjuk be, különbséget téve első- illetve másodfokú rokon kapcsolat között. Első fokú rokonok között 14 esetben fordult elő ASD (8%), míg másod fokú rokonoknál 17 esetben (9,7%). 158 simplex esetet vizsgálatunk, 2 család esetében családi anamnézis nem volt ismert, mivel örökbefogadott gyerekekről volt szó. További pszichiátriai betegségek közül megkésett beszédfejlődés és az IKZ került gyakran említésre, előbbi első fokú rokonok esetén 10%-ban, másodfokú rokonok esetén 6%-ban, utóbbi 5, illetve 11%-ban. A családban előforduló pszichiátriai betegségek különböző súlyosságúak voltak, volt olyan aki post-partum depressziós epizód miatt tekintette pozitívnak családi anamnéziséét, de olyan is volt, akinél több felmenő között fordult elő suicidum, vagy suicid kísérlet. A neurológiai betegségek közül az epilepszia 2,8% illetve 4%-ban fordult elő az első-, illetve a másodfokú rokonok között. Izom hypotónia előfordulását csak az elsőfokú rokonok között jelezték, 7%-ban. Fejlődési rendellenességek (dysmorph jegyek) az első fokú rokonok 2%-ban, a másodfokú rokonok 4%-ban jelentkeztek. A családtagokban említésre kerülő dysmorph jegyeknél előfordult



syndactilia, ajakszájpadhasadék, rövidült nyelvfelek, de fülkagyló hiány, Dandy-Walker malformáció és kézujjak hiánya is.

Összesen 6 család esetében volt korábbról már ismert monogénes betegség, 2 esetben Duchenne izomdystrophia, 1-1 esetben Charcot Marie Tooth betegség, neurofibromatózis 1-es típusa, 1 esetben policisztás vesebetegség, 1 esetben Cri-Du-Chat-szindróma.

### 5.2 Szindrómás formák:

Összesen 13 esetben tudunk kutatási projektünk keretében szindrómás autizmus formát genetikailag igazolni, melyeket főbb klinikai jellemzőikkel és genotípus adatokkal a 6. táblázatban foglalunk össze (6. Táblázat).

**6. Táblázat:** Vizsgálatunk során igazolt szindrómás autizmusformák főbb jellemzői

Beteg	Nem	Fenotípus adatok	Gén	Mutáció	dbSNP	Zigócia	Öröklött/ De novo	Szindróma neve (Öröklésmenet)	ACMG
P1	N	Enyhe IKZ, hosszúkás arc, alacsonyan eredő fülek, telecanthus, hypertelorismus mammae, gótikus szájpád, telarche preacox	FMR1	CGG repeat teljes mutáció	N/A	HET	Ismeretlen (szülők nem elérhetőek)	Fragilis X szindróma (XLD)	P
P2	F	Középsúlyos IKZ, epilepszia, hosszúkás arc, alacsonyan ülő, elálló fülek, prognathismus, macroorchidia.	FMR1	CGG repeat teljes mutáció	N/A	HEMI	Öröklött (anya premutáció hordozó, anticipáció)	Fragilis X szindróma (XLD)	P
P3	F	Enyhe IKZ, rectális prolapsus, hosszúkás arc, elálló, nagy fülek, macroorchidia, impulzus kontroll zavar, kéz tremor.	FMR1	CGG repeat mozaikosság (premutáció és teljes mutáció)	N/A	HEMI	Ismeretlen (szülők nem elérhetőek)	Fragilis X szindróma (XLD)	P
P4	F	Középsúlyos IKZ, kényszercselekvések, sztereotíp kézmanírok, súlyos beszédkésés, hosszúkás arc, frontális előboltosulás, alacsonyan ülő és elálló fülek.	FMR1	CGG repeat teljes mutáció	N/A	HEMI	Öröklött (anya teljes mutáció hordozó, anticipáció)	Fragilis X szindróma (XLD)	P
P5	F	Epilepsziás encephalopathia, IKZ, hypertelorismus, fejlődésembeli regresszió.	SCN1A	NM_00116596: c.4934G>A; p.R1645Q	rs121917976	HET	De novo	Dravet szindróma (AD)	P
P6	F	Hypotonia, súlygyarapodás elmaradása, coloboma, hipopláziás és alacsonyan ülő fülek, pitvari sövény defektus, járulékos ínhur, súlyos IKZ, cryptorchidia, micropenis, emelkedett laktát szint.	CHD7	NM_017780: c.4822delA; p.R1608Gfs*31	.	HET	De novo	CHARGE szindróma (AD)	P

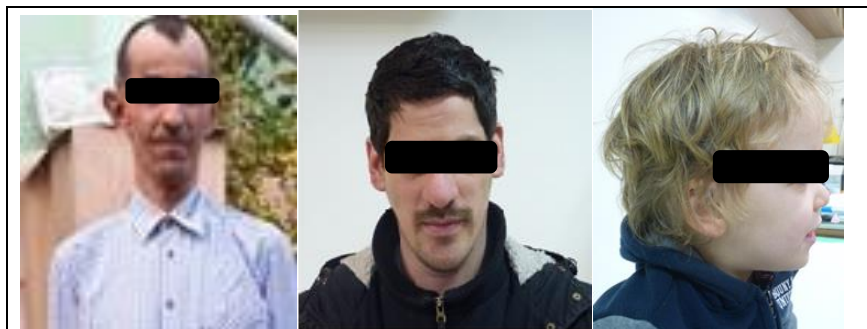
P7	F	Alacsonyan ülő fülek, gótikus szájpgad, epicanthus, Achilles kontratúra, izom dystrophia.	DMD	NM_004006: c.8713C>T; p.R2905X	rs128627256	HEMI	Öröklött (anya heterozigóta)	Duchenne izomdystrophia (XLR)	P
P8	N	IKZ, prognathia, járási és törzs ataxia, sztereotíp, középvonali kézmanírok.	MECP2	NM_004992: c.763C>T; p.R255X	rs61749721	HET	De novo	Rett szindróma (XLD)	P
P9	N	Megkésett pszichomotoros fejlődés, regresszió a beszédfejlődés terén, syndactylia, micrognathia, alacsonyan ülő fülek, alacsonyan eredő hátsó hajvonal	PTPN11	NM_002834: c.1502G>A; p.R501K	rs397507543	HET	Ismeretlen (anyai allél vad-típus, apa nem elérhető)	Noonan szindróma (AD)	LP
P10	N	Megkésett beszédfejlődés, epilepszia, EEG: temporalis eredetű éles hullámok. Hypertelorismus mammae, rövid nyak, holdvilág arc, macrotia, synophrys, telecanthus.	RELN	NM_005045: c.2015C>T; p.P672L	rs201044262	HET	Öröklött (apa heterozigóta)	Familiáris temporális lebeny epilepszia (AD)	LP
P11	N	Lissencephalia, hypertelorismus, epilepszia, súlyos IKZ, microcephalia, alacsonyan ülő, nagy fülek.	RELN	NM_005045: c.4354G>A; p.D1452N	rs114446781	HET	De novo	Lissencephalia 2. típus (AR)	LP
P12	N	Autoagresszív magatartás, ASD, normális izomtónus, anyjának sincs spasticus tónusfokozódása.	SPAST	NM_014946: c.1625A>G; p.D542G	rs142053576	HET	Öröklött (anya heterozigóta)	Hereditær spastikus paraparesis (AD)	VUS
P13	F	IKZ, járási ataxia, genu valgum, kifelé forduló, vastag felső ajak, benyomott ornyereg, epilepszia.	AUTS2	NM_015570: c.2440GA>AT; p.E814M	.	HET	Ismeretlen (anyai allél vad-típus, apa nem elérhető)	AUTS2 szindróma (AD)	VUS



További öt esetben egyéb etiológiai tényező került azonosításra: 15q13.3 és 2q37 microdeléciós szindrómák, melyek esetében 30% eséllyel fordul elő ASD [219], illetve ARID1B mutáció által okozott Coffin-Siris szindróma és OCA2 génmutáció általi oculocutan albinizmus. Az ARID1B mutáció magyarázhatja az autisztikus vonások jelenlétét [220], míg az OCA2 gén mutációihoz ASD nem kötött. Egy gyermek esetében, akinél a társtünetek indokolták a panel vizsgálat teljes exomra való kiterjesztését, végül ez tisztázta az ASD-je monogénes hátterét, melyet egy KDM6B génben jelenlévő heterozigóta frame-shift variáns magyaráz.

### 5.2.1 Fargilis-X-szindrómás eseteink:

Az NGS futást megelőzően, szűrővizsgálattal, 4 esetben diagnosztizáltunk Fragilis-X-szindrómát. Mind a 4 beteg esetében a szindrómára jellemző fenotípus jegyek észlelhetők az ASD diagnózis mellett: ilyenek a hosszúkás fejforma, durva arcvonások, magas homlok (7. Ábra).



7. Ábra: A három FXS-el diagnosztizált férfi beteg különböző korosztályba tartoztak, a szindróma specifikus fenotípusjegyei mégis mindhárom képen megtalálhatóak, illetve az is megfigyelhető, ahogy ezek egyre kifejezettebbé válnak a kor előrehaladtával.

A családfa alapján minden esetben X-hez kötött öröklődésment volt észlelhető, kivétel az FXS-el diagnosztizált lány (P1) gyermek esetében, akinek a 2 egészséges fiú testvére miatt nem merült fel X-hez kötött öröklődésmentet követő betegség.

### 5.2.2 Egyéb monogénes háttérű ASD eseteink:

Az NGS szekvenálásból származó adatokból ACMG klasszifikáció szerint 4 mutációt tekintettünk patogénnek, melyek esetében a fenotípus szorosan korrelált a detektált mutációval.

Egy csecsemőkori kezdetű epilepsziás gyermek (P5) esetében *SCN1A* génben lévő ismert patogén mutációt detektáltunk (VCV000068558), mely a típusos EEG jelekkel együtt a Dravet szindróma diagnózisát megalapozzák. A Dravet szindrómás gyermekek 24%-ban az ASD társul az epilepszia mellé [221].

Egy esetben a *CHD7* génben találtunk egy eddig nem ismert *frame shift* variánst, melyet patogénnek minősítettünk, tekintettel arra, hogy az ACMG irányelvek szerinti PVS1<sup>1</sup> és PS2<sup>2</sup> kritériumokat teljesíti. A variáns *de novo* volta igazolódott a szegregációs vizsgálatok során, mivel egyik szülő sem hordozta ezt a variánst. A *CHD7* gén patogén mutációi CHARGE-szindrómát okoznak. A szindróma elnevezése a vezető tünetek acronymája: C-coloboma, H-Heart defects, A-atresia choanae, R-retardation of growth, G-genital abnormality, E-ear abnormalities, tehát coloboma, szívdefektusok, choanalis atresia, növekedési elmaradás, genitális abnormitások, fül abnormitások jelenléte észlelhető. Betegünk (P6) esetében a mozaikszó legtöbb tünete fellelhető. A colobomát és a többszörös fejlődési rendellenességeit (8. Ábra) már születésekor észlelték. Páciensünk anamnéziséből kiderült, hogy gyermekkorában spontán záródó pitvari sövény defektust észleltek, az echokardiográfián bal kamrai járulékos ínhúr igazolódott. Etetési nehézségek, illetve elmaradt súlygyarapodása miatt fül-orr-gégészeti kivizsgálás történt, mely hypotóniás lágyszájpadot igazolt. Három hónaposan laryngoscopia történt, mely  $\Omega$  alakú epiglottist, duzzadt, vastag aryepiglottikus tájékot detektált, az epiglottis belégzésre a gége bement felé hajlott. A fokozódó nehézlégzés és etetési nehézségek miatt orrmanduláit eltávolították. Két éves korában orchidopexia történt cryptorchidia miatt. Az opus során jobb oldali herehypoplasia detektálódott. Kilenc éves korában endokrinológiai vizsgálata során micropenist írtak le, mely a pubertás megjelenése után is fennállt. Szemészeti vizsgálata két oldali colobomát és súlyos látáscsökkenést igazolt, melyhez konvergens strabismus társult. Beszédkésés miatt letapadt nyelvre gyanakodtak,

---

<sup>1</sup> PVS1 (Pathogenic Very Strong): Null variáns (nonsense, frameshift, kanonikus splice helyet érintő, start codon, egyszeri/többszöri exon deléción) olyan génben, amelyben a gén LOF mutációi ismert betegséghez köthetőek

<sup>2</sup> PS2: *de novo* a mutáció, mindkét szülői minta negatív

emiatt frenulum linguae bemetszés történt, beszéde azóta sem érte el az életkorának megfelelő fejlettségi szintet, egyszerűbb szavakat viszont mond.

Motoros fejlődése is megkésett volt, háromévesen kezdett járni, járása most is kissé ataxiás. Neurológiai státuszából disztális izomcsoportokban jelenlévő enyhe hypotrophia, laza ízületek emelendők ki. Pszichiátriai szempontból IKZ, illetve egyértelmű autisztikus vonások (kényszeres viselkedés és sztereotip kézmanírok) igazolódtak. Cirkadián ritmuszavar miatt gyógyszeres kezelést igényelt.



**8. Ábra:** CHARGE-szindrómás esetünk fejlődési rendellenességei láthatóak: 1. képen a coloboma észlelhető az iris alsó területén, a 2. képen az arc asszimetria, plagiocephalia, illetve a széles, bifid orrhegy, 3. képen pedig a szájpadlás, illetve a fogak eredésének és helyzetének rendellenességei. A 4. és 5. képeken az alacsonyan ülő fülek, microtia, illetve a rövid orr látható, különösen a jobb fülön (4. kép) észlelhető az antihelix jellegzetes egyenes lefutása, mely elveszti a kapcsolatot az antitragusszal, így hozva létre a „clipped off helix” malformációt. A 6. képen a Morton lábfej látható.

Koonya MRI vizsgálata vermis hypoplasiat detektált. EEG generalizált irritatív jeleket, VEP vizsgálata baloldalon emelkedett P100 értéket detektált. BERA normális volt. Laborparamétereiből kiemelendő az alacsonyabb melatonin, kalcium, tesztoszteron és D<sub>3</sub> vitamin szint, illetve az emelkedett laktát szint melyet a detektált mtDNS deléció magyarázhat (lsd. később). A többszörös MPA-k miatt aCGH is készült, ennek eredménye negatív lett. Az ismert CHARGE szindrómás esetek 27,5%-ban figyelhető meg ASD [222].

Egy 10 éves, ismert Duchenne típusú izomdystrophiás gyermeknél (P7) a *DMD* génben igazolódott egy ismert patogén stop mutáció (VCV000011288.3). A gyermek izommintájában 7 évesen igazolódott a dystrophinopathia, de MLPA vizsgálat a génben deléciót nem mutatott. Már az izomtűnetek megjelenése előtt, másfél éves korától észlelt a szülő autisztikus vonásokat, szemkontaktus hiányát, viselkedésbeli és érdeklődésbeli sztereotípiákat, enyhe intellektuális kognitív deficit mellett, később ezekhez hiperaktivitás is társult. Laborjaiban izomdystrophiájának megfelelően kifejezetten emelkedett creatin kináz (CK) értékeket mértünk. A *DMD* gén nemcsak az izmokban, hanem az agyban is expresszálódik, ez magyarázza azt, hogy a Duchenne izomdystrophiában szenvedők 30-40%-a ASD tüneteit is mutatják [99].

Egy atípusos Rett-szindrómával diagnosztizált kislánynál (P8) a *MECP2* génben egyismert *nonsense* mutációt azonosítottuk (VCV000011829.15). A Rett szindróma korábban az ASD kategóriába tartozott, de a DSM-V bevezetése óta már nem soroljuk ide, azonban tüneti szempontból jól ismert a két betegség közötti jelentős átfedés. A kislány első tünete a megkésett beszédfejlődés volt, melyet kezdetben a család kétnyelvűségének tulajdonítottak. Két és fél éves korában azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a beszédkéés csak az első tünet volt, melyhez mozgáskészség romlása is társult. Három éves korára a rendellenes kéztartás és sztereotíp kézmanírok is jelentkeztek, majd a törzsataxia is megjelent. Epilepszia nem jelentkezett a diagnózis időpontjáig, illetve microcephalia sem társult a fenotípushoz.

További három esetben valószínűleg patogén (LP) mutációt detektáltunk a *PTPN11* és *RELN* génekben.

Egy három és fél éves kislány (P9) esetében a *PTPN11* génben detektáltunk egy *missense* variánst, melyet a ClinVar adatbázis patogénnek minősített (VCV000040555.5). A variáns ritka mivoltát az ExAC és az 1000Genome adatbázisokból való hiánya támasztja

alá. Kohorszunkban ezt a variánst egy esetben detektáltuk és a saját adatbázisunkban lévő 200 magyar exom mintában sem volt jelen. A legtöbb általunk alkalmazott predikációs szoftver algoritmusa kórosnak prediktálja (SIFT, Polyphen 2 HVID, CADD, SVM). A variáns egy evolúciósan konzervált régióban helyezkedik el (GERP érték: 5,13). A gén autoszomális domináns öröklődéssel Noonan-szindrómával asszociált. A beteg néhány tünete, autisztikus vonásai, pitvari sövénydefektusa, egymástól távol elhelyezkedő mellbimbói, kissé háromszögletű arca, retrognathiája, mélyen barázdált philtruma, alacsonyan eredő fülei és lefelé ívelő szemrései korrelálnak Noonan szindróma tüneteivel (9. Ábra), viszont magassága, nyaki vastagságnak a hiánya és a hypertelorismus hiánya nem jellemzőek erre a kórképre. Szegregációs vizsgálathoz, csak az anyai minta volt elérhető, akinél a hordozói státusz nem igazolódott, így komplett szegregációs vizsgálatra nem volt lehetőségünk.



**9. Ábra:** Noonan szindrómára utaló MPA-k jelenléte megfigyelhető egy *PTPN11* mutációt hordozó kislány esetében, mint a távol elhelyezkedő mellbimbók, enyhe micrognathia, illetve a mélyen barázdált philtrum jelenléte. A kezeknél látható repkedő mozdulatok az ASD-re jellemző sztereotípiákhoz sorolhatóak.

A következő két esetben, két eltérő fenotípussal rendelkező kislányt mutatunk be, akiknél a tünetek, az eltérő fenotípus ellenére, *RELN* gén patogén mutációival korreláltathatóak. Az első esetben (P10) egy többszörös minor anomáliákkal rendelkező kislánynál (10. Ábra) találtunk a *RELN* génben egy ClinVar adatbázisban VUS/patogénnek minősített variánst (VCV000208481.2). A kislánynak 8 hónapos korában több atípusos absence rohama volt. Az EEG több 4-7 Hz-es polymorph theta hullámot mutatott, melyekhez keverten lassú alphákat tartalmazó háttértevékenység is megjelent. Ezek mellett többször 2 mp-ig tartó magasfeszültségű, meredek lassú paroxysmus is megjelent, melyek az absence klinikai tüneteivel egybe estek. Valproát kezelésre a rohamtevékenység megszűnt, később ez elhagyható volt. Koponya MRI vizsgálata során strukturális agyi elváltozás nem volt észlelhető. Szegregációs vizsgálata során ASD-vel diagnosztizált, de epilepsziás anamnézissel nem rendelkező testvére nem hordozta a variánst, az édesapa viszont igen. Édesapjának nem szerepel az anamnézisében epilepszia, melyet a *RELN*

mutációk által okozott, autoszomális dominánsan öröklődő laterális temporális lebeny epilepszia (ADLTE), csökkent penetranciája magyarázhat. Az irodalmi adatok alapján a betegség penetranciája 70% körüli [127].



**10. Ábra:** ADLTE-vel diagnosztizált kislány esetében több MPA is észlelhető: távol elhelyezkedő mellbimbók, rövid nyak, kerek arc, transzverzális mosoly, széles és nyomott orrhát, hosszú philtrum, synophris és macrotia észlelhető. Hátán észlelhető lanugo jelenléte hypertrichosisra utal ebben az életkorban.

A második esetben egy lissencephaliával rendelkező kislánynál (P11) detektáltunk egy *de novo* heterozigóta RELN variánst, melyet 2 jelentés alapján a ClinVar VUS-nak klasszifikált (VCV000286839.2). A lissencephalia fenotípusa RELN mutációk esetében autoszomális recesszív öröklődésmenethez kötött. Mivel a panelünkben nem minden lissencephaliával asszociált gén szerepelt, további genetikai okok felderítése céljából egy kereskedelmi forgalomban lévő lissencephalia panel vizsgálat is készült, a Centogene (Rostock, Németország) laboratóriumban, mely megerősítette eredményünket. Tekintettel a variáns igazolt *de novo* státuszára VUS helyett a valószínűleg patogén kategóriába soroltuk át a variáns. A kórtörténetéből kiemelendő, hogy méhen belül a terhesség utolsó szakaszában colpocephalia, születésekor microcephalia és több minor anomália igazolódott, melyek később is megmaradtak (11. Ábra).



**11. Ábra:** A 3,5 éves lissencephaliával diagnosztizált kislány MPA-i láthatóak: microcephalia, valamint a keskenyebb bitemporális távolság. Hypertelorismus, magasan ívelő szemöldök, a felfelé néző orrnyílások, hosszú philtrum, trianguláris ajkak és macrotia látható.

Mivel 10 hetes korában szopás közben napi több alkalommal myoclonusok, spasmusok jelentkeztek EEG készült, mely hypsarrythmiát igazolt. Tekintettel arra, hogy a spasmusok a vigabatrin mellett is megmaradtak ACTH kezelésben részesült, mely hatására rohammentessé vált, a hypsarrythmia megszűnt.

A detektált szindrómás ASD formáink közül, két variánst VUS-ként klasszifikáltunk. Egy 9 éves lánynál (P12) a *SPAST* génben detektáltuk egy *missense* variánst, mely a ClinVar adatbázisban valószínűleg patogén/VUS-nak volt minősítve (VCV000217003.2) 1-1 független beküldő által. A variáns alacsony MAF értékkel rendelkezik (0,0002), bár nem egy kifejezetten konzervált régióban található, tekintettel arra, hogy a fehérje polaritását változtatja, mivel az aszparaginsav (D) polarizált hydrophil aminosav helyett egy glicin (G) töltés tekintetében neutrális aminosav kerül beépülésre, több predikciós szoftver is patogénnek véleményezi. Szegregációs vizsgálat során az édesanya is hordozónak bizonyul, egyelőre tünetmentesen. A *SPAST* gén patogén variánsai hereditér spasticus paraparesis 4-es típusát okozzák, autoszomális domináns öröklődés menettel. Esetünkben sem a kislánynak, sem fiatal anyukájának nincs spasticus paraparesise és az anyuka felmenői között sem volt hasonló. A kislány esetében enyhébb ASD mellett időszakosan autoagresszív magatartás is észlelhető volt. A *SPAST* gén *de novo* mutációi ASD-ben rizikófaktorként ismertek [223]. Esetünkben hosszmetzeti követés javasolt, mivel jelenleg nem tudjuk egyértelműen összefüggésbe hozni a kislány tüneteit a detektált variánssal.

A P13 esetében egy szokatlan genetikai konstellációt észleltünk, mivel az *AUTS2* (korábban *KIAA0442*) gén egyetlen kodonjában két egymás melletti mutáció volt észlelhető, mely p.E814M aminosavcserét eredményezett. A két mutáció a BAM file-ok alapján cisz helyzetben van jelen. Szegregációs vizsgálatra csak édesanya esetében volt lehetőségünk, akinél nem igazolódott mutáció, édesapa krónikus aethylismusban szenved, nem volt elérhető szegregációs vizsgálat céljából. Betegünk anamnéziséből kiemelő, hogy gyermekkorában diagnosztizálták az autizmust a korai, súlyos tünetek fennállása alapján. Ezekhez később agresszív magatartás, impulsivitás, és mentális regresszió is társult. Törzsataxiája, juvenilis epilepsziája miatt koponya MRI vizsgálat készült, mely megaciszterna magnát és jobb túlsúlyú hippocampális atrophiát talált. Az EEG a súlyos autisztikus tünetek miatt nem volt elvégezhető, empirikusan valproát került beállításra, rohamoldásra pedig diazepamot kapott. A beteget 14 évesen egy grand mal epilepsziás roham következtében elvesztettük. Kifejezett arcdiszmorfia nem volt észlelhető, szélesebb és felfelé forduló felsőajak, illetve benyomott orrnyereg került leírást (12. ábra).



**12. Ábra:** Az AUTS2-szindrómás gyermek esetében juvenilis indulású epilepsziás rohamok mellett, csak igen enyhe arcdiszmorfia figyelhető meg a felfelé forduló, vastag felsőajak, illetve benyomott orrgyök jelenléte miatt.

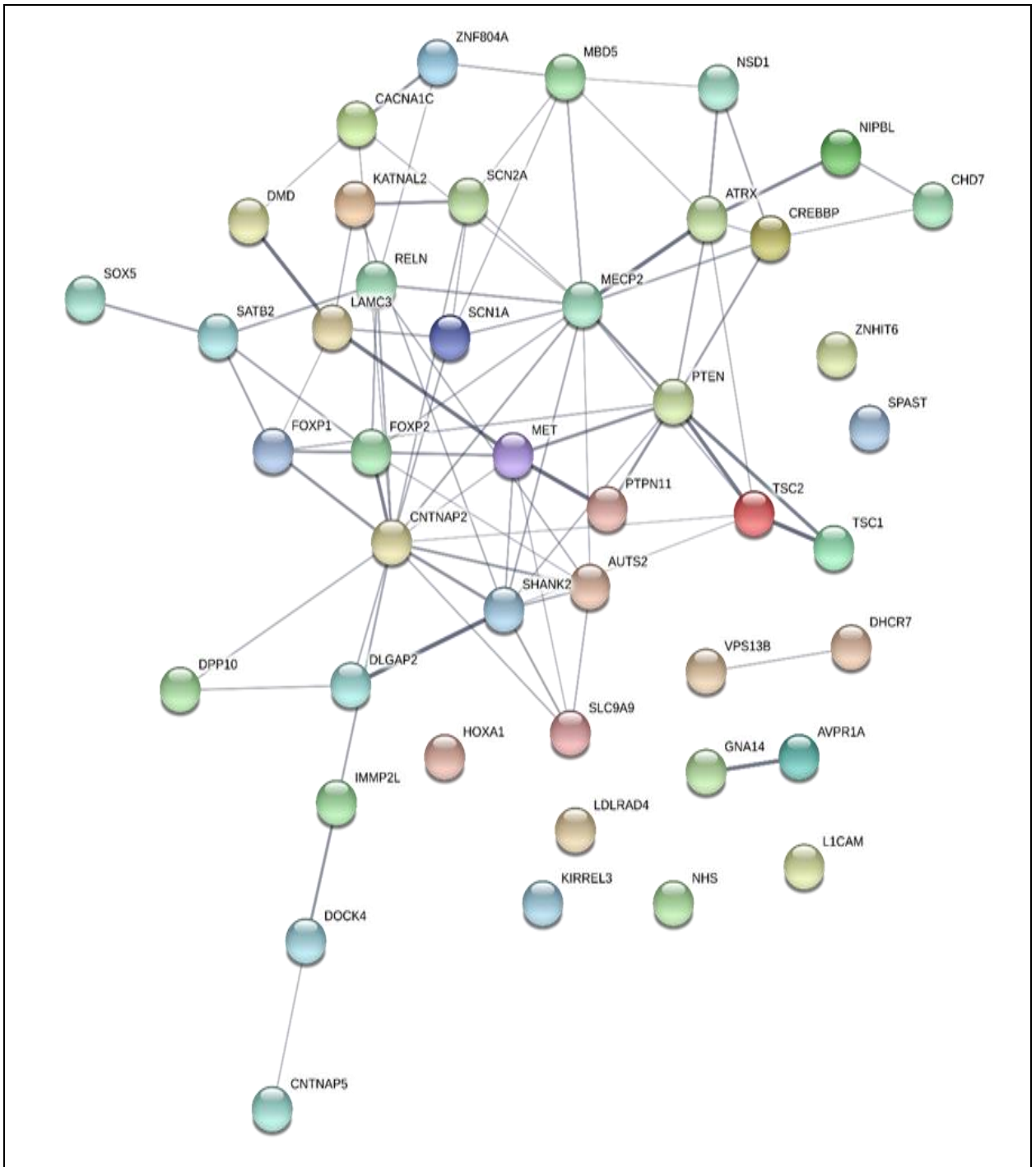
Összegezve a szindrómás autizmus formák között kohorszunkban négy *de novo* és öt öröklött ritka variánst detektáltunk. Négy esetben a szegregációs vizsgálatot nem tudtuk komplettálni valamelyik szülő elérhetlensége miatt. A mutációk grafikus prezentációját, azok funkcionális fehérje doménekhez viszonyított helyzetét a *mutation mapper szoftver* segítségével a 13. Ábrán mutatjuk be. (<http://mutationmapper.bioch.ox.ac.uk/>)



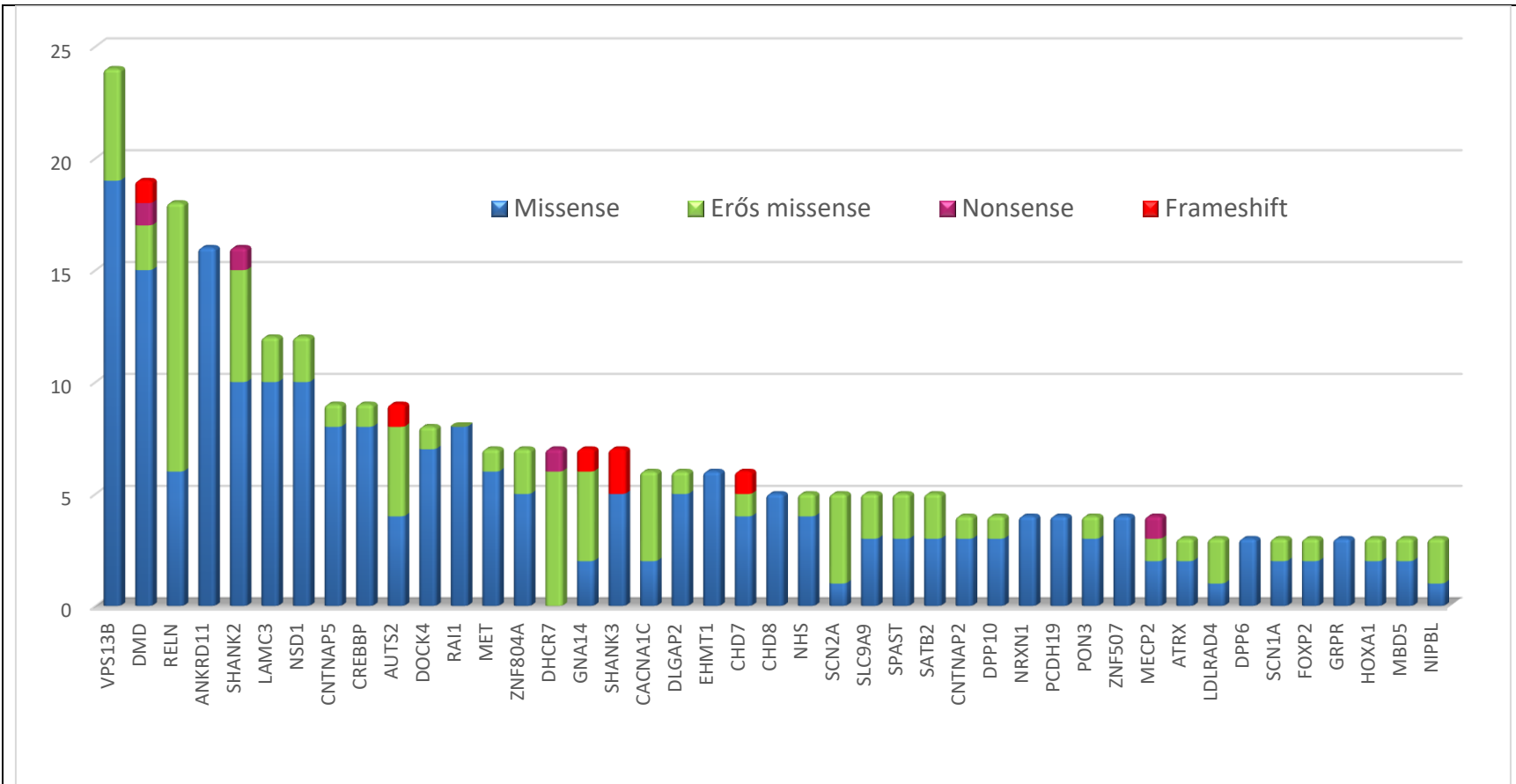


### 5.3 A ritka variánsok elemzése kohorsz szinten

Összesen 370 olyan ritka variánst detektáltunk a vizsgált populációban, mely teljesítette a metodikai részben leírt ritka variáns szűrésünk kritériumait. A vizsgált 101 kandidáns gén közül 80 génben találtunk ritka variánst, melyek közül 44 esetében legalább egy patogénnek predikált variáns (CADD score  $\geq 20$ , vagy SVM=damaging) volt jelen. A 44 gén funkció alapú asszociációs hálóját a 14. Ábrán mutatjuk be. Funkcióvesztő mutációt a következő 8 gén esetében detektáltunk: *AUTS2*, *CHD7*, *DHCR7*, *DMD*, *GNA14*, *MECP2*, *SCHANK2*, *SHANK3*. Ezek közül az RVIS érték alapján (RVIS <5 pc.) az *AUTS2*, *CHD7*, *SHANK2*, *SHANK3* gének kifejezetten intoleránsak a funkcionális variánsokkal szemben, ami a detektált variánsok patogén szerepét erősíti. A kohorszunk génjeinek mutációs terheltségét egy diagrammon ábrásoltuk (15. Ábra).



**14. Ábra:** A ritka, patogénnek prediktált mutációkat tartalmazó gének funkciójú alapú kapcsoltsági hálózata. A hálózat vizualizációját a STRING (<https://string-db.org/>) szoftverrel készítettük. A géneket összekötő vonalak vastagsága utal a gének közötti összefüggés erősségére. A teljes hálózatra vonatkoztatva szignifikáns dúsulás volt kimutatható az idegrendszeri fejlődésben résztvevő génekre. (GO:0007399;  $p=3,22e-15$ ). Jól látható például az epilepszia hátterében gyakran leírt gének gyakori és többszörös kapcsoltsága.



**15. Ábra:** A kohorszunkban leggyakrabban mutálódó géneket a mutációk száma és típusa alapján egy diagramon ábrázoltuk. A különböző mutáció típusokat eltérő színekkel jelöltük. Leggyakrabban a VPS13B génben észleltünk mutációkat. Funkcióvesztő (LoF) mutációt 8 gén esetében detektáltunk.

Annak meghatározása érdekében, hogy észlelhető-e ritka variáns dúsulás, illetve funkcióvesztő mutáció dúsulás az általunk vizsgált génekben a Rao és Nelson [216] által alkalmazott lépéseket használtuk a SORVA szoftver segítségével. A szignifikancia szintet meghaladó ritka variáns számot észleltünk az *AUTS2*, *NHS*, *NSDI*, *SLC9A9*, *VPS13B* génekben (7. Táblázat).

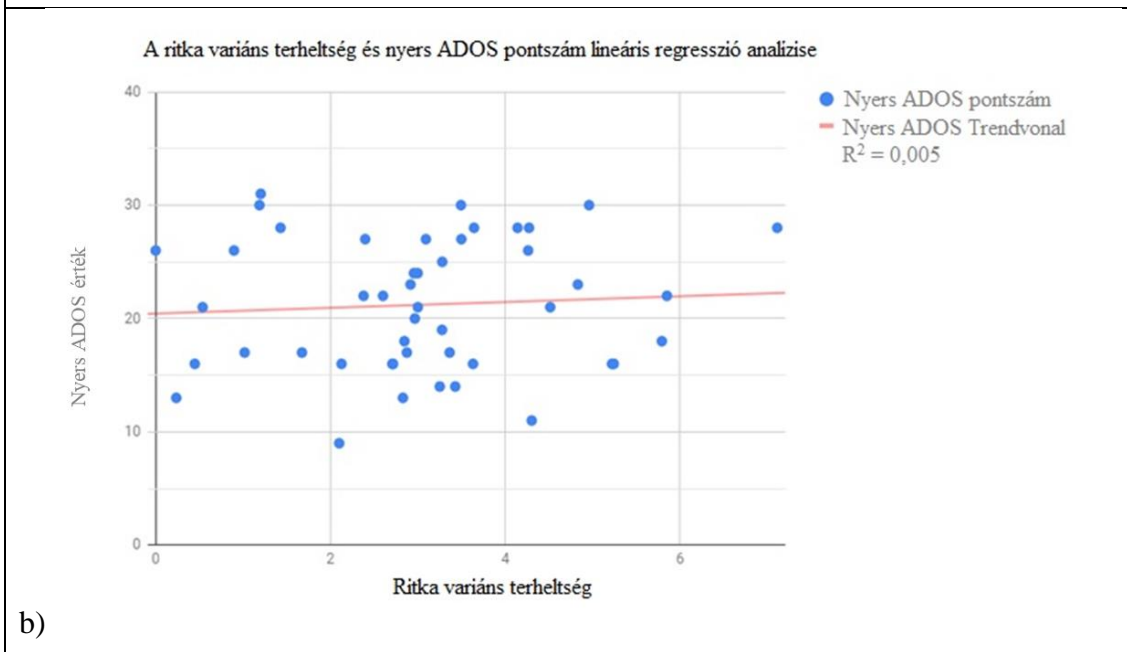
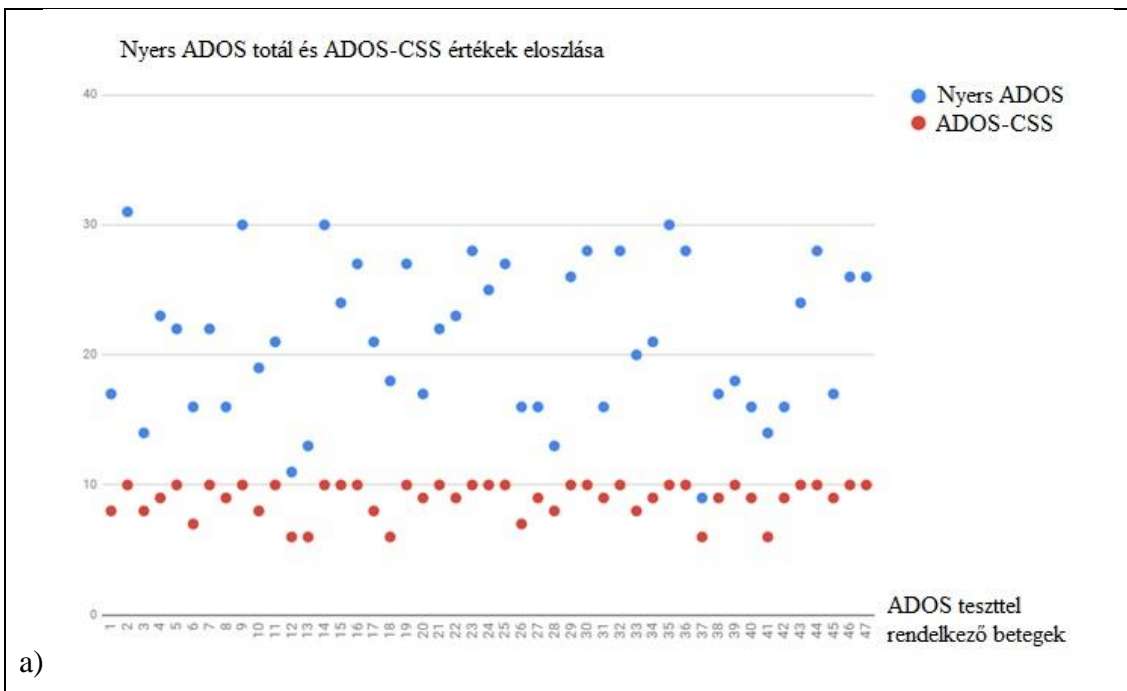
**7. Táblázat:** A szignifikáns ritka variáns dúsulást tartalmazó gének. A 101 vizsgált gén közül 5 esetben detektáltunk az elvárhatótól szignifikánsan nagyobb ritka variáns terheltséget, 5% MAF cut-off mellett. A variáns szám figyelembevételénél külön kategóriába tartoztak a testvérpárok, az ő esetükben, csak a közös variánsok számítottak (+0/5), (+1/5).

Gén	Kódolt fehérje hossza (AS)	Variáns szám (variáns/egyén+közös_variáns/testvérpár)	SORVA p_érték
<i>AUTS2</i>	1259	30/164+0/5	8.50E-06
<i>NHS</i>	1651	17/164+0/5	0.000149848233
<i>NSDI</i>	2696	53/164+0/5	8.40E-12
<i>SLC9A9</i>	645	17/164+1/5	0.026
<i>VPS13B</i>	4022	55/164+0/5	5.50E-05

A ritka variáns terheltségben nem észleltünk különbséget a nemek között, fiúk esetében az átlag terheltség 3,49, míg lányok esetében 3,31 volt ( $p = 0,57$ ). X kromoszómán elhelyezkedő ritka variánsok száma sem volt szignifikánsan nagyobb fiúkban, mint lányokban. 67 egyén (38,5%) esetében nem észleltünk prioritizálási feltételeinknek megfelelő, kórosnak prediktált ritka variánst.

### 5.3.1 A ritka variáns terheltség és az ASD súlyosságának korrelációja

Az ASD súlyosságának számszerűsítésére két, ADOS teszten alapuló, módszert is használtuk. Az egyik során a 47 esetben elérhető nyers-totál ADOS pontszámot vettük figyelembe, másodikban pedig kalibrált súlyossági pontszámot (ADOS CSS) számoltunk a nyers ADOS értékekből a Gotham és mtsai. által alkalmazott metodika szerint [13]. Korrelációs vizsgálatokhoz a kalibrált súlyossági érték nem volt jól alkalmazható, mivel a legtöbb beteg, ilyen módszer alapján, a legsúlyosabb kategóriában volt besorolható (CSS = 8-10 pont). A nyers ADOS pontszám jobb eloszlást mutatott (16a Ábra). Regresszió analízis során viszont a nyers ADOS pontszám sem mutatott korrelációt a ritka variáns terheltséggel ( $R^2 = 0,0047$ ;  $p = 0,648$ ). (16b Ábra)

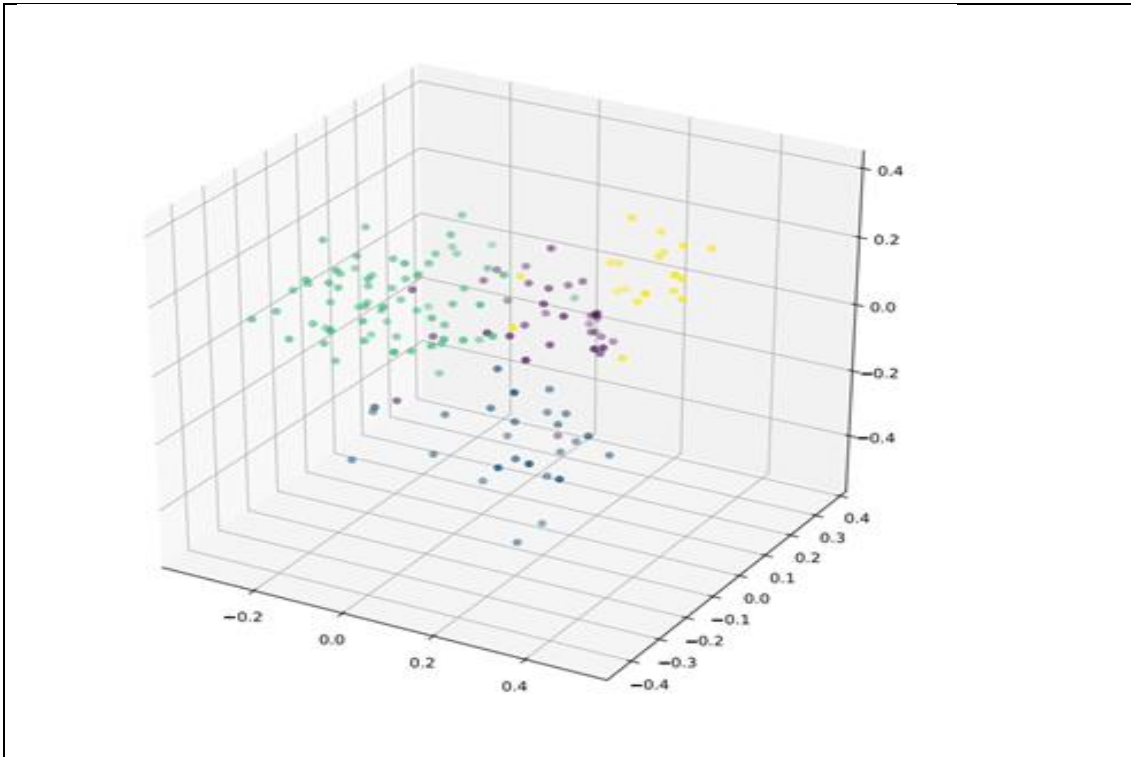


**16. Ábra:** Az ASD súlyosságát számszerűsítő két mutató eloszlása (a) és a súlyossági mutatónak a variáns terheltséggel való korrelációja (b) látható. A 16. a) ábrán lévő pont diagrammon látható, hogy a nyers ADOS pontszám (kék pontok) nagyobb szórást mutat, mint az ADOS-CSS (piros pontok), melyek többsége 7-10 pont között változott. A 16. b) ábra a nyers ADOS pontszámok és a variáns terheltség regresszió analízisét mutatja, mely során korreláció nem észlelhető a nyers ADOS pontszám és a ritka variáns terheltség között.

A minor fizikális anomáliák és a ritka variáns terheltség asszociációjának meghatározására is regresszió analízist végeztünk, de itt nem találtunk szignifikáns összefüggést ( $R^2 = 0,003$ ;  $p = 0,51$ ).

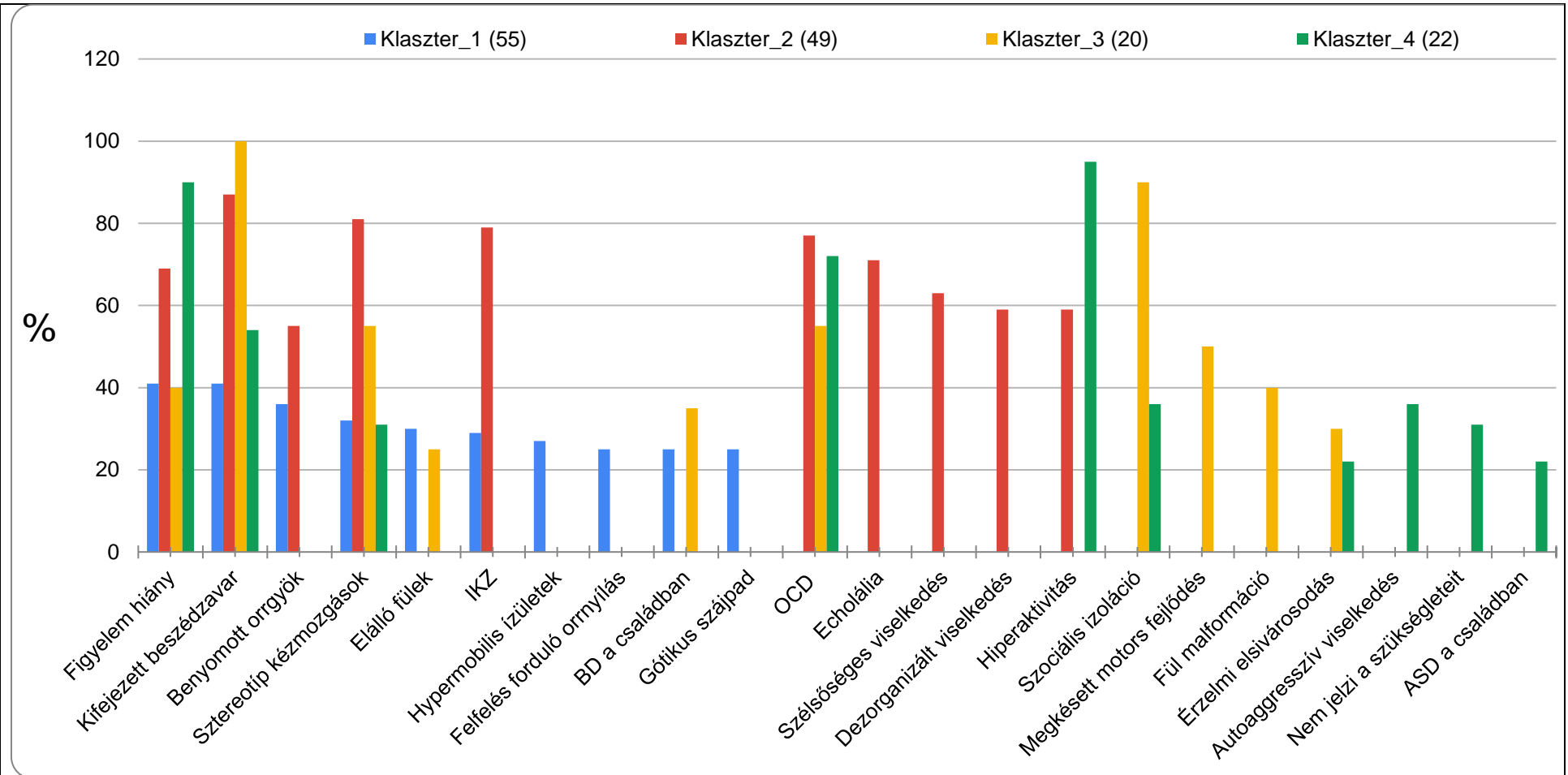
#### **5.4 Klaszteranalízis és a gének dúsulása a különböző fenotípus klaszterekben**

Az azonosított klasztereket és a 11 legjellemzőbb tulajdonságot a 17. illetve 18. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a 22 fenotípus jegyből 11, két vagy annál több klaszterben is szerepel. Ebből az állapítható meg, hogy tüneti szinten jelentős átfedés áll fenn a különböző fenotípus klaszterek között. Ennek ellenére vannak olyan tulajdonságok melyek bizonyos klasztereket jobban jellemeznék. A 3. klaszter esetében elmondható, hogy erre a beszédzavar, szociális izoláció és a társas kapcsolatok súlyos zavara jellemző, míg a 4. klaszter valószínűleg az ADHD-val társuló ASD-s eseteket foglalja magában. A 2. klaszterre inkább az IKZ és OCD tünetek jellemzőek, melyek gyakran súlyos viselkedésbeli zavarokhoz vezetnek, mint pl. az autoagresszió, vagy a higiénias normák figyelmen kívül hagyása. A detektált klaszterek közül, az első a legnehezebben interpretálható, mivel egyetlen egy kiemelkedő tulajdonság sem jellemzi. A többi klaszterhez viszonyítva ebben a különböző minor anomáliák és a családban előforduló egyéb pszichiátriai megbetegedések nagyobb arányban fordulnak elő. Viszont a szindrómás ASD formát eredményező gének nem mutattak dúsulást sem ebben, sem a másik 3 klaszterben. Tehát egyetlen egy klaszter esetében sem volt szignifikáns gén dúsulás kimutatható.



**17. Ábra:** A fenotípus klaszteranalízis eredményei láthatóak. A kernel PCA eredményeként a mintákat egy három dimenziós térbe képeztük le, melyen látható, hogy teljesen elkülönülő klaszterek nem jelennek meg, de egy bizonyos csoportosulási trend megfigyelhető. A minták színei a 4 választott klasztert jelentik.





**18. Ábra:** A fenotípus klaszterelemzés során a hisztogrammon a 22 leggyakoribb fenotípusjegy előfordulási gyakorisága látható egy - egy klaszteren belül. Látható, hogy a fenotípusjegyek fele egynél több klaszterben reprezentálódik, azonban az is észlelhető, hogy bizonyos tulajdonságok jellemzőbbek bizonyos klaszterekben, így például a 4. klasztert az ASD mellett megjelenő ADHD jellemzi.

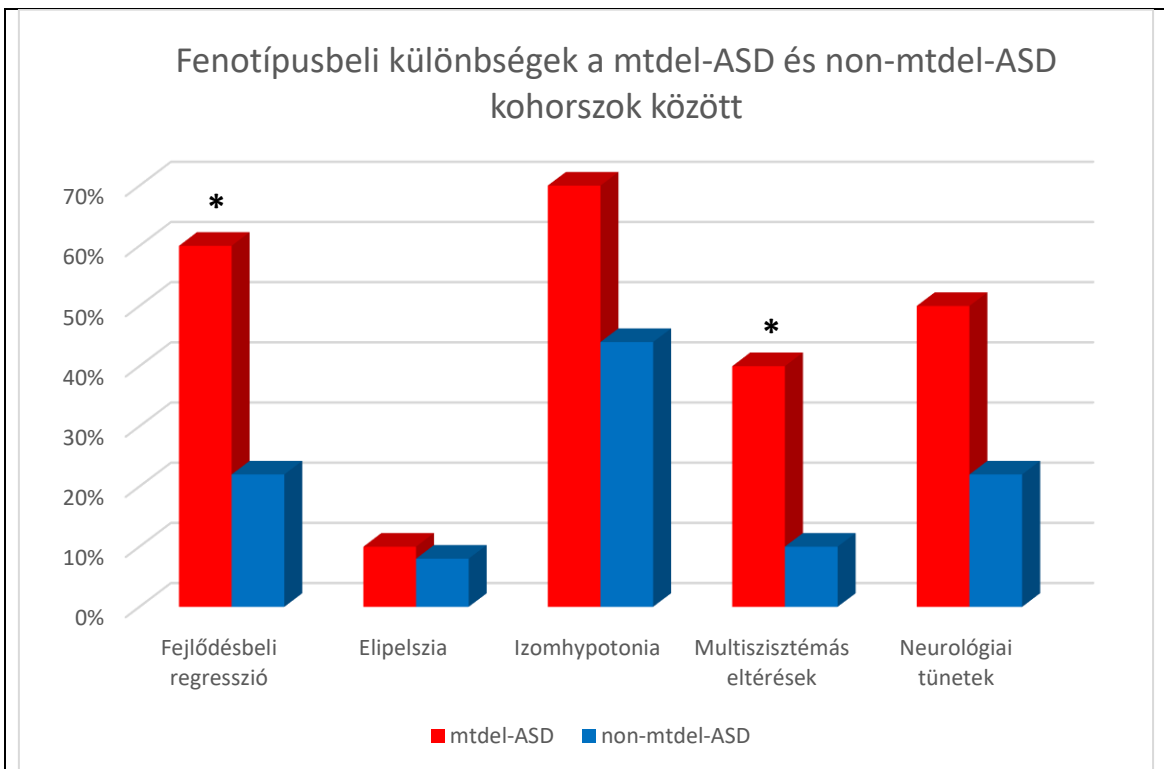
## 5.5 Az ASD és mitochondriális diszfunkció korrelációja

Az mtDNS deléció előfordulása a 60 ASD-vel diagnosztizált gyermek esetén szignifikánsan nagyobb volt, mint a 60 egészséges, idősebb kontroll egyén esetében. Az ASD csoportban 16,6% (10/60) volt az mtDNS deléció előfordulási gyakorisága, míg egészséges, idősebb, kontroll csoportban 3,3% (2/60) (Yates korrelációs  $\chi^2$ -próba = 4,5,  $p = 0,03$ , OR = 5,8; 95% CI 1,21-27,72). Az mtDNS hotspot mutációk (m3243 A>G, m.8993 T>C/G, m.8344 A>G) vizsgálata során viszont egy gyermek sem bizonyult pozitívnak. A 10 mtDNS delécióval rendelkező gyermek közül kettő multiplex deléciót hordozott, nyolc pedig egyes major deléciót (2,4-7,9 kb tartományba esőt). Az mtDNS deléciót hordozó ASD-vel diagnosztizált gyermekek (mtdel-ASD) főbb klinikai tüneteit és családi anamnézisükre vonatkozó adatokat a 8. Táblázatban foglaltuk össze.

A mitochondriális betegségre utaló főbb tüneteket figyelembe véve összehasonlítottuk az mtdel-ASD csoportot az 50 non-mtdel-ASD csoporttal, ennek az összehasonításnak az eredményét a 19. Ábrán mutatjuk be. Klinikai fenotípus szempontjából a fejlődésbeli regresszió jelenléte és a multiszisztémás tünetek jelenléte szignifikáns eltérést mutatott a két csoport között. Regressziós fázisok esetében  $p = 0,0199$ ; OR = 5,4231; 95% CI = 1,32-22,13, míg multiszisztémás tünetek jelenléte esetén  $p = 0,03$ ; OR = 6; 95% CI = 1,31-27,44 volt. Izomhypotonia és a társuló különféle neurológiai tünetek is gyakrabban fordultak elő mtdel-ASD kohorszban, de szignifikáns különbség nem volt ( $p = 0,11$ , illetve  $p = 0,07$ ) (19. Ábra). Epilepszia előfordulási gyakorisága szempontjából nem volt különbség a két csoport között.

A mitochondriális háttér irányában vizsgált 60 gyermek családi anamnézisében 48%-ban volt említésre méltó eltérés, melyek közül 20 esetben (33,3%) pszichiátriai betegségek, négy esetben (6,7%) érzékszervi betegségek, ataxia és/vagy komplex endokrin betegségek voltak észlelhetőek. A felsorolt tünetek együttes előfordulása az MDC (mitochondrial disease criteria) érték emelkedése alapján mitochondriális betegséget jelez [224]. A pszichiátriai tünetek és az MDC-hez kötött tünetek a családi anamnézisben mindössze öt esetben (8%) fordultak együtt elő. A szérum laktát, és/vagy laktát/pyruvát arány négy esetben volt emelkedett az mtdel-ASD csoportban (8. Táblázat). Összességében a családi anamnézist, fenotípus jegyeket, illetve a laboratóriumi értékeket figyelembe véve az MDC érték hét esetben utalt lehetséges mitochondriális betegségre.

További megerősítést izombiopszia adhatott volna, azonban ettől az invazív beavatkozástól etikai okok miatt eltekintettünk.



**19. Ábra:** Mitochondriális betegségekre utaló tünetek eloszlása az mtdel-ASD és non-mtdel-ASD csoportban. A \*-al jelölt esetekben szignifikáns eltérés mutatkozott a tünetek frekvenciájában a két csoport között. Epilepszia előfordulási gyakorisága szempontjából nem volt különbség a két csoport között. Izomhypotonia és a társuló különféle neurológiai tünetek is gyakrabban fordultak elő mtdel-ASD kohorszban, de szignifikáns különbség nem volt ( $p = 0,11$ , illetve  $p = 0,07$ ).

**8. Táblázat: mtDNS deléciót hordozó ASD eseteink főbb, mitochondriális betegség szempontjából releváns, tünetei.**

Beteg	Családi anamnézis	Társbetegség	MPA	ASD melletti tünetek	Labor eltérések	mtDNA (HP)
PM1	IKZ másodfokú rokonoknál, epilepszia	Krónikus otitis	+	Hypoacusis, orofacial dyspraxia, IKZ, végtagi ataxia, tremor, epilepszia	Laktát szint: 3.6 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l) , alacsony tesztosteron, magas LDH, normál CK	Multiplex (>20%)
PM2	MS: autoimmun hypothyreosis	Glutén érzékenység	+	Figyelemzavar, IKZ, Enyhe macrocephalia, székrekedés	Laktát szint: 0,6mmol/l (norm:≤ 1.6mmol/l), emelkedett laktát/pyruvát arány, normál CK és LDH	Major (80%)
PM3	MS: epilepszia FS: anxietás	Fogászati eltérés	+	Multiplex fejlődési rendellenesség, coloboma, hypotonia, törzs ataxia, légzési-, etetési nehézség	Laktát szint: 1.9 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l). emelkedett progeszteron szint, emelkedett LDH	Major (20%)
PM4	Édesanya: pánikbetegség	GERD	+	Postnatális fejlődési elmaradás, hypotonia, súlygyarapodás megkezdése, IKZ	Laktát szint: 1.3 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l)	Major (65%)
PM5	Negatív	Atopiás dermatitis	-	No	Laktát szint: 0.9 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l)	Major (35%)
PM6	Provokált abortusz, FS: hydrocephalus, analis atresia, MS: depresszió, anxietás, ptosis, OCD, carcinoma	Újszülöttkori sárgaság, strabismus	+	Microcephalia, látászavar, izom hypotonia	Laktát szint: 2.3 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l), emelkedett LDH, normál CK	Major (20%)
PM7	Negatív	Negatív	+	Enyhe törzsataxia	Laktát szint: 1.2 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l)	Major (85%)
PM8	MS: BD (3 rokon), pajzsmirigy problémák	Atopiás dermatitis, CMV, hepatitis	+	Sensoneurális halláscsökkenés, enyhe myopathia, ptosis	Laktát szint: 1.5 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l), emelkedett LDH, normál CK. Magas anti-CMV antitest titer születéskor, Emelkedett májenzimek	Major (85%)
PM9	MS+FS: PD, AD, IKZ; FS: felvetődött ASD	Negatív	+	Postnatálisan hypotonia, Enyhe törzsataxia, vádli hypertrofia	Laktát szint: 1.5 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l). Eemelkedett laktát/pyruvát arány, normál CK és LDH	Major (90%)
PM10	Negatív	Negatív	+	Negatív	Laktát szint: 1.2 mmol/l (norm: ≤ 1.6mmol/l)	Multiplex (>20%)

Annak eldöntése érdekében, hogy a detektált mtDNS deléció primér vagy szekunder eredetű-e, az ASD-NGS panel eredményét és egy kiegészítő NGS panel (IG panel) vizsgálat eredményét vettük alapul. Az IG panel használatával próbáltuk felderíteni a deléció háttérében álló esetleges primér okot.

Az mtdel-ASD csoportban (PM) egy *SUCLG1* (succinate-CoA ligase GDP/ADP-forming subunit alpha) génben jelenlévő heterozigóta missence variáns esetében merült fel patogénitása (VCV000203970.1) (9. Táblázat). Ez a variáns szegregációs vizsgálat során *de novo*-nak bizonyult. A *SUCLG1* gén mutációi recesszív öröklődésmenettel vezetnek mtDNS depléció szindróma kialakulásához (OMIM:245400). Betegünk heterozigóta formában hordozta a variánst, így tünetképző jellegét elvetettük. Mivel az ASD kohorszunkban az IG panel alkalmazása nem bizonyult célravezetőnek az etiológia tisztázását illetően, a panel diagnosztikus értékét egy primér mitochondriális betegcsoportban is megvizsgáltuk (C-MD). Ebben a kohorszban az IG panellel több valószínűleg patogén (LP) és VUS variánst detektáltunk ( $p = 0,017$ ). A C-ASD (non-mtdel-ASD tagjaiból) kontrollok esetén, IG panellel, az mtdel-ASD csoporthoz hasonlóan, egy VUS volt detektálható, míg az egészséges kontrollok esetén két VUS. Összességében az IG panel eredményei alapján nem volt szignifikáns különbség mtdel-ASD és C-ASD ( $p = 0,669$ ), illetve mtdel-ASD és egészséges kontrollok (C-H) esetén ( $p = 0,360$ ). A panel viszont, a kontrollként használt mitochondriális betegek esetében (C-MD), alkalmasnak bizonyult a mtDNS deléció háttérében álló primer okok felderítésére ( $p = 0,017$ ).

Az ASD panel alkalmazása során mind az mtdel-ASD, mind a C-ASD csoportban több ritka variánst detektáltuk (10. Táblázat), mint az egészséges kontroll csoportban. A CHARGE szindrómával diagnosztizált kisfiú esetében is igazolódott mtDNS deléció (PM3). Az ő részletes fenotípus leírását a Szindrómás formák c. alfejezetben ismertettük. A gyermek mitochondriális betegséggel asszociáló tüneteit a 8. Táblázatban foglaltuk össze. Nála a *CHD7* kóroki variáns mellett, egy ritka *TSC2* variánst is észleltünk, melyet VUS-nak interpretáltunk.

A PM2 beteg esetében az *AUTS2* génben egy *missense* variánst detektáltunk. Mivel a gén mutációi autoszomális domináns öröklődésmenettel szindrómás ASD-vel asszociálnak (OMIM:615834), illetve mivel a mutáció ritka (ExAC MAF 0,0002025), a ClinVar

adatbázisban még nem jelentett, a szegregációs vizsgálata mellett döntöttünk. A mutációt a beteg egészséges édesanyja is hordozta. Az annotációhoz használt legtöbb predikációs szoftver a variánst benignusnak jelzi, GERP értéke -1,62, mely nem konzervált lokalizációjára utal. Így ezt a variánst nem tartottuk kórokinak.

A panellel az mtdel-ASD csoport 60%-ban (6/10), míg a C-ASD csoport 71%-ban (5/7) tudtunk ismeretlen klinikai relevanciájú variánst kimutatni (9. Táblázat). A PM6-ban észlelhető *ZNF804A* variánst (rs112183442) a 6 egészséges kontroll egyén között is megtaláltuk két esetben, ezért felvetődött, hogy populáció specifikus lehet, mivel azonban az ExAC adatbázisban is prevalenciája 0,1-0,5% között van, valószínűleg benignus.

A PM8 betegnél egy *nonsense* patogén *DHCR7* variánst detektálunk, mely heterozigóta formában volt jelen, illetve ennek a betegnek egy *NHS* génben lévő VUS-a is volt. A variáns klinikai tünetekkel való korreláltatása során kiderült, hogy a variánst hordozó 5 éves kislányt elhúzódó sárgaság, emelkedett májenzim értékek és alacsony prothrombin értékek miatt congenitális CMV fertőzés iránydiagnózissal vizsgáltak, melyet az emelkedett IgM és IgG CMV antitest értékek alá is támasztottak. A kislány időre született császármetszéssel. A terhesség 11. hetén parciális placenta leválást véleményeztek. Születési súlya 3000 g volt. Sensoneurinális halláscsökkenését 8 hónaposan diagnosztizálták, ekkor fejlődés neurológiai vizsgálata normális fejkörfogatot, korának közel megfelelő pszichomotoros fejlettséget véleményezett. 26 hónaposan jobb oldalon, majd 29 hónaposan baloldalon került sor cochleáris implantációra. Az implantáció hatására, az addig késlekedő beszédfejlődése megindult. Három évesen diagnosztizálták az ASD-t. Hat évesen hyperaktivitás miatt risperidone került beállításra. Perzisztáló crusta lactea miatt bőrgyógyász kezelte.

**9. Táblázat:** Az IG panel eredményei mtdel-ASD csoport és a különböző kontroll csoportok esetén. A pannellel patogén mutációt csak a kontrollként alkalmazott mitochondriális betegséggel diagnosztizált egyéneknél találtunk. Benignus és valószínűleg benignus variánsok nem kerültek feltüntetésre.

Beteg	Gén	Mutáció	dbSNP	Zigócia	Öröklődés-menet	Szindróma	ACMG
<b>MtDNS delécióval rendelkező ASD eseteink (mtdel-ASD, N = 10)</b>							
PM9	<i>SUCLG1</i>	c.236G>A; G79D	n/d	HET	AR	mtDNS deplécio 9	VUS
<b>MtDNS delécióval nem rendelkező kontroll ASD eteink (N = 7)</b>							
C-ASD2	<i>EARS2</i>	c.295G>C; G99D	rs1188537602	HET	AR	OXPHOS deficiencia	VUS
<b>Mitochondriális betegséggel diagnosztizált kontroll csoport, ASD tünetek nélkül (N = 7)</b>							
C-MD2	<i>APEX1</i>	c.605G>C; R202P	n/d	HET	n/d		VUS
C-MD3	<i>ATP5A1</i>	c.517A>G; I173V	n/d	HET	AR	ATP syntase deficiencia	VUS
C-MD4	<i>YARS2</i>	c.572G>T; G191V	rs11539445	HET	AR	Myopathia, laktidózis	VUS
C-MD5	<i>MGME1</i>	c.532C>T; R178W	rs143417446	HET	AR	mtDNS deplécio 11	VUS
	<i>C10orf2</i>	c.1196A>G; N399S	n/d	HET	AR	Perrault	P
	<i>C10orf2</i>	c.1358G>A; R453Q	n/d	HET	AR	Perrault	VUS
C-MD6	<i>MRPL3</i>	c.224G>A; S75N	rs151331067	HET	AR	OXPHOS deficiencia	P
<b>MtDNS deléciót nem hordozó egészséges kontroll egyének (N = 6)</b>							
C-H3	<i>EARS2</i>	c.1445G>A; S482N	rs1275341540	HET	AR	OXPHOS deficiencia	VUS
C-H4	<i>SLC25A3</i>	c.655G>T; V219F	rs373621664	HET	AD	Mitochondriális foszfát carrier deficiencia	VUS

**10. Táblázat:** Az ASD-panel eredményei a mtdel-ASD, illetve korban illesztett non-mtdel-ASD (C-ASD) és egészséges felnőttek esetén.

Betegek	Gén	Mutáció	dbSNP	Zigócia	Öröklődés menet	Szindróma	ACMG
<b>MtDNS delécióval rendelkező ASD eseteink (mtdel-ASD, n = 10)</b>							
PM1	<i>FOXP2</i>	c.1114G>A; A280T	n/d	HET	AD	Speech-language disorder1	VUS
PM2	<i>RAI1</i>	c.4693G>A; V1565M	rs368106957	HET	AD	Smith-Magenis	VUS
	<i>AUTS2</i>	c.1298T>C; L433P	n/d	HET	AD	AUTS2	VUS
PM3	<i>TSC2</i>	c.66G>T; K22N	rs766200310	HET	AD	Sclerosis Tuberosa	VUS
	<i>CHD7</i>	c.4822delA; p.R1608Gfs*31	n/d	HET	AD	CHARGE	P
PM4	<i>RELN</i>	c.1487T>C; L496P	n/d	HET	AD/AR	Lysencephalia, ADEAF	VUS
	<i>KATNAL2</i>	c.169C>T; R57W	rs148791504	HET	AR/AD	n/d	VUS
PM6	<i>ZNF804A</i>	c.3322G>A; A1108T	rs112183442	HET	n/d	n/d	VUS
PM7	<i>RAI1</i>	c.3208G>A; G1070R	rs370633684	HET	AD	Smith-Magenis	VUS
PM8	<i>DHCR7</i>	c.452G>A; W119*	rs11555217	HET	AR	Smith-Lemli-Opitz	P
	<i>NHS</i>	c.1226G>A; R409Q	n/d	HET	XLD	Nance-Horan	VUS
PM10	<i>PDE10A</i>	c.1429C>G; P477A	rs61733392	HOM	AR/AD		VUS
<b>MtDNS delécióval nem rendelkező kontroll ASD eteink (n = 7)</b>							
C-ASD1	<i>SHANK2</i>	c.3406G>A; A1129P	rs377255888	HET	n/d	n/d	VUS
C-ASD2	<i>NRXN1</i>	c.2459G>A; S820N	rs80293130	HET	AR	Pitt-Hopkins-like	VUS
	<i>CNTNAP2</i>	c.2147A>G; Y716C	rs760930032	HET	n/d	Pitt-Hopkins like	VUS
C-ASD3	<i>SCN2A</i>	c.1729C>A; L577I	rs796053187	HET	AD	EIEE	VUS
C-ASD4	<i>NLGN4X</i>	c.266C>G; Q89H	n/d	HET	XLD	n/d	VUS
C-ASD6	<i>GNAI4</i>	c.860A>G; Y287C	rs61755085	HET	n/d	n/d	VUS



<b>MtDNS deléciót nem hordozó egészséges kontroll egyének (n = 6)</b>							
<b>Betegek</b>	<b>Gén</b>	<b>Mutáció</b>	<b>dbSNP</b>	<b>Zigócia</b>	<b>Öröklődés menet</b>	<b>Szindróma</b>	<b>ACMG</b>
C-H1	<i>ZNF804A</i>	c.3322G>A; A1108T	rs112183442	HET	n/d	n/d	VUS
C-H2	<i>ZNF804A</i>	c.3322G>A; A1108T	rs112183442	HET	n/d	n/d	VUS
C-H3	<i>RELN</i>	c.449C>T; A150V	rs752566456	HET	AD/AR	Lysencephalia, ADEAF	VUS

## 6 Megbeszélés

### 6.1 A magyar ASD kohorsz viszonyulása a nemzetközi kutatási eredményekhez

Az ASD prevalenciájának növekedése világviszonylatban észlelhető, ennek oka egyelőre nem tisztázott [1]. A fokozott diagnosztikus éberség mellett a szélesedő spektrum is hozzájárul a diagnosztizált betegek számának növekedéséhez [2]. A nagy átérésztőképességű molekuláris diagnosztikus módszerek felhasználása óta növekvő arányban kerülnek diagnosztizálásra a ritkább genetikai okok is. A KIR működését érintő alap kutatási eredmények klinikai korreláltatása olykor nehézkes, mivel a mindennapi klinikai diagnosztikában nem tükröződik vissza megfelelően a tüneti heterogenitás. Míg a Magyarországon érvényben lévő BNO10 az F84 kód alá tartozó 9 diagnosztikus csoporttal reprezentálja valamelyest az ASD heterogenitását [7], a DSM-V egyetlen, egységes diagnosztikai kategóriába sorolja, az esetenként nagyon különböző fenotípusos jegyekkel rendelkező egyéneket [225]. A vizsgálatunkba beválasztott egyéneket a nemzetközileg elismert, aranystandard kritériumok szerint próbáltuk meg diagnosztizálni, azért mert ezek a tesztek lehetővé teszik a tünetek számszerű leképezését ezáltal hozzájárulva az ASD súlyosságának megítéléséhez [10] [226]. A diagnosztikus teszteken túl különböző kérdőívek alkalmazásával törekedtünk egy mélyen fenotipizált kohorsz megalkotására, mely a genetikai tesztekkel együtt hozzájárul az ASD háttérében álló molekuláris alapmechanizmusok megismeréséhez.

A kohorszunk demográfiai adatait figyelembe véve mutatja az ASD populációkban felismerhető jellemvonásokat [12]. A mi kohorszunkban is észlelhető volt, hogy az ASD gyakrabban érint fiúkat, mint lányokat (5. Táblázat). Ennek oka egyelőre nem tisztázott. Mivel az ASD magas heritabilitása igen erős a genetikai háttérrel feltételez [27], felvethető a kérdés, hogy ez a nemek közötti aránytalanság genetikai okra vezethető-e vissza? Felvetődött az ASD háttérében gyakran mutálódó X kromoszóma szerepe [31], illetve a véletlenszerű X inaktiváció potenciális védő szerepe is [227]. Az általunk vizsgált génpanelben a gének negyede (27 gén) X kromoszómális lókuszu, mégsem találtunk szignifikáns különbséget fiúk és lányok között az X kromoszómára lokalizálható ritka variánsok tekintetében. Valószínűsíthető, hogy a nemek közötti különbségnek ASD-ben nem kizárólag genetikai oka

van. Ezt a megfigyelést erősíti, hogy komplex ASD formák esetében, ahol a nemek aránya kiegyenlítettebb, gyakrabban detektálhatóak erős hatású ritka variánsok a genomban, mint az enyhébb, idiopathiás formák esetében [228][227].

Több tanulmány is igazolja, hogy az előrehaladott apai életkor erősen hajlamosít az ASD kialakulására, melyet elsősorban a de novo variánsok akkumulációjával hoznak összefüggésbe [229] [230]. Kohorszunk esetében a szülők átlagéletkora nem esett a rizikó tartományba (5. Táblázat), összesen 2 apuka volt 45 év feletti életkorú a fogantatáskor.

Az irodalmi adatok alapján az autizmussal élők rokonai gyakran mutatnak autizmusra jellemző tulajdonságokat enyhébb formában. Ezt a jelenséget a szakirodalom széles autizmus fenotípusként írja le (broad autism phenotype) [22]. Magyarországon a széles autizmus fenotípus szinonímájának tekinthető rokonok küszöb alatti diagnózisa. A szülőknél direkt ASD-t célzó vizsgálatok elvégzésére nem volt lehetőségünk, hiszen nagyon gyakran csak az egyik szülő volt elérhető. Ezért kérdőíveink segítségével próbáltuk feltérképezni a családban fennálló esetleges küszöb alatti diagnózisokat, a szubklinikai tünetekre való rákérdezéssel. Ennek felmérésére eldöntendő kérdéseket és önkitöltős kérdéseket is használtunk. Mindezek mellett, mivel a kérdőívet többnyire csak az egyik szülő jelenlétében vettük fel, bizonyos esetekben az értékelés során nehéz volt kiküszöbölni a szülők egymáshoz való viszonyulását. Jól objektivizálható adatokra is rákérdeztünk, mint az iskolai végzettség, illetve az aktuális munkaviszony. Egy viszonylag új tanulmány szerint az apai IQ és az utód ASD fenotípusa között egy nem-monoton asszociáció állítható fel, melyet erősen befolyásolnak az egyéb társdiagnózisok [231]. Bár az IQ szint mérésre szintén nem volt lehetőségünk, a szülők iskolai végzettségével igyekeztünk ezt a kérdést indirekte megközelíteni. A százalékos eloszlás alapján a magas szülői iskolai végzettség nem volt gyakoribb az általunk vizsgált populációban, mint az átlagos, vagy átlag alatti végzettség (5. Táblázat). Ezért úgy véljük a magas szülői iskolai végzettség nem tekinthető sem küszöb alatti diagnózisnak, sem hajlamosító tényezőnek.

### **6.1 A genetikai diagnózis jelentősége saját tapasztalatink alapján**

Az ASD-vel elők egy kis csoportját azok a betegek alkotják, akiknek egy meghatározott szindrómájuknak a részjelensége az ASD, ezeket szindrómás ASD formáknak nevezzük. A

szindrómás ASD formák az össz ASD esetek kb. 10%-át teszik ki [232] [233], melyekhez ha hozzáadjuk az ASD-ben szerepet játszó magas penetranciájú genetikai eltéréssel rendelkezőket, elmondható, hogy monogénes etiológia az esetek 10-25%-ban azonosítható [47]. Vizsgálatunk során összesen 13 esetben tudtunk igazolni szindrómás ASD formát az általunk elvégzett módszerekkel, további öt esetben egyéb kiegészítő genetikai vizsgálat igazolt monogénes hátteret, olyan gének esetén melyek nem szerepeltek a panelünkön. Ennek megfelelően a vizsgálat ASD kohorszunk 10,34%-ban igazolódott monogénes etiológia. Az egyes szindrómás esetekben a patomechanizmus nagyon különbözik, attól függően, hogy az adott génnek mi a sejtbiológiai feladata. Kilenc esetben olyan genetikai eltéréseket találtunk, melyek különböző epigenetikai mechanizmusokon keresztül a génexpresszió és transzkripció módosulásai miatt vezetnek ASD-hez, kettő esetben a mikrotubulus-aktin citoskeleton diszfunkciója implikálható ASD patomechanizmusában és a fentmaradó öt esetben az ingerület átvédés és szinapszis alkotóelemeinek károsodása vezet tünetek megjelenéséhez. A két microdeléciós szindróma esetében a több gént érintő deléció miatt nem kísérrelhető meg ilyen típusú besorolás.

A KIR kialakulása során több konformáció változáson megy keresztül míg az ektodermális eredetű velőcsőből kialakul a cortex és subcortikális régiók funkcionális egysége. A morphogenesis ideje alatt megkezdődik a neurogenesis is, a sejtek differenciálódási folyamata. Mindkét folyamat a fejlődő szövet génexpressziós mintázatának változásával jár együtt [234] [235], ezért a transzkripciót szabályzó gének, transzkripciós faktorok fontos szerepet töltenek be, mind a fejlődő, mint a fejlett idegrendszer működése során.

A *MECP2* egyike a legrégebbi szindrómás ASD formában implikálódó transzkripciós faktoroknak, melynek mutációit 1999-ben igazolták a fenotípusosan jól körvonalazható Rett szindrómás lányok esetében [236]. Az elmúlt 20 évben több más fenotípussal is asszociálták mutációt, köztük több enyhébb essenciális ASD-re jellemző fenotípussal [237]. Vizsgálatunk során egy atípusos Rett-szindrómás kislány esetében igazoltunk ismert patogén *MECP2* mutációt. A kislány sem microcephaliával, sem epilepsziával nem rendelkezett a diagnózis pillanatában, azonban az ASD és középvonali kézmanírok felvetették Rett szindróma lehetőségét. A mutáció következtében egy korai translációs stop szignál trunkálja a fehérjét legalább 232 aminosav delécióját eredményezvén. Több Rett szindrómás eset hátterében

kimutatták a mutáció jelenlétét (PMID: 23270700, 1241840, 17089071, 10508514), egészséges kontroll populációban viszont nem került leírásra (ExAC). Funkcionális vizsgálat támasztotta alá a mutáció következtében kialakuló transzkripcionális represszor diszfunkciót, illetve a kóros mikrotubulus stabilitást (PMID: 23238081, 11058114).

A *CHD7* génben egy korábban az irodalomban nem leírt patogén mutációt azonosítottunk, mely alapján a 11 éves gyermeknél a CHARGE szindróma diagnózisát állítottuk fel. A gén CHARGE szindróma patomechanizmusában betöltött szerepe még pontosan nem ismert, azt tudjuk, hogy nélkülözhetetlen szerepe van a neuronális differenciálódási program szabályozásában [238]. Mivel egy ATP dependens helikázt kódol a nukleoszóma remodelációjában is részt vesz mely elengedhetetlen a transzkripció folyamatok megfelelő szabályozásában [162]. Az általunk detektált mutáció nem az eddig ismert funkcionális doménekbe esik (13. Ábra), de ennek ellenére az ACMG irányelvek szerint patogénnek tekinthető, és jól illeszthető a beteg fenotípusjegyeivel (8. Ábra).

Az *AUTS2* korábban, hajlamosító faktorként (susceptibility) került leírásra ASD háttérben, azonban a variánst hordozó egyének mély fenotipizálásával és a klinikai spektrum pontosításával nyilvánvalóvá vált a szindrómás ASD-ben betöltött szerepe [146]. A gén egyike a neuroanatómiai fenotípus géneknek [234], melyek a fejlődő agyban magas expressziót mutatnak [145]. A P13 esetben azért gondoltuk a detektált variánst kórokinak, mert a koponya MRI-n olyan major elváltozások voltak jelen, melyek megfeleltethetőek a neuroanatómiai fenotípus gének által létrehozott morfológiai elváltozásoknak. A detektált variáns egy szokatlan genetikai konstelláció eredménye, melynek következtében két cisz helyzetben lévő nukleotid mutálódott. Sajnos komplett szegregációs vizsgálat elvégzésére nem volt lehetőségünk, mivel az édesapa súlyos aethylismusa miatt nem volt elérhető.

Az epilepsziával társuló szindrómáknál pl. a Dravet, ADLTE esetén a detektált mutáció korrelálhat az epilepszia súlyosságával. Az *SCN1A* génben észlelt mutáció magyarázza a hypsarrythmia és a súlyos terápia rezisztens epilepszia fennállását, mivel a detektált mutáció a feszültségfüggő Na<sup>+</sup> csatorna pórusformáló alegységének feszültségszenzorát kódoló, 4-es szegmentumára lokalizálható [239]. A *RELN* mutációval asszociált ADLTE-val diagnosztizált esetről, pedig szintén jól illeszthető az enyhébb klinikai kép az irodalomban *RELN* mutáció következtében kialakuló epilepsziaképhez [127]. A *RELN* mutáció

autoszomális recesszív formában okoznak kifejezetten súlyos, nem feltétlenül epilepsziával járó fenotípust.

Felmerülhet a kérdés, hogy egy priméren Dravet szindrómával asszociált genetikai eltérés, mint a detektált *SCN1A* mutáció, hogyan vezet ASD-s tünetek megjelenéséhez? Hiszen jogosan feltételezhető, hogy a folyamatos epilepsziás rohamtevékenység okoz a KIR-ben olyan súlyos funkcionális eltéréseket, melyek végül ASD-s tünetekben nyilvánulnak meg. Erre az alap kutatásokból származó adatok adhatnak választ. *SCN1A* esetén Bender és mtsai kis interferáló RNS-ek alkalmazásával *Scn1a* heterozygóta KO egereken igazolták, hogy rohamtevékenység nélkül is, a Na<sup>+</sup> csatorna expressziójának csökkenése következtében a hippocampális oszcilláció dysregulációja volt észlelhető. Ebből arra következtettek, hogy a csatorna szerepe a tanulási folyamatokban a rohamoktól függetlenül is károsodik [240]. Melyből arra következtethetünk, hogy az *SCN1A* mutáció esetén a rohamoktól függetlenül is, a csatorna diszfunkciója miatt neuropszichiátriai tünetek alakulhatnak ki.

A genetikai diagnózis szükségességét és a standardizált szűrővizsgálatok végzését erősíti, hogy vizsgált populációnkban egy kislány esetében is igazolódott FXS. Tekintettel a kislány két egészséges fiútestvérére, a meglévő FXS-re utaló fenotípusos jegyek mellett sem gondoltak korábban erre a lehetőségre. Molekuláris diagnózisa a standardizált, nemtől független szűrés következménye volt. Az FXS diagnózis felállítása nem csak a beteg szempontjából fontos, hanem a család esetleges későbbi életkorban megjelenő tüneteinek hátterét is könnyebben megérthetjük, illetve lehetőséget nyújt a prenatális diagnosztikára. Egy FXS szindrómával diagnosztizált gyermek édesanyja ugyanis lehet teljes mutációt (expansiót) hordozó, akinél a szerencsés X inaktivációnak köszönhetően nem alakultak ki tünetek [241], viszont eshet az expansió nagysága a premutációs tartományba, mely a FXS-től eltérő fenotípusjegyekben nyilvánul meg [37]. A három FXS pozitív család közül, az egyik esetében a felmenők között premutációt hordozó nők esetében különböző neuropszichológiai eltérések voltak jelen, illetve egy esetben a Fragilis-X-Tremor-Ataxia szindróma (FXTAS) klinikai képe jelentkezett a beteg 60 év körüli nagynénjénél. A premutációs alléllt hordozó nők 8-17%-nál jelentkezik FXTAS, mely penetranciája függ a CGG repeat hosszától és az életkortól [242]. Az életminőségüket legjobban befolyásoló tünetet, a progresszív ataxiát mélyagyi stimulációval kezelni lehet [243].

Az *FMRI* nem az egyetlen olyan ASD gén mely neurológiai betegségekben is megnyilvánul. Szindrómás eseteink közül a *DMD* és *SPAST* mutációk is elsősorban neurológiai tünetekhez vezetnek. A gének biológiai funkciója magyarázza mégis az ASD tüneteit [98], viszont nem magyarázza, azt hogy mi az oka annak, hogy nem minden Duchenne izomdystrophiás és HSP4 beteg rendelkezik ASD-vel. Erre potenciális választ adhatna a pontosabb genotípus-fenotípus asszociáció ismerete. *DMD* esetében mutációk az egész gén mentén ismertek, fenotípusbeli megnyilvánulás tekintetében ismert szabály az “olvasási keret szabály” (reading frame rule) [244]. E szabály szerint, azok a deléciók, melyek leolvasási keret eltolódással járnak súlyosabb, míg az in-frame deléciók enyhébb fenotípusban nyilvánulnak meg. Esetünkben viszont egy stop mutáció hozta létre a súlyosabb fenotípust, mely izomtűneteket is okoz. Bár a *DMD* ritka variánsait összefüggésbe hozták már ASD-vel, olyan korreláció még nem került leírásra, hogy ezen variánsok milyen gyakran okoznak izomdystrophiát is [245].

A *SPAST* esetében ismert, hogy HSP4 háttérében leggyakrabban a gén konzervált, AAA doménjét érintő mutációk azonosíthatóak [121]. Az is igazolódott, hogy ugyanazon mutáció jelenléte mellett előfordult komplikált és tiszta HSP is, így egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggések nem állapíthatóak meg a gén szintjén [246]. Az általunk detektált mutáció bár a HSP specifikus AAA doménbe esett, HSP-re jellemző tinnettel sem a kislány, sem a mutációt szintén hordozó édesanya nem rendelkezett. Arról sajnos *SPAST* kapcsán sincs adat, hogy az ASD háttérében azonosított mutációk minden esetben társulnak-e a HSP-vel [247]. A P9 esetében detektált *PTPN11* missense variáns a gén tyrozin phosphatáz doménjében helyezkedik el, mely az erős konzerváltságot mutató reziduális arginint lysinre cseréli, ezáltal kicsit változtatva a fehérje fizikokémiai tulajdonságain. Minden általunk alkalmazott fehérje funkciót prediktáló szoftver a variáns károsító hatását feltételezi. Ezen variáns jelenlétét több Noonan szindrómás beteg esetében kimutatták (PMID: 16263833, 18562489, 11992261), viszont az ExAC populációs adatbázisban kontrollok esetében nincs jelen. Bár a variáns esetében funkcionális vizsgálatok nem készültek, a fenti két kritérium és a klinikummal való korreláltatás elégséges a variáns patogenitásának igazolására. Bár az általunk vizsgálat kislány esetében alacsony nívés nincs jelen, a kongenitális szívhiba és a neuropszichiátriai tünetek jelenléte összefüggésbe hozható a variáns jelenlétével. A beteg édesanyjánál

hordozói státusz nem igazolódott, az édesapa sajnos nem egyezett bele a szegregációs vizsgálatba, így nem tudtuk bizonyítani az esetleges összefüggést az apa féltestvérének Asperger szindrómájával, illetve az édesapa előző kapcsolatában vastag nyaki redővel rendelkező abortált magzattal. Bakker és mtsai. szerint normál kariogramm mellett megjelenő emelkedett nuchális transzlucencia esetén 5-15%-ban vethető fel *PTPN11* asszociált kórkép lehetősége [248]. Ez által nem kizárható, hogy ez édesapa esetleges csírvonalas mozaicizmusa állhat mindkét utód tünetei mögött.

A KIR kialakulása megszületésünk pillanatában még nem záródik le, hanem a különböző szenzoros ingerek hatására, korai feldolgozási folyamatok aktiválásának következtében még nagymértékben változik [249]. A kialakult szinapszisok funkcionalitásának változását értjük a szinaptikus plaszticitás alatt, mely az egész élet során egy folyamatosan zajló esemény. Homeosztatisz szinaptikus plaszticitás fő mechanizmusa az aktivitás függő negatív feedback, melynek köszönhetően a KIR védekezik a krónikusan fokozott aktivitás ellen [250]. A *PTPN11* mutációk a neuronális aktivitásra indukálódó RAS útvonal zavara által változtatják a szinapszis glutamáterg receptor expresszióját, mely neuropszichiátriai tünetek megnyilvánulásához vezet [251]. A szinapszisok összetétele alvás és ébrenlét függvényében is változik, melyhez mind a neurologinek által szabályzott glutamát- és GABAerg szignálok változása [54], mind a *GRIN2B*, *CREBBP*, *BDNF* gének alvás dependens expressziója hozzájárul [252].

Vizsgálatunk során csak azokban az esetekben végeztünk szegregációs vizsgálatokat, melyeknél szindrómás ASD forma lehetősége vetődött fel. Kohorsz szintjén nem ellenőriztük minden detektált ritka variáns esetében, hogy *de novo* mutációról van-e szó. A szindrómás ASD formák közül hat esetben igazolódott a mutáció *de novo* státusza. Az ASD-vel asszociált génekben a ritka, *de novo* exoni mutációk az esetek 5-14%-ban kimutathatóak [253] [254]. Az is igazolt, hogy a simplex ASD családok esetében a *de novo* ritka variánsok aránya szignifikánsan nagyobb az ASD-vel diagnosztizált családtagban, mint az egészséges testvérükben, a ritka szinoním variánsok között viszont nem észlelhető különbség [253]. Bár a *de novo* funkcióvesztő mutációk kóroki szerepe elég gyakran nem egyértelmű, ezek dúsulása nő nemű ASD-vel élőkben arra utal, hogy közrejátszanak az ASD genetikai hátterének megteremtéséhez [49]. Korábban úgy vélték, hogy az ASD-vel diagnosztizált nők



nagyobb része rendelkezik súlyosabb ASD tünetekkel, így a spektrum ezen végén a fiú:lány arány kiegyenlítettebb [20]. Enyhébb ASD formákban, mint pl. az Asperger-szindróma, a fiú:lány arány még a megszokottnál is nagyobb mértékben van eltolódva a fiúk javára (fiú:lány arány 11:1)[253]. Mások viszont azt feltételezik, hogy a nemi különbségek jelenléte ASD-ben abból eredeztethető, hogy a nők rendelkeznek védő faktorokkal ASD-vel szemben [255][228]. Ezen némiképpen ellentmondó felvetéseket magyarázhatja az a megfigyelés, hogy az ASD súlyossága fokozódik IKZ társulása esetén, és a *de novo* károsító genetikai eltérések elsősorban a non-verbális IQ szinttel mutatnak korrelációt [256]. A mutációs ráta az életkor előrehaladásával növekszik a csirasejtekben is, ebből adódhat, hogy a magasabb apai életkorral korrelációt mutat a *de novo* mutációk gyakoriságai [230][229].

Összességében elmondhatjuk, hogy a detektált szindrómás formák esetében, egy kivételétől (*SPAST*) eltekintve nem volt váratlan a szindrómás forma fennállása. Fenotípus alapján az összes diagnosztizált esetben lehetett számítani monogénes formára, mivel mindegyik hordozott, olyan jellemző klinikai tünetet, mely alapján a beteget a complex ASD kategóriába soroltuk, ahol a monogénes háttér igazolódására nagyobb esély van [257].

Vizsgálatunk során a monogénes háttér legerősebb indikátorai a társuló IKZ, az epilepszia, illetve társuló neurológiai tünetek (pl. ataxia) voltak, de ugyan így az MPA-k specifikus konstellációi is felvethetik szindrómás forma lehetőségét, mint például a Fragilis-X-szindróma vagy CHARGE-szindróma esetében.

A szindrómás ASD formák meghatározása elsődlegesen a családon belüli ismétlődési rizikó meghatározásában segít. Ilyen esetekben a *de novo* mutációk jelenléte nem feltétlenül egyszerűsíti a tanácsadást, mivel általában a csirasejtekben jelenlévő mutációk vizsgálatára nincs lehetőségünk és az apa életkorának növekedésével pont ezeken a helyeken akkumulálódnak a *de novo* eltérések [256]. A genetikai diagnózisnak prognosztikai jelentősége is lehet és bizonyos esetekben támpontot nyújt a specifikus komorbiditások keresésére. Terápiás megközelítésre egyelőre, a legtöbb esetben, csak a tüneti kezelések kapcsán van lehetőségünk.

Sajnos kutatásunk során nem volt lehetőségünk a nagyobb CNV-k teljeskörű szűrésére, valószínűleg ez magyarázza, hogy a diagnosztikus sikerarányunk kissé elmarad a nemzetközileg ismerttől. Egy hasonló esetszámú és eszközparkú vizsgálat során [258] a

kiegészítésként alkalmazott microarray vizsgálat 12%-ban igazolt olyan CNV-t, mely összefüggésbe hozható a tünetekkel. A nemzetközi ajánlásokat is figyelembe véve a szekvenálási metodikák mellett a CNV-k genom szintű szűrése képezi az ASD diagnosztika gerincét [36].

## **6.2 A kohorsz szinten detektált ritka variánsok jelentősége**

Az ASD magas heritabilitása arra utal, hogy a genetikai tényezők a betegség hátterében igen erősek. Ennek ellenére a klasszikus diagnosztikus genetikai vizsgálatok még a legjobb esetben is csak az esetek 10-15%-ban tudnak monogénes hátteret alátámasztani [233]. Emiatt feltételezzük, hogy a genetikai háttér komplex és az esetek nagy részében nem egyetlen gén eltérése okozza azt. Az ASD kialakulhat kevés erős hatású ritka eltérés eredményeként, de sok kisebb hatású gyakoribb eltérés összegeként is [259]. Bourgeron és mtsai. szerint a kép még ennél is komplexebb, szerintük a gyakori közös variánsok egy alapkockázatért felelősek és puffereket a ritka nagyhatású variánsok klinikai tüneteinek megnyilvánulásait [47]. Noha a becslések szerint a gyakori variánsok simplex és multiplex családok esetén 40-60%-ban tehetőek felelőssé a hajlam kialakulásáért [260], a legtöbb genom szintű asszociációs vizsgálattal (GWAS) csak kevés lókuszt lehetett azonosítani ASD hátterében [261] [262]. Ezzel szemben viszont több száz olyan ritka genetikai eltérést azonosítottak ASD hátterében, mely jelentősen növelik az ASD kockázatát, és összességében az esetek 10-25%-áért felelősek [47]. Ezen kandidáns gének többsége a 2q, 7q, 15q és X kromoszómára lokalizálható [36] [232]. Panelünkön ezen kromoszóma régiók 8, 11, 3 és 27 esetben reprezentálódtak (3. Táblázat). Vizsgálatunk során mi is azt tapasztaltuk, hogy egy-egy betegben általában több ritka variáns is észlelhető (összesen 370 ritka variánst találtunk a 174 beteg-ben), mely támogatja az ASD polygén etiológiáját.

A ritka esetleg *de novo*, erős hatású variánsok felismerése egyén szintjén fontos mivel így juthatunk el új szindrómás/monogénes ASD formák felismerésére, mint ahogy az a *CHD8* [263] és *AUTS2* [146] gén esetében is történt. Viszont ezen variánsok még génenkénti csoportosításban is távol állnak attól, hogy magyarázó erővel bírjanak kohorsz szinten. Mivel a cikkekben reprezentált kohorszból csak 15/3730 [263], illetve 24/49684 [146] esetben igazolódtak. Ez is azt bizonyítja, hogy ASD-ben csak sok rizikó gén egyidejű vizsgálatkor érhető el a 10-25%-os sikerráta. Ahhoz hogy a WES vizsgálatok, olyan heterogén

betegségben mint az ASD, gén/lókuszt szintjén elérjék a genom szintű szignifikancia értéket nagyon nagy mintaszámra lenne szükség [264]. Ezért a WES vizsgálatok találati arányának növelése érdekében egy lehetséges megoldás, hogy egy adott haplotípusba tartozó gének kerüljenek vizsgálatra [265], vagy olyan régiók génjei melyek korábban, már pozitív asszociációt mutattak ASD-vel nagy eset-kontrol kohorszokban [266]. Ez utóbbi a régiók variáns terheltségének meghatározása által növeli a szignifikancia szintet.

Vizsgálatunk során mi is a gén szintű ritka variáns terheltség meghatározásával próbáltunk közelebb jutni a variánsok kohorsz szintű jelentőségéhez. Ehhez a Rao és Nelson által fejlesztett szoftvert és metodikát használtuk [216]. Ez a megközelítés lehetővé tette, hogy egy általános, nagy, kontroll csoport exom adataihoz viszonyítsuk a saját találatainkat. Az esetleges populáció-specifikus variánsok kizárására a MAF-ot 5% alattira állítottuk, és a saját exom adatbázisunk adataival is összevetettük. Összesen 5 gén esetében találtunk a vártnál szignifikánsan nagyobb variáns terheltséget, az *AUTS2*, *NHS*, *NSD1*, *SLC9A* és *VPS13B* génekben. Ez erősíti a gének ASD kockázatában játszott szerepét. A kis esetszám miatt a többi kandidáns gén szerepét nem tudtuk megerősíteni. Kleefstra és mtsai. irodalmi áttekintésében más megközelítést használt IKZ-ban a detektált genetikai háttér értelmezésére, mégis a miénkhez hasonló eredményeket észlelt. Ők azt találták, hogy a chromatin kötő, -remodelláló, -modifikáló gének 2,7-szer gyakrabban érintettek IKZ-ban, mint más funkcióval rendelkező gének. Hasonló eredményt adtak a szinapszis funkciójához kötött gének is, ahol 3-szoros dúsulás figyelhető meg [138]. Az öt magasabb ritkavariáns terheltséget mutató gén közül az *AUTS2*, *NSD1* a chromatin szerkezetét befolyásolja hiszton modifikációban játszott szerepén keresztül (3. Táblázat), az *SLC9A9* pedig ioncsatorna funkciója miatt szinaptikus funkcióban vesz részt [85].

A detektált genetikai háttér további erősítésére teszteltük, hogy a ritka variáns terheltség korrelál-e az ASD súlyosságával, esetleg az MPA-k számával. Erre azért volt szükség, mert tudjuk, hogy az MPA-k jelenléte növeli a genetikai tesztek diagnosztikai sikerrátáját [12] [257]. Testvérvizsgálatok alapján az is kimondható, hogy súlyosabb, IKZ-val társuló ASD-ben a detektált károsító (LGD – likely gene disrupting) mutációk száma szignifikánsan nagyobb, mint az egészséges testvérek esetében [49]. Tehát a komplex (MPA-val társuló) és súlyosabb ASD formák esetében valószínűbb egy erős hatású genetikai eltérés felfedezése,

mint az enyhébb, essenciális esetekben. Ezen felül az is kimutatható volt korábbi tanulmányok alapján, hogy a nonverbális IQ fordítottan arányos a de novo mutációk előfordulásával [256].

Kohorszunkban nem találtunk korrelációt sem a ritka variáns terheltség és MPA-k száma, sem a ritka variáns terheltség és ASD súlyossága között. Diszmorfológiai tünetek szempontjából a kohorszuk elkülönült a kontroll populációtól (4. és 5. Ábra), viszont az igazolt monogénes háttérrel rendelkező csoport számszerűleg nem rendelkezett több MPA-val, és arcdiszmorfiát elemző szoftver segítségével sem igazolódott szignifikáns különbség a két csoport között (3.,4. és 5. Ábra).

### **6.3 A fenotípus klaszter képzés jelentősége**

Mivel az ASD mind klinikailag, mind genetikailag nagyon heterogén, a fenotípus klaszteranalízis célja, hogy olyan klinikai alcsoportokat azonosítson, melyek közös specifikus háttérrel és patomechanizmussal rendelkeznek. Az ASD kutatásban régóta áhított cél, hogy a nagyon heterogén és változatos tünetekben megnyilvánuló betegségben belül fenotípus alcsoportokat azonosítsanak [267]. Több objektív matematikai és adatbányászati technika alkalmazásával próbáltak már homogén csoportokat képezni klinikai tünetek alapján, mint például a dimenzionális redukció, klaszteranalízis. Több korábbi tanulmány is beszámolt arról, hogy az ADI-R kérdőívek adataiból van lehetőség klaszterelemzésre, hiszen ez a kérdőív több genetikailag is releváns kérdést is tartalmaz [268]. Főleg a lineáris metodikák, mint a fő komponens analízis és a hierarchikus klaszterezést volt sikeres homogén alcsoportok azonosításában [269] [270]. Az is igazolódott, hogy a klinikai klaszterek között különböznek a génexpressziós profilok, tehát az ilyen technika alkalmas lehet az endofenotípusok feltérképezésére [269] [270]. Az összes általunk citált tanulmány elsősorban a nyelvi készségek, főleg a nem beszélő, súlyos beszédzavarral küzdő ASD csoportot illetve, a savant tulajdonságú csoportot tudta különálló alcsoportként detektálni. Ez utóbbi [270] igazolta, hogy a savant tulajdonságú, súlyos beszédzavaros és enyhe tünetekkel rendelkező ASD alcsoport különböző génexpressziós mintázattal rendelkezik. Saját vizsgálatunkban spektrális klasztereléssel négy fenotípus klasztert azonosítottunk, de egyik esetében sem igazoltunk elkülönülő genetikai hátteret, ritka variáns dúsulást [271]. A szindrómás eseteink sem egy klaszterbe sorolódtak, hanem eloszlottak a különböző

fenotípusklaszterek között, ennek egy lehetséges oka, hogy a négy FXS-el diagnosztizált eseten kívül a legtöbb szindrómás formában azonosított genetikai eltérés különböző jelátviteli útvonalat érintett.

Az ASD leggyakoribb komorbiditásai az IKZ [14] és az epilepszia vagy más EEG eltérések [12]. ADHD is az esetek több mint felében megjelenik [15]. A mi kohorszunkban is az ADHD és IKZ volt a két leggyakrabban említett társdiagnózis. A fenotípus klaszterképzés során ezek a tulajdonságok legalább két klaszterben jelen voltak (18. Ábra). A 11 legjellemzőbb fenotípusos jegy alapján a klaszterek között átfedést lehetett érzékelni, de a korábbi tanulmányokhoz képest, a vizsgálatunkban is sikerült valamelyest elkülöníteni a főleg nyelvi készségzavarokkal rendelkező alcsoportot, illetve a hiperaktivitás-figyelemhiány-kényszereselekvés tengely mentén is körvonalazódott egy alcsoport.

A standardizált diagnosztikus kérdőíveken alapuló klaszteranalízis során felvetődik a kérdés, hogy valóban alcsoportképzés történik-e és nem pedig a spektrumon belül elhelyezkedő különböző súlyosságú „gradiens” csoportok keletkeznek-e [272]? Mi úgy gondoljuk, hogy mindaddig amíg az állapot súlyosságát, nagyon gyakran nem is a főbb ASD specifikus tünetek, hanem a társtünetek súlyossága határozza meg [13], addig ez a kérdés nem megválaszolható a csak a standardizált kérdőívekből származó adatok alapján. Alternatív forrásokból származó adatokkal kiegészíthető és továbbfejleszthető a módszer, pl. a képkalkuló vizsgálatokból származó adatokkal [273], vagy egyéb, az elektronikus egészségügyi nyilvántartásban szereplő, adatokkal [274]. Ez utóbbihoz, jó kezdeményezés a Magyarországon is létrehozott elektronikus egészségügyi szolgáltatási tér. Vizsgálatunk betegbeválasztási fázisában ez a rendszer még nem volt elérhető, így mi az ADI-R kérdőívek adatait saját kérdőíveink (a szülők által kitöltött ASD kérdőív és a vizsgáló orvos által kitöltött klinikai kérdőív) adataival egészítettük ki és ezen az összepoolozott adatmennyiségen végeztük a klaszteranalízist.

Összességében a fenotípus klaszterképzésnek elengedhetetlen szerepe van az endofenotípus meghatározásban. Bár ezen a kis esetszámon is észlelhetőek klinikailag elkülönülő, bizonyos klaszterekben csoportosuló fenotípusjegyek, nagyobb mintaszámra és jobban elérhető standardizált adatokra van szükség messzemenőbb következtetések levonásához.

#### 6.4 A mitochondriális DNS érintettségének jelentősége ASD-ben

Több, mint 20 éve vizsgálják a mitochondriális diszfunkció ASD-ben betöltött szerepét [185]. Nyilvánvalóvá vált, hogy mitochondriális diszfunkcióval asszociálható biokémiai eltérések gyakoriak az ASD-vel élő gyermekek között, ezek prevalenciája 7,2% [187]. Az egyik legnagyobb ASD etiológiai hátterét vizsgáló tanulmány 10-ből 8 ASD gyermek lymphocitájában igazolt csökkent NADH aktivitást [186]. A gyermekek közül azonban mindössze kettőnél igazolódott mtDNS deléció az észlelt biokémiai eltérés hátterében, öt esetben pedig egyéb mtDNA kópiaszám eltérést találtak [186]. Felvetődött, hogy vajon a mitochondriális dysfunkcióval asszociált ASD külön endophenotípust képez-e az ASD-n belül? Olyan primer genetikai eltérést, mely magyarázná a mitochondriális diszfunkció jelenlétét az esetek 79%-ban nem igazolódott [184]. Mivel nagyon gyakran a genetikai vizsgálat nem talált primer eltéréseket felvetődött, hogy a mitochondriális diszfunkció másodlagos lenne. Vizsgálatunk során a detektált mtDNS eltérések eredetét próbáltuk meghatározni, illetve azt hogy a detektált mtDNS deléció a betegek tüneteivel összefüggésbe hozható-e [196]? Ezen felül kerestük a primer mitochondriális betegségek asszociációját az ASD-vel. Ezekre azért volt szükség, mert bár a mitochondrium önálló DNS állománnyal rendelkező sejtsejtszervecske, a működéséhez szükséges fehérjék jelentős részét nukleáris gének kódolják [203]. A vizsgált ASD csoporton belül szignifikánsan magasabbnak találtuk az mtDNS deléció előfordulását, mint a kontroll populációban. Ezért ellenőriztük, hogy fennáll-e olyan genetikai eltérés, mely magyarázza a beteg tüneteit és a fennálló mtDNS deléciót. Egy kisebb 12 ASD-vel diagnosztizált gyermeket vizsgáló tanulmányban 8 esetben találtak mitochondriális deléciót, melynek hátterében intergenomiális kommunikációs eltéréseket, környezeti faktorokat és gén-gén interakciós hatásokat feltételeztek [194]. Mivel az ASD genetikai hátterének tisztázására alkalmazott panelen mindössze két olyan gén volt, mely mitochondriális fehérjét kódol, az *IMMP2L* illetve az *SLC9A6* ezért szükséges volt olyan genetikai tesztek is elvégezni, melyek kizárják a primer mitochondriális betegséget, melynek szintén lehet tünete az ASD. Ezért ASD csoportunkban ellenőriztük a mtDNS hotspot mutációk jelenlétét, illetve használtunk egészséges (C-H) és primer mitochondriális beteg (C-MD) kontroll csoportot. A nukleáris mitochondriális háttér tisztázására olyan panelt terveztünk, mely a leggyakoribb intergenomialis kommunikációban résztvevő géneket

vizsgálta [203]. Ezzel a panellel az mtdel-ASD és a non-mtdel-ASD csoportokban 1-1 ritka variáns igazolódott, melyek közül, egyik sem tudta egyértelműen megmagyarázni a mitochondriális diszfunkció jelenlétét, mivel a variánsok olyan génekben fordultak elő, melyek autoszomális recesszív öröklődésmenettel asszociáltak, és kohorszunkban mindegyik csak heterozygota formában volt jelen. A primer mitochondriális betegcsoportban viszont több jelentős rizikójú ritka variánst is igazolt.

Egyesek úgy gondolták, hogy a mitochondriális diszfunkció inkább a szindrómás ASD formák közös etiológiai tényezőjének tekinthető [183], mások azt feltételezték, hogy a nem-szindrómás ASD egyik lehetséges magyarázó eleme [184]. Vizsgálatunk során mi egy szindrómás ASD forma esetében tudtuk igazolni az mtDNS deléció jelenlétét, mégpedig a CHARGE-szindrómás kisfiú esetében. Ebben az esetben a de novo, frameshift *CHD7* mutáció mellett egy *TSC2* ritka variánst is detektáltunk, melyet VUS-nak interpretáltunk. A CHARGE szindrómában az ASD nem ritka fenotípusjegy, mivel az esetek 30%-ban előfordul. A kisfiú esetében már születésétől kezdve észlelt laktát acidózist, melyet azonban nehezen tudtuk összefüggésbe hozni a szindrómával. A *CHD7* funkciója szerint egy erősen ATP dependens chromatin remodellátor, mely több gén transzkripciós regulátoraként működik [162], feltételezzük, hogy indirekt mechanizmussokkal magyarázható a társuló mtDNS deléció és laktacidózis [196]. A detektált *TSC2* mutációt nem tartottuk tünetképzőnek, mivel a beteg klinikailag nem teljesítette a sclerosis tuberosa major kritériumai közül egyet sem [275]. A *TSC2* mutációk az mTOR útvonal aktivációja révén növeli az mtDNS expressziót és a mitochondriális densitást. Az mTOR útvonal a sejtnövekedésben betöltött szerepéhez kapcsolatosan szabályozza a mitochondriális membrán potenciált és az ATP szintézis határfokát [276]. Mindezeket összevetve nem kizárható, hogy indirekten mindkét genetikai eltérés hozzájárul az mtDNS deléció létrejöttéhez.

Egy másik esetben (PM8) kongenitális CMV fertőzés társtüneteként találtuk meg az mtDNS deléciót. Genetikailag a beteg egy ismert patogén *DHCR7* mutációval rendelkezett, heterozygota formában és egy VUS-ként interpretált *NHS* mutációval. A *DHCR7* mutációi szindrómás ASD formával asszociáltak, mivel Smith-Lemli-Opitz szindrómát (SLOS) hoznak létre [277]. Eddig azonban egyetlen egy hazai publikáció kivételével [278] a szindróma hátterében homozygota vagy compound heterozygota mutációkat detektáltak

[134]. Az SLOS-ben a koleszterin szintézis utolsó lépése károsodik és így 7-dehydrocholesterin szint emelkedett lesz, az emelkedett 7-dehydrocholesterin szint mitochondriális diszfunkcióval való társulása ismert [279]. Az eset érdekessége, hogy akut CMV fertőzés szintén eredményezhet mitochondriális diszfunkciót, mivel a megnövekedett glikolízis a szabad oxigényökök felhalmozódását eredményezi [280]. A kislány esetében a 7-dehydrocholesterin szint normális volt. Ezért feltételezzük, hogy ebben az esetben a genetikai eltérés és a korábban igazolt infekció hozták létre a mitochondriális károsodást.

A Fragilis-X szindrómában is ismert a mitochondriális diszfunkció. *Fmr1-KO* egérkísérletek során igazolódott, hogy a FMRP hiánnyal egyidőben a dendritek mitochondriumi morfológiailag kisebbek és fragmentáltabbak voltak, melynek oka a mitochondriális fúziós készség károsodása volt [199]. A mitochondriális fúzióban szerepet játszó gének transzkripciója csökkent volt *Fmr1-KO* egerekben. A mitochondriális fúziót serkentő phenylhydrazone kezelés hatására a dendritek érési folyamata parciálisan helyreállt [199].

Az mtdel-ASD csoportunk 60%-a hordozott valamilyen ritka mutációt az ASD asszociált génekben, de ez ugyan úgy igaz volt a kontrollként használt 7 mtDNA delécióval nem rendelkező C-ASD esetre is. A mtDNS delécióval rendelkező esetek között is találtunk ritka missence variánst az *AUTS2* génben, ebben az esetben mégsem feltételeztük az *AUTS2* szindróma fennállását, mivel a beteg tünetmentes édesanyja is hordozta a mutációt. Az előző fejezetben szindrómás ASD-ként bemutatott *AUTS2* variáns hordozó beteg és az mtDNS-deléciót és *AUTS2* mutációt hordozó beteg fenotípusa között is volt eltérés, a szindrómás formában társult epilepszia is és jelentős mértékű agresszivitás, míg az utóbbi esetben egy enyhébb, jól funkcionáló ASD esettel álltunk szemben. A genetikai tanácsadást nehezítő tényező, hogy az *AUTS2* szindróma fenotípusa 2013 óta [281] még minidg csak körvonalazódik és egyetlen szerző munkásságának köszönhető a bemutatott esetek jelentős hányada [146]. A legnagyobb esettanulmány 13 *AUTS2* szindrómás betegről számol be, melyek közül 12 esetben a génben deléció igazolódott, és minössze 1 eset került leírásra nonsense mutációval [146]. Összességében az epilepszia hiánya és az anyuka tünetmentes hordozói státusza volt a legfőbb oka annak, hogy az utóbbi esetben (mtdel-ASD PM2) ezen variáns kóroki szerepét elvetettük. Kohorsz szinten végül is igazolódott, hogy a gén ritka



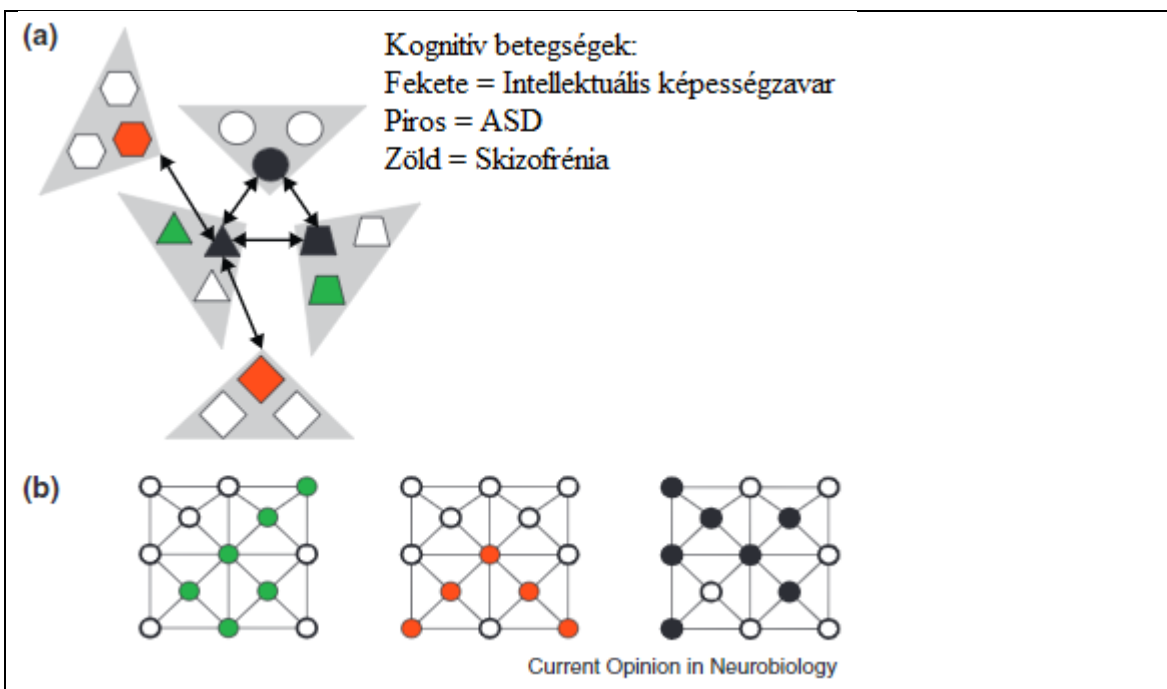
variánsai asszociációt mutatnak ASD-vel, mivel panelünkön az egyik leggyakrabban mutálódó gén volt. Szindrómás formával mégis csak egyetlen mutációját asszociáltuk (P13). Mivel genetikailag mind a monogénes, szindrómás ASD formákkal, mind a nem szindrómás ASD formákkal asszociált az mtDNS deléció a kohorszunkban feltettük a kérdést, hogy különböznek-e ezek az esetek mitochondriális betegség specifikus tüneteik tekintetében az mtDNS deléciót nem hordozó ASD esetektől. Korábban Rossignol és Frye az ASD/MD kohorszot összehasonlította általános ASD és általános MD csoportokkal [184]. Jellemzőnek találták az ASD/MD csoportban az emelkedett laktát/pyruvát szinteket, az epilepszia, a megkésett motoros fejlődés és gastrointestinális tünetek gyakoriságát, és már ebben a csoportban is sokkal kiegyenlítettebbnek találták a nemek közötti eloszlást [184]. Egységesen elfogadott biomarker nem áll rendelkezésünkre mitochondriális betegségekben, azonban a serum laktát szint, a laktát/pyruvát arány, az acyl-carnitine direkt markerei az mitochondriális diszfunkciónak [198]. Vizsgálatunk során mi szignifikánsan gyakoribb eltérésnek találtunk a fejlődésbeli regresszió és multiszisztémás érintettség jelenlétét a mtdel-ASD csoportban, azonban neurológiai tünetek és a izomhypotonia százalékos eloszlása is magasabb volt ebben a csoportban (19. Ábra). Mitochondriális betegségre utaló biokémiai eltérést csak 4 esetben tudtunk igazolni, melyből 3 esetben a magasabb laktát érték, egy esetben pedig az emelkedett laktát/pyruvát arány utalt a betegségre.

Mivel az mtDNS asszociált mitochondriális betegségnek különlegessége, hogy maternalisan öröklődik, ezért a kohorszunkban megnéztük, hogy a gyermekek családi anamnézisében a maternalis ágon előfordulnak-e mitochondriális betegségre utaló eltérések. A mitochondriális betegségre utaló eltéréseket az MDC score használatával összegeztük. Egy szülő esetében sem utalt az MDC érték definitív mitochondriális betegségre, viszont egyik szülőnél sem történt izombiopszia mely az MDC értéket akár két ponttal növelhette volna.

### **6.5 Átfedések más neurodevelopmentalis betegségekkel**

A genetikai vizsgálatok elterjedésével sorra igazolódott a legkülönbözőbb pszichiátriai betegségekről, hogy azok a szinapszis diszfunkcióhoz társulnak [51]. GWAS vizsgálatok során az igazolódott, hogy jelentős az átfedés az egyes pszichiátriai betegségekben kimutatott rizikóallélok tekintetében, tehát a genetika felülírja a diagnosztikus határokat [282]. Jelenleg az idegrendszer betegségei hátterében, leggyakrabban, valamilyen PSD alkotóelemét kódoló

gén mutációja igazolható [138]. A PSD állványfehérjéinek genetikai eltéréseit mind ASD, mind szkizofrén betegeknél kimutatták, ezáltal felvetve a közös neurobiológiai patomechanizmus lehetőségét [94]. A legtöbb általunk vizsgált gén is a szinapszis különböző alkotóelemét kódolta, amint azt a “Bevezetés” fejezetben be is mutattuk. Vizsgált génjeink legnagyobb részben a szindrómás és nem-szindrómás IKZ hátterével mutatottak átfedést (3. Táblázat). Genetikai szempontból nem lehet különbséget tenni a különböző pszichiátriai diagnózisok között, illetve tüneti szempontból is jelentős átfedés lehet pszichiátriai diagnózisok között. Klinikumban gyakran előfordul, hogy egy elsődleges diagnózis mellett általában több komorbiditás is észlelhető. Ahogy patomechanizmus és tünetek tekintetében is jelentős átfedés van a diagnózisok között egyre elterjedtebb az a nézet, hogy a pszichiátriai betegségek egyazon spektrum különböző végtpontjainak tekinthetők [34]. Az ASD kohorszunk vizsgálata során is igazolódott, hogy az IKZ és ADHD gyakori társkiagnózisok, komorbiditások az ASD mellett (2. Ábra). Amennyiben a családi anamnézist is figyelembe vettük, kiderült, hogy egy-egy esetben, rokoni kapcsolat miatt közös genetikai okkal asszociáltan, a pszichiátriai betegség széles palettája került leírásra (6. Ábra). Az egyik legnagyobb kiterjedésű vizsgálat 265218 beteg 17 fenotípusos osztályát vizsgálta annak érdekében, hogy meghatározza az átfedés mértékét a különböző neurológiai és pszichiátriai betegségcsoportok között [282]. Ők azt találták, hogy a pszichiátriai betegségek genetikai hátterében jellemző a közös etiológiai tényező, míg neurológiai betegségek esetén a genetikai háttér és az etiológiai okok is elkülönülnek egymástól. A neurológiai betegségek közül csak a migrén mutatott korrelációt különböző pszichiátriai betegségekkel, mint az ADHD, unipoláris major depresszió és Tourette szindróma [282]. Egy potenciális magyarázatot mutatnak be Grant és mtsai. a közös etiopatogenezis - különböző fenotípusos megnyilvánulás problematikájára. Mivel mind az ASD [52], IKZ [283] és szkizofrénia [34] patomechanizmusát tekintve alapvetően szinaptopathiának tekinthető, a szinapszis funkcionális alegységének triász (receptor, állványfehérje és enzim) károsodik a genetikai tényezők következtében. Ugyanazon genetikai faktorok különböző eltérései bizonyos mértékben IKZ-val, ASD-vel vagy szkizofréniaival asszociálnak, de a végső fenotípust az elváltozások mintázata hozza létre (20. Ábra).



**20. Ábra:** A kognitív betegségek háttérében álló szinaptopátia sémája. Az a) ábrán az idegrendszer funkcionális alegységének az alkotóelemei vannak ábrázolva és azok interakciói. A különböző alakzatok egy-egy kulcsszerepet betöltő molekuláris csoportra utalnak (kör, háromszög és trapéz), illetve ezen alapmechanizmusok szabályzó elemeire (hatszög és rombusz). A funkcionális alegységet alkotó hármast: receptor funkciójú, állvány funkciójú és enzim funkciójú fehérjék szoros együttműködése is látható. A színek a különböző betegségekben detektált funkciócsoportokat hivatottak jelölni és ábrázolják, hogy a különböző betegségekben a szinapszis ugyanazon alkotóelemei érintettek más-más módon. A b) ábrán észlelhető, hogy a neuronális hálóban a detektált variánsok nem egyesével, hanem bizonyos mintázatok alkotása során vezetnek eltérő pszichiátriai diagnózisokhoz, de egy – egy pont érintettsége több betegségben azonos lehet [51].

Az ASD és epilepszia társulásának genetikai okainak feltárása kapcsán két különböző patomechanizmus feltételezhető. Az egyik az excitatoros és inhibitoros szinaptikus egyensúly megbomlása, melynek során egy excitatoros túlsúly keletkezik, mely miatt az ingerküszöb lecsökken [52] [54]. Ez az ingerküszöb csökkenés nem csak epilepszia megjelenésében nyilvánulhat meg, hanem egy potenciális magyarázat lehet, ASD-ben észlelt túlzott szenzoros hyperérzékenységre is [284][285]. A legtöbb ASD génhiba esetében

funkcionálisan visszaigazolható a szinapszis összetételének változása (Izd. Bevezetés c. fejezet), azonban előfordulhat olyan eset is, amikor egy rossz időben bekövetkező inger vezet a serkentő-gátló szinapszisok arántalanságához. A GABAerg neurotranszmisszió zavarát mind ASD hátterében, mind epilepszia patomechanizmusában kimutatták [52]. A GABA neurotranszmisszió a fő gátló mechanizmus posztnatálisan, viszont prenatalisan, a GABA<sub>A</sub> receptor funkciója következtében membrán depolarizáció észlelhető, tehát serkentő szinapszisként funkcionál. A glutamáterg rendszerrel szinergiában, trofikus hatást fejt ki az idegrendszer fejlődése során. Születés körül a GABA<sub>A</sub> receptorban megváltozik a klorid transzport iránya, ezáltal jön létre a serkentő-gátló szinapszis csere [286]. Ez a csere elengedhetetlen a KIR finomhangolásában nagy szerepet játszó gátló és serkentő egyensúly megteremtésében [284]. A csere, egy oxitocin receptor által, fokozott aktivitású, K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> kontranszporter miatt valósult meg a születést követő szűk időszámban [284][52]. A nem megfelelő időben lejátszódó csere megváltoztathatja a figyelem, összepontosítás és memória folyamataiban kulcsszerepet kapó  $\gamma$ -oszillációt. Az érett agyban a GABA<sub>A</sub> receptoron megvalósuló Cl<sup>-</sup> transzport stabilizálja a membrán potenciált, ezáltal kivédi a depolarizációt. A glutamáterg receptorokkal kapcsolatban is észlelhető pre- és posztnatális működésbeli különbség. A *GRIN2B* által kódolt glun2B prenatalisan jelentősen dominál a glun2A-val szemben, posztnatális expressziója viszont lecsökken [82]. Az upregulációja a szinaptikus metaplaszticitás létrejöttének egy fő mozgató rugója [47]. A metaplaszticitás a szinaptikus plaszticitás előszobája, mely képessé teszi a sejtet a plaszticitás folyamataira, mint az LTP, LTD. Mivel az ionotrop NMDA receptorok alegységösszetétel változásai jelentősen befolyásolják a csatorna elektrokémiai tulajdonságait, az alegységek időbeli expressziójának kontrollja pontosan szabályzott. A *MET* ASD gén jelátvitelében is ismert az időhatárolt expresszió, melynek csúszása az előagy szinapszisainak differenciálódási és huzalozási zavarához vezet [126]. Vizsgálatunk során egy súlyos-komplex ASD-vel rendelkező ikerpár esetében találtunk *MET* mutációt, akik esetében a kiterjedt genetikai vizsgálatok sem tudtak egyéb, tüneteikhez illeszthető variánst detektálni. Bár a detektált variánst mi sem tudjuk kórokinak mondani, feltételezhető, hogy valamilyen szignál változást előidézhetett embrionálisan, mely végül ASD fenotípusában nyilvánult meg.

Egy másik lehetséges patomechanizmust epilepszia háttérében szintén ASD gének vizsgálata során ismertek meg, mely szerint például *PCDH19*, illetve *ARX* homeobox gének mutációja esetén a nem egységes sejtpopuláció vezet epilepszia megjelenéséhez [287] [73].

Tehát az expressziós különbséget [73] és a fejlődés fázisainak csúszása [126], bizonyos kulcsingerek kimaradása egyaránt vezethet az ASD kialakulásához [177].

Összeggezve a KIR szerveződésében és működésében szerepet játszó gének eltérései egy neurokognitív spektrumot hoznak létre, melyen az ADHD, IKZ, ASD, szkizofrénia és bipoláris depresszió fő tünetei mellett, bármelyik más, a spektrumon elhelyezkedő, betegség tünete is megjelenhet. Bár vannak genetikai eltérések, melyek szorosabban korrelálnak valamelyik diagnózissal, a végső fenotípus mégis az egyénre jellemző genetikai háttér és környezet kölcsönhatásából eredeztethető [12] [46][34] [288].

## 7 Következtetések

Kutatásainkkal elsőként vizsgáltuk egy magyar ASD populációban az NGS panel vizsgálatok diagnosztikai hatékonyságát. Eredményeink a következőként foglalhatóak össze:

Az NGS panel vizsgálat költséghatékony és alkalmas módszernek bizonyultak az olyan komplex és heterogén genetikai hátterű betegségek vizsgálatára, mint az ASD.

A vizsgálat ASD kohorsz 10,34%-ban igazolódott monogénes, szindrómás forma, mely megfeleltethető a nemzetközi eredményeknek. A szindrómás ASD formák azonosítása fontos a beteg optimális menedzsmentje szempontjából, valamint a családon belüli ismétlődési rizikó meghatározása szempontjából is elengedhetetlen.

A vizsgált kohorsz 61,5%-ban legalább egy, de általában több ritka genetikai variáns jelenlétét igazoltuk. Ez alapján valószínűsítjük, hogy a végső fenotípus a gén-gén interakciók, a ritka és gyakori variánsok együttes hatásának köszönhetően alakul ki.

Eredményeink alapján ajánlást teszünk az ASD átvizsgálás során követendő genetikai vizsgálat menetére:

- Fragilis-X-szindróma szűrése minden ASD-vel élő gyermek esetében javasolt különösen, ha a speciális fenotípusjegyek is meg vannak.
- Az ASD-vel élő lányoknál mindenképpen vizsgálandó a *MECP2* gén, főleg amennyiben epilepszia is társul, mert felvetődhet atípusos Rett-szindróma lehetősége.
- Komplex ASD formák esetében nagyáteresztő képességű genetikai vizsgálat választása az indokolt. Sok minor rendellenesség jelenléte esetén aCGH-el javasolt a genetikai diagnosztikát kezdeni, ezek hiányában az FMR1 gén vizsgálatát követően NGS panel vizsgálat is szóba jön, amennyiben a vizsgálatból egészségnyereség adódik.

Szindrómás ASD formák elemzése során igazoltuk, hogy a tünetek megjelenését több diverz jelátviteli út károsodása eredményezheti, melyek nagyrésze a szinaptikus jelátvitel

diszfunkciójával asszociálható. A szindrómás eseteinkben a talált genetikai eltérés magyarázza ASD fenotípust, de patomechanizmusukat tekintve ezen formák sem egységesek. A kohorsz szintjén azonosított ritka variánsok szerepét a „ritka variáns-gyakori betegség” multifaktoriális keretrendszerében vizsgáltuk és meghatároztuk a kohorszunkat jellemző ritka variáns terheltséget, mely során *AUTS2*, *NHS*, *NSD1*, *SLC9A9* és *VPS13B* gének ritka variánsai esetében igazolódott szignifikáns asszociáció ASD-vel.

A variáns terheltséget összevetettük az ASD súlyossági mutatóival, és megállapítottuk, hogy ezen a kis esetszámon, nem találtunk pozitív korrelációt a nyers ADOS pontszám alapján mért súlyossági fok és ritka variáns terheltség között, sem a MPA terheltség és ritka variánsterheltség között.

Spektrális klaszterezési technikát alkalmazva négy fenotípus klasztert azonosítottunk, melyek tüneti szempontból nem teljesen különültek el egymástól, de trendek észlelhetőek voltak. Így a nemzetközi vizsgálatokhoz hasonlóan a mi kohorszunkban is elkülöníthető volt az adatok alapján a főleg nyelvi készségzavarokkal rendelkező alcsoport, illetve a hiperaktivitás-figyelemhiány-kényszercselekvés tengely mentén is körvonalazódó alcsoport.

A fenotípusklaszterekben belül vizsgáltuk a homogén genetikai háttér lehetőségét, azonban egyik klaszter esetében sem igazoltunk elkülönülő genetikai háttérrel, ritka variáns dúsulást. Emiatt megállapítottuk, hogy az általunk vizsgálat csoport túl kicsinek bizonyul ahhoz, hogy endofenotípus meghatározásra alkalmas legyen.

Az mtDNS deléció gyakoriságát kohorszunkban az egyik leggyakoribb komorbiditásnak találtuk. Az mtDNS deléciót hordozó ASD esetek fenotípusosan jól elkülönültek a fejlődésbeli regresszió és a társuló multiszisztémás érintettség tekintetében az mtDNS deléciót nem hordozó ASD csoporttól.

Megállapítottuk, hogy mitochondriális diszfunkció mind szindrómás és nem-szindrómás ASD forma részjelenségeként előfordul. A mitochondriális deléció az ASD-vel diagnosztizált betegek esetén nem primer intergenomiális kommunikációzavar következménye, háttérben indirekt, szekunder okok feltételezhetőek.

## 8 Összefoglalás

Az ASD mind klinikailag, mind genetikailag rendkívül heterogén betegpopulációnak tekinthető. Genetikai hátterét tekintve a gyakori és ritka genetikai eltérések szerepe egyaránt felvethető. Klinikai és genetikai alapon történő alcsoportra bontásának fontos szerepe van a patomechanizmus és a személyreszabott kezelési lehetőségek megismerésében. Kutatásunk során átfogó genetikai vizsgálatot végeztünk 174 magyar ASD beteg esetében, a genetikai háttéren alapuló stratifikáció érdekében. Vizsgálatunk során 13 monogénes ASD formát igazoltunk, melyek legerősebb indikátorai az ASD mellé társuló komorbiditások (IKZ, epilepszia), illetve a MPA-k specifikus konstellációi voltak. A kohorsz szintjén azonosított ritka variánsok szerepét a „ritka variáns-gyakori betegség” multifaktoriális keretrendszerében vizsgáltuk, meghatároztuk a kohorszunkat jellemző ritka variáns terheltséget és ezt összevetettük az ASD súlyossági mutatóival, névszerint az ADOS és MPA terheltség eredményeivel. Különböző gépi tanulási technikák alkalmazásával (spektrális klaszterezés, PCA) fenotípusos klasztereket azonosítottunk és vizsgáltuk a homogén genetikai háttér lehetőségét a fenotípus klasztereken belül. Mivel a mitochondriális diszfunkció gyakran asszociál ASD-vel, megvizsgáltuk az mtDNS deléció gyakoriságát és azon nukleáris genetikai eltéréseket melyek ezzel asszociálhatóak. Kohorsz szintjén az *AUTS2*, *NHS*, *NSD1*, *SLC9A9* és *VPSI3B* ritka variánsai esetében igazolódott szignifikáns asszociáció ASD-vel. Ritka variáns terheltség tekintetében nem találtunk pozitív összefüggést sem az ADOS pontszám, sem az MPA terheltség között. Négy fenotípus klasztert azonosítottunk, melyek nem különültek el tökéletesen egymástól és nem azonosítottunk egyik esetében sem olyan genetikai tényezőt, mely jellemezné genetikailag a klasztert. Mitochondriális deléció szignifikánsan gyakoribb eltérés volt az ASD populációban, mint a kontrollokban, melynek hátterében szekunder okokat feltételeztünk. A mitochondriális deléció mint szindrómás, mind nem szindrómás ASD esetekben előfordult.



## 9 Summary

Autism spectrum disorder (ASD) is genetically and phenotypically heterogeneous. Former genetic studies suggested that both common and rare genetic variants play a role in the etiology. To detect homogenous subgroups based on clinical or genetic findings is important, because the results can contribute to the precise understanding of pathogenesis and leads to personalized therapeutic approaches. Comprehensive genetic analysis was performed to investigate the yield of NGS panel sequencing of an unselected ASD cohort (n = 174) for the detection of ASD associated syndromes and to analyze rare variants in a common disease-rare variant framework. We performed phenotypic cluster analysis with kernel PCA and spectral clustering approaches, and gene enrichment analysis in phenotype based clusters. We performed rare variant burden based on RVIS score. Using SORVA software we confirmed the association of five genes with ASD: *AUTS2*, *NHS*, *NSD1*, *SLC9A9*, and *VPS13* respectively. We have diagnosed 13 molecularly proven syndromic autism cases. Strongest indicators of syndromic autism were intellectual disability, epilepsy or certain pattern of somatic malformation. We found no correlation between rare variant burden and number of minor malformation or autism severity (calculated from ADOS scores). We identified four phenotypic clusters, but no specific gene was enriched in a given cluster, however the clusters showed some overlap regarding common features.

Despite evidence of altered mitochondrial function in some individuals with ASD, it is not known whether mitochondrial dysfunction is a cause or an effect of ASD. In a subset of our cohort mtDNA deletions were confirmed in 16.6% (10/60). To rule out the primary MD we tested the presence of mutations in nuclear mitochondrial genes, no cause for primary MD was detected. In 80% of our mtdel-ASD children rare SNVs in ASD-associated genes were found. Mitochondrial dysfunction co-occurred in both syndromic and non-syndromic ASD cases, it was considered mostly secondary due to mutations in non-OXPHOS genes or due to some environmental factors, such as CMV infection. Regarding clinical features some differences were observed between mtdel-ASD patients and non-mtdel-ASD patients.

## 10 Irodalomjegyzék

- [1] Lai M-C, Lombardo M V, Baron-Cohen S. (2014) Autism. *Lancet*, 383: 896–910.
- [2] Matson JL, Kozlowski AM. (2011) The increasing prevalence of autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord*, 5: 418–425.
- [3] Leo Kanner’s 1943 paper on autism | Spectrum | Autism Research News. Available from: <https://www.spectrumnews.org/opinion/viewpoint/leo-kanners-1943-paper-on-autism/> [accessed: December 4, 2019].
- [4] Folstein SE, Rosen-Sheidley B. (2001) Genetics of autism: Complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics* 2: 943–955.
- [5] Americal Psychiatric Association. (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders.
- [6] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. (2018) Autism spectrum disorder. *The Lancet* 392: 508–520.
- [7] Böhm D. (2018) Autizmus spektrum zavar diagnosztika differenciál diagnosztika Autizmus kurzus. [[https://semmelweis.hu/anatomia/files/2018/09/ASD-diff-dg\\_B%C3%B6hm-M%C3%B3nika.pdf](https://semmelweis.hu/anatomia/files/2018/09/ASD-diff-dg_B%C3%B6hm-M%C3%B3nika.pdf)]
- [8] Moreno-De-Luca A, Myers SM, Challman TD, Moreno-De-Luca D, Evans DW, Ledbetter DH. (2013) Developmental brain dysfunction: Revival and expansion of old concepts based on new genetic evidence. *The Lancet Neurology* 12: 406–414.
- [9] Falkmer T, Anderson K, Falkmer M, Horlin C. (2013) Diagnostic procedures in autism spectrum disorders: a systematic literature review. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 22: 329–340.
- [10] Bieleninik Ł, Posserud MB, Geretsegger M, Thompson G, Elefant C, Gold C. (2017) Tracing the temporal stability of autism spectrum diagnosis and severity as measured by the Autism Diagnostic Observation Schedule: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12:.
- [11] Mody M, Belliveau JW. (2012) Speech and Language Impairments in Autism: Insights from Behavior and Neuroimaging. *Am Chinese J Med Sci*, 5: 157.
- [12] Miles JH. (2011) Autism spectrum disorders-A genetics review. *Genetics in Medicine* 13: 278–294.

- [13] Gotham K, Pickles A, Lord C. (2009) Standardizing ADOS scores for a measure of severity in autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 39: 693–705.
- [14] Baio J. (2012) Prevalence of autism spectrum disorders: Autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. In: *Autism Spectrum Disorders: Guidance, Research and Federal Activity*. Nova Science Publishers, Inc., 2012.; pp. 27–60.
- [15] Avni E, Ben-Itzhak E, Zachor DA. (2018) The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors. *Front Psychiatry*, 9:.
- [16] Mohapatra S, Sahoo AJ. (2016) Self-injurious behavior in a young child with lesch-nyhan syndrome. *Indian J Psychol Med*, 38: 477–479.
- [17] Tényi T, Jeges S, Halmai T, Csábi G. (2013) Minor Fizikális anomáliák autizmusban *Ideggy Szeml*, 66:07-08.
- [18] Ozgen H, Hop JW, Hox JJ, Beemer FA, Van Engeland H. (2010) Minor physical anomalies in autism: A meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 15: 300–307.
- [19] Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE. (2005) Essential versus complex autism: Definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet*, 135 A: 171–180.
- [20] Werling DM, Geschwind DH. (2013) Sex differences in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurology* 26: 146–153.
- [21] Ruparelia K, Manji K, Abubakar A, Newton CR. (2017) Investigating the Evidence of Behavioral, Cognitive, and Psychiatric Endophenotypes in Autism: Review.
- [22] Piven J, Palmer P. (1999) Psychiatric disorder and the broad autism phenotype: Evidence from a family study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry*, 156: 557–563.
- [23] Miles JH, Takahashi TN, Haber A, Hadden L. (2003) Autism families with a high incidence of alcoholism. *J Autism Dev Disord*, 33: 403–415.
- [24] Sucksmith E, Roth I, Hoekstra RA. (2011) Autistic traits below the clinical threshold: Re-examining the broader autism phenotype in the 21st century. *Neuropsychology Review* 21: 360–389.

- [25] Gerds J, Bernier R.(2011) The Broader Autism Phenotype and Its Implications on the Etiology and Treatment of Autism Spectrum Disorders. *Aut Res Treat*, 2011:1–19.
- [26] Folstein S, Rutter M. (1977) INFANTILE AUTISM: A GENETIC STUDY OF 21 TWIN PAIRS. *J Child Psychol Psychiatry*, 18: 297–321.
- [27] Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijdsdijk F. (2016) Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*, 57: 585–595.
- [28] Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. (2014) The familial risk of autism. *JAMA - J Am Med Assoc*, 311: 1770–1777.
- [29] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. (2010) Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*, 86: 749–764.
- [30] Woodbury-Smith M, Scherer SW. (2018) Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Dev Med Child Neurol*,
- [31] Schaefer GB, Mendelsohn NJ. (2008) Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genetics in Medicine* 10: 4–12.
- [32] Huguet G, Ey E, Bourgeron T. (2013) The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14: 191–213.
- [33] Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B, Roeder K, Buxbaum JD. (2014) Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*, 46: 881–885.
- [34] Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2013) Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs.

Nat Genet, 45: 984–994.

- [35] Fernandez BA, Scherer SW. (2017) Syndromic autism spectrum disorders: Moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues Clin Neurosci*, 19: 353–371.
- [36] Schaefer GB, Mendelsohn NJ, Professional Practice and Guidelines Committee. (2013) Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med*, 15: 399–407.
- [37] Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L.(2018) Fragile X syndrome:An overview and update of the FMR1 gene.*Clinical Genetics* 93: 197–205.
- [38] Barnes SA, Thomson SR, Kind PC, Osterweil EK. (2016) FMRP and the Pathophysiology of Fragile X Syndrome. In: *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability*. Elsev Inc.,2016.; pp. 113–128.
- [39] Neul JL. (2012) The relationship of Rett syndrome and MECP2 disorders to autism. *Dialogues Clin Neurosci*, 14: 253–262.
- [40] Percy KA, Lane BJ, Childers J, Skinner S, Annese F, Barrish J, Caeg E, Glaze DG, MacLeod P. (2007) Rett syndrome: North American database. *J Child Neurol*, 22: 1338–1341.
- [41] Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey MES, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK. (2010) Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol*, 68: 944–950.
- [42] Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A. (2011) The Role of MeCP2 in the Brain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27: 631–652.
- [43] Gabel HW, Kinde B, Stroud H, Gilbert CS, Harmin DA, Kastan NR, Hemberg M, Ebert DH, Greenberg ME. (2015) Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature*, 522: 89–93.
- [44] Wallace DC, Fan W. (2010) Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* 10: 12–31.
- [45] Urdinguio RG, Fernandez AF, Lopez-Nieva P, Rossi S, Huertas D, Kulis M, Liu CG, Croce C, Calin GA, Esteller M. (2010) Disrupted microRNA expression caused by

- Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics*, 5: 656–663.
- [46] DiLalla LF, McCrary , Diaz E. (2017) A review of endophenotypes in schizophrenia and autism: The next phase for understanding genetic etiologies. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics* 175:354–361.
- [47] Bourgeron T. (2015) From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience* 16: 551–563.
- [48] Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z, Vorstman JAS, Thompson A, Regan R, Pilorge M, Pellecchia G, Pagnamenta AT, Oliveira B, Marshall CR, Magalhaes TR, Lowe JK, Howe JL, Griswold AJ, Gilbert J, Duketis E, Dombroski BA, De Jonge MV, Cuccaro M, Crawford EL, Correia CT, Conroy J, Conceição IC, Chiocchetti AG, Casey JP, Cai G, Cabrol C, Bolshakova N, Bacchelli E, Anney R, Gallinger S, Cotterchio M, Casey G, Zwaigenbaum L, Wittemeyer K, Wing K, Wallace S, van Engeland H, Tryfon A, Thomson S, Soorya L, Rogé B, Roberts W, Poustka F, Mouga S, Minshew N, McInnes LA, McGrew SG, Lord C, Leboyer M, Le Couteur AS, Kolevzon A, González PJ, Jacob S, Holt R, Guter S, Green J, Green A, Gillberg C, Fernandez BA, Duque F, Delorme R, Dawson G, Chaste P, Café C, Brennan S, Bourgeron T, Bolton PF, Bölte S, Bernier R, Baird G, Bailey AJ, Anagnostou E, Almeida J, Wijsman EM, Vieland VJ, Vicente AM, Schellenberg GD, Pericak-Vance M, Paterson AD, Parr JR, Oliveira G, Nurnberger JI, Monaco AP, Maestrini E, Klauck SM, Hakonarson H, Haines JL, Geschwind DH, Freitag CM, Folstein SM, Ennis S, Coon H, Battaglia A, Szatmari P, Sutcliffe JS, Hallmayer J, Gill M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Gallagher L, Betancur C, Scherer SW. (2014) Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *Am J Hum Genet*, 94: 677–694.
- [49] Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE, Smith JD, Paeper B, Nickerson DA, Dea J, Dong S, Gonzalez LE, Mandell JD, Mane SM, Murtha MT, Sullivan CA, Walker MF, Waqar Z, Wei L, Willsey AJ, Yamrom B, Lee Y, Grabowska E, Dalkic E, Wang Z, Marks S, Andrews P, Leotta A, Kendall J, Hakker I, Rosenbaum J, Ma B, Rodgers

- R, Troge J, Narzisi G, Yoon S, Schatz MC, Ye K, McCombie WR, Shendure J, Eichler EE, State MW, Wigler M. (2014) The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515: 216–221.
- [50] Persico AM, Napolioni V. (2013) Autism genetics. *Behav Brain Res* 251: 95–112.
- [51] Grant SGN. (2012) Synaptopathies: Diseases of the synaptome. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 522–529.
- [52] Giovedì S, Corradi A, Fassio A, Benfenati F. (2014) Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: The case of synapsins. *Frontiers in Pediatrics* 2:.
- [53] Casanova EL, Casanova MF. (2014) Genetics studies indicate that neural induction and early neuronal maturation are disturbed in autism. *Front Cell Neurosci*, 8:.
- [54] Gilbert J, Man HY. (2017) Fundamental elements in autism: From neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:.
- [55] Iijima T, Wu K, Witte H, Hanno-Iijima Y, Glatter T, Richard S, Scheiffele P. (2011) SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell*, 147: 1601–1614.
- [56] Singh SK, Eroglu C. (2013) Neuroligins provide molecular links between syndromic and nonsyndromic autism. *Science Signaling* 6:.
- [57] Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC. (2007) Activity-Dependent Validation of Excitatory versus Inhibitory Synapses by Neuroligin-1 versus Neuroligin-2. *Neuron*, 54: 919–931.
- [58] Chen X, Liu H, Shim AHR, Focia PJ, He X. (2008) Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nat Struct Mol Biol*, 15:50–56
- [59] Peñagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, Sonnenblick LI, Gruver R, Almajano J, Bragin A, Golshani P, Trachtenberg JT, Peles E, Geschwind DH. (2011) Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, 147: 235–246.
- [60] Traut W, Weichenhan D, Himmelbauer H, Winking H. (2006) New members of the neurexin superfamily: Multiple rodent homologues of the human CASPR5 gene. *Mamm Genome*, 17: 723–731.

- [61] Martin EA, Muralidhar S, Wang Z, Cervantes DC, Basu R, Taylor MR, Hunter J, Cutforth T, Wilke SA, Ghosh A, Williams ME. (2015) The intellectual disability gene *Kirrel3* regulates target-specific mossy fiber synapse development in the hippocampus. *Elife*, 4:.
- [62] Bhalla K, Luo Y, Buchan T, Beachem MA, Guzauskas GF, Ladd S, Bratcher SJ, Schroer RJ, Balsamo J, DuPont BR, Lilien J, Srivastava AK. (2008) Alterations in *CDH15* and *KIRREL3* in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability. *Am J Hum Genet*, 83: 703–713.
- [63] Kenwrick S. (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet*, 9: 879–886.
- [64] Vos YJ, De Walle HEK, Bos KK, Stegeman JA, Ten Berge AM, Bruining M, Van Maarle MC, Elting MW, Den Hollander NS, Hamel B, Fortuna AM, Sunde LEM, Stolte-Dijkstra I, Schrandt-Stumpel CTRM, Hofstra RMW. (2010) Genotype - phenotype correlations in L1 syndrome: A guide for genetic counselling and mutation analysis. *J Med Genet*, 47: 169–175.
- [65] Tan RPA, Leshchyns'Ka I, Sytnyk V. (2017) Glycosylphosphatidylinositol-anchored immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules and their role in neuronal development and synapse regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:.
- [66] Noh K, Lee H, Choi TY, Joo Y, Kim SJ, Kim H, Kim JY, Jahng JW, Lee S, Choi SY, Lee SJ. (2019) *Negr1* controls adult hippocampal neurogenesis and affective behaviors. *Mol Psychiatry*, 24: 1189–1205.
- [67] Tamási V, Petschner P, Adori C, Kirilly E, Ando RD, Tothfalusi L, Juhasz G, Bagdy G. (2014) Transcriptional evidence for the role of chronic venlafaxine treatment in neurotrophic signaling and neuroplasticity including also glutamatergic- and insulin-mediated neuronal processes. *PLoS One*, 9: e113662.
- [68] Halbleib JM, Nelson WJ. (2006) Cadherins in development: Cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development* 20: 3199–3214.
- [69] Drees F, Nelson WJ. (2004) Cadherin mediated cell-cell adhesion. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/protocadherin>
- [70] Bruining H, Matsui A, Oguro-Ando A, Kahn RS, Van't Spijker HM, Akkermans



- G, Stiedl O, Van Engeland H, Koopmans B, Van Lith HA, Oppelaar H, Tieland L, Nonkes LJ, Yagi T, Kaneko R, Burbach JPH, Yamamoto N, Kas MJ. (2015) Genetic mapping in mice reveals the involvement of Pcdh9 in long-term social and object recognition and sensorimotor development. *Biol Psychiatry*, 78: 485–495.
- [71] Tsang KM, Croen LA, Torres AR, Kharrazi M, Delorenze GN, Windham GC, Yoshida CK, Zerbo O, Weiss LA. (2013) A Genome-Wide Survey of Transgenerational Genetic Effects in Autism. *PLoS One*, 8:.
- [72] Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubbridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O’Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib S, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim HG, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC Gécz J. (2008) X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet*, 40: 776–781.
- [73] Gerosa L, Francolini M, Bassani S, Passafaro M. (2019) The Role of Protocadherin 19 (PCDH19) in Neurodevelopment and in the Pathophysiology of Early Infantile Epileptic Encephalopathy-9 (EIEE9). *Developmental Neurobiology* 79: 75–84.
- [74] Schmunk G, Gargus JJ. (2013) Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Frontiers in Genetics* 4: 222.
- [75] Parihar R, Ganesh S. (2013) The SCN1A gene variants and epileptic encephalopathies. *Journal of Human Genetics* 58: 573–580.
- [76] Mason ER, Wu F, Patel RR, Xiao Y, Cannon SC, Cummins TR. (2019) Resurgent and gating pore currents induced by De Novo SCN2A epilepsy mutations. *eNeuro*, 6:.
- [77] Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. (2004) CaV1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119: 19–31.

- [78] Bezerra GA, Dobrovetsky E, Seitova A, Fedosyuk S, Dhe-Paganon S, Gruber K. (2015) Structure of human dipeptidyl peptidase 10 (DPPY): A modulator of neuronal Kv4 channels. *Sci Rep*, 5: 1–9.
- [79] Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO. (2003) Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J*, 373: 179–189.
- [80] Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA, Yasui DH, LaSalle JM. (2007) 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet*, 16: 691–703.
- [81] Vincent JB, Horike SI, Choufani S, Paterson AD, Roberts W, Szatmari P, Weksberg R, Fernandez B, Scherer SW. (2006) An inversion inv(4)(p12-p15.3) in autistic siblings implicates the 4p GABA receptor gene cluster. *J Med Genet*, 43: 429–434.
- [82] Myers SJ, Yuan H, Kang JQ, Tan FCK, Traynelis SF, Low CM. (2019) Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 8:.
- [83] Krey JF, Dolmetsch RE. (2007) Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca<sup>2+</sup> signaling. *Current Opinion in Neurobiology* 17: 112–119.
- [84] Huang CH, Santangelo SL. (2008) Autism and serotonin transporter gene polymorphisms: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147: 903–913.
- [85] Roxrud I, Raiborg C, Gilfillan GD, Strømme P, Stenmark H. (2009) Dual degradation mechanisms ensure disposal of NHE6 mutant protein associated with neurological disease. *Exp Cell Res*, 315: 3014–3027.
- [86] Seidita G, Mirisola M, D’Anna RP, Gallo A, Jensen RT, Mantey SA, Gonzalez N, Falco M, Zingale M, Elia M, Cucina L, Chiavetta V, Romano V, Cali F. (2008) Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*, 147B: 807–813.
- [87] Becker MM, Bosa C, Oliveira-Freitas VL, Goldim JR, Ohlweiler L, Roesler R, Schwartzmann G, Dos Santos Riesgo R. (2016) Improvement of autism spectrum

- disorder symptoms in three children by using gastrin-releasing peptide. *J Pediatr (Rio J)*, 92: 302–306.
- [88] Freitag FB, Ahemaiti A, Jakobsson JET, Weman HM, Lagerström MC. (2019) Spinal gastrin releasing peptide receptor expressing interneurons are controlled by local phasic and tonic inhibition. *Sci Rep*, 9: 1–14.
- [89] Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M, Itoh S. (2014) C18 orf1, a novel negative regulator of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J Biol Chem*, 289: 12680–12692.
- [90] Torres RJ, Prior C, Puig JG. (2006) Efficacy and safety of allopurinol in patients with the Lesch-Nyhan syndrome and partial hypoxanthine-phosphoribosyltransferase deficiency: A follow-up study of 18 Spanish patients. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 25: 1077–1082.
- [91] Bollu LR, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH. (2017) Molecular pathways: Targeting protein tyrosine phosphatases in cancer. *Clin Cancer Res*, 23: 2136–2142.
- [92] Kratz CP, Franke L, Peters H, Kohlschmidt N, Kazmierczak B, Finckh U, Bier A, Eichhorn B, Blank C, Kraus C, Kohlhase J, Pauli S, Wildhardt G, Kutsche K, Auber B, Christmann A, Bachmann N, Mitter D, Cremer FW, Mayer K, Daumer-Haas C, Nevinny-Stickel-Hinzpeter C, Oeffner F, Schlüter G, Gencik M, Überlacker B, Lissewski C, Schanze I, Greene MH, Spix C, Zenker M. (2015) Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. *Br J Cancer*, 112: 1392–1397.
- [93] Ung DC, Iacono G, Méziane H, Blanchard E, Papon MA, Selten M, van Rhijn JR, Montjean R, Rucci J, Martin S, Fleet A, Birling MC, Marouillat S, Roepman R, Selloum M, Lux A, Thépault RA, Hamel P, Mittal K, Vincent JB, Dorseuil O, H G Stunnenberg HG, Billuart P, Nadif Kasri N, Héroult Y, Laumonnier F. (2017) Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. *Mol Psychiatry*, 23: 1356–1367.
- [94] Soler J, Fañanás L, Parellada M, Krebs MO, Rouleau GA, Fatjó-Vilas M. (2018) Genetic variability in scaffolding proteins and risk for schizophrenia and autism-

- spectrum disorders: A systematic review. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 43: 223–244.
- [95] Betancur C.(2011) Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders:More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 1380: 42–77.
- [96] Duffney LJ, Wei J, Cheng J, Liu W, Smith KR, Kittler JT, Yan Z. (2013) Shank3 deficiency induces NMDA receptor hypofunction via an actin-dependent mechanism. *J Neurosci*, 33: 15767–15778.
- [97] Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, De Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M Bourgeron T. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*, 39: 25–27.
- [98] Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard JM, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. (2009) Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS One*, 4:.
- [99] Parisi L, Di Filippo T, Glorioso P, La Grutta S, Epifanio MS, Roccella M. (2018) Autism spectrum disorders in children affected by Duchenne muscular dystrophy. *Minerva Pediatr*, 70: 233–239.
- [100] Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL. (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci*, 8: 1727–1734.
- [101] Kingswood JC, d’Augères GB, Belousova E, Ferreira JC, Carter T, Castellana R, Cottin V, Curatolo P, Dahlin M, de Vries PJ, Feucht M, Fladrowski C, Gislimberti G, Hertzberg C, Jozwiak S, Lawson JA, Macaya A, Nabbout R, O’Callaghan F, Benedik MP, Qin J, Marques R, Sander V, Sauter M, Takahashi Y, Touraine R, Youroukos S, Zonnenberg B, Jansen AC, TOSCA consortium and TOSCA investigators. (2017) Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) – baseline data

- on 2093 patients. *Orphanet J Rare Dis*, 12: 2.
- [102] Ma XM, Blenis J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 307–318.
- [103] Tilot AK, Bebek G, Niazi F, Altemus JB, Romigh T, Frazier TW, Eng C. (2016) Neural transcriptome of constitutional Pten dysfunction in mice and its relevance to human idiopathic autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 21: 118–125.
- [104] Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, Morgan J. (2007) Mapping early brain development in autism. *Neuron* 56: 399–413.
- [105] Gao J, Xiong B, Zhang B, Li S, Huang N, Zhan G, Jiang R, Yang L, Wu Y, Miao L, Zhu B, Yang C, Luo A. (2018) Sulforaphane Alleviates Lipopolysaccharide-induced Spatial Learning and Memory Dysfunction in Mice: The Role of BDNF-mTOR Signaling Pathway. *Neuroscience*, 388: 357–366.
- [106] Dindot SV, Antalfy BA, Bhattacharjee MB, Beaudet AL. (2008) The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum Mol Genet*, 17: 111–118
- [107] Holopainen IE, Metsähonkala EL, Kokkonen H, Parkkola RK, Manner TE, Nägren K, Korpi ER. (2001) Decreased binding of [<sup>11</sup>C]flumazenil in Angelman syndrome patients with GABA(A) receptor beta3 subunit deletions. *Ann Neurol*, 49: 110–113.
- [108] Susa K, Sohara E, Takahashi D, Okado T, Rai T, Uchida S. (2017) WNK4 is indispensable for the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by mutant KLHL3. *Biochem Biophys Res Commun*, 491: 727–732.
- [109] Escamilla CO, Filonova I, Walker AK, Xuan ZX, Holehonnur R, Espinosa F, Liu S, Thyme SB, López-García IA, Mendoza DB, Usui N, Ellegood J, Eisch AJ, Konopka G, Lerch JP, Schier AF, Speed HE, Powell CM. (2017) Kctd13 deletion reduces synaptic transmission via increased RhoA. *Nature*, 551: 227–231.
- [110] Golzio C, Willer J, Talkowski ME, Oh EC, Taniguchi Y, Jacquemont S, Reymond A, Sun M, Sawa A, Gusella JF, Kamiya A, Beckmann JS, Katsanis N. (2012) KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature*, 485: 363–367.

- [111] Guo D, Yang X, Shi L. (2020) Rho GTPase Regulators and Effectors in Autism Spectrum Disorders: Animal Models and Insights for Therapeutics. *Cells*, 9: 835.
- [112] Kasri NN, Nakano-Kobayashi A, Malinow R, Li B, Van Aelst L. (2009) The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev*, 23: 1289–1302.
- [113] Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Der Veken L Van, Van Aelst L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*, 7: 364–372.
- [114] Estrada L. (2001) Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane. *Hum Mol Genet*, 10: 485–495.
- [115] Pasteris NG, Nagata K, Hall A, Gorski JL. (2000) Isolation, characterization, and mapping of the mouse Fgd3 gene, a new Faciogenital Dysplasia (FGD1; Aarskog Syndrome) gene homologue. *Gene*, 242: 237–247.
- [116] Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller EC, Otto A, Wanker EE, Schneider R, Schweiger S. (2008) The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet*, 123: 163–176.
- [117] Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauß S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S. (2001) MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet*, 29: 287–294.
- [118] Lasser M, Tiber J, Lowery LA. (2018) The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12:.
- [119] Tarricone C, Perrina F, Monzani S, Massimiliano L, Kim MH, Derewenda ZS, Knapp S, Tsai LH, Musacchio A. (2004) Coupling PAF signaling to dynein regulation: Structure of LIS1 in complex with PAF-acetylhydrolase. *Neuron*, 44: 809–821.
- [120] Kato M. (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet*, 12: 89R – 96.
- [121] Roll-Mecak A, Vale RD. (2008) Structural basis of microtubule severing by the

- hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*, 451: 363–367.
- [122] Jeong B, Kim TH, Kim DS, Shin WH, Lee JR, Kim NS, Lee DY. (2019) Spastin Contributes to Neural Development through the Regulation of Microtubule Dynamics in the Primary Cilia of Neural Stem Cells. *Neuroscience*, 411: 76–85.
- [123] Dunleavy JEM, Okuda H, O'Connor AE, Merriner DJ, O'Donnell L, Jamsai D, Bergmann M, O'Bryan MK. (2017) Katanin-like 2 (KATNAL2) functions in multiple aspects of haploid male germ cell development in the mouse. *PLoS Genet*, 13:.
- [124] Brooks SP, Ebenezer ND, Poopalasundaram S, Maher ER, Francis PJ, Moore AT, Hardcastle AJ. (2004) Refinement of the X-linked cataract locus (CXN) and gene analysis for CXN and Nance-Horan syndrome (NHS). *Ophthalmol. Genet*, 25: 121–131.
- [125] Sharma S, Datta P, Sabharwal JR, Datta S. (2017) Nance-Horan syndrome: A rare case report. *Contemp Clin Dent*, 8: 469–472.
- [126] Peng Y, Lu Z, Li G, Piechowicz M, Anderson M, Uddin Y, Wu J, Qiu S. (2016) The autism-associated MET receptor tyrosine kinase engages early neuronal growth mechanism and controls glutamatergic circuits development in the forebrain. *Mol Psychiatry*, 21: 925–935.
- [127] Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, Di Bonaventura C, Luisi C, Pasini E, Striano S, Striano P, Coppola G, Chiavegato A, Radovic S, Spadotto A, Uzzau S, La Neve A, Giallonardo AT, Mecarelli O, Tosatto SCE, Ottman R, Michelucci R, Nobile C. (2015) Heterozygous Reelin Mutations Cause Autosomal-Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *Am J Hum Genet*, 96: 992–1000.
- [128] Barak T, Kwan KY, Louvi A, Demirbilek V, Saygi S, Tüysüz B, Choi M, Boyaci H, Doerschner K, Zhu Y, Kaymakçalan H, Yilmaz S, Bakircğlu M, Çağlayan AO, Öztürk AK, Yasuno K, Brunken WJ, Atalar E, Yalçınkaya C, Dinçer A, Bronen RA, Mane S, Ozçelik T, Lifton RP, Sestan N, Bilgüvar K, Günel M. (2011) Recessive LAMC3 mutations cause malformations of occipital cortical development. *Nat Genet*, 43: 590–594.
- [129] Tarpey PS, Stevens C, Teague J, Edkins S, O'Meara S, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Butler A, Cole J, Dicks E, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd S,

- Small A, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Catford R, Butler J, Mallya U, Moon J, Luo Y, Dorkins H, Thompson D, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Carpenter N, Simensen RJ, Schwartz CE, Stevenson RE, Turner G, Partington M, Gecz J, Stratton MR, Futreal PA, Raymond FL. (2006) Mutations in the gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 79: 1119–1124.
- [130] Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Lommatzsch S, Hennies HC, Bachmann S, Horn D, Haucke V. (2015) Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 290: 3349–3358.
- [131] El Chehadeh-Djebbar S, Blair E, Holder-Espinasse M, Moncla A, Frances AM, Rio M, Debray FG, Rump P, Masurel-Paulet A, Gigot N, Callier P, Duplomb L, Aral B, Huet F, Thauvin-Robinet C, Faivre L. (2013) Changing facial phenotype in Cohen syndrome: Towards clues for an earlier diagnosis. *Eur J Hum Genet*, 21: 736–742.
- [132] Zhang J, Liu Q. (2015) Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*, 6: 254–264.
- [133] Bianconi SE, Cross JL, Wassif CA, Porter FD. (2015) Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and clinical aspects of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*, 3: 267–280.
- [134] Waterham HR, Hennekam RCM. (2012) Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 160C: 263–284.
- [135] Ramaekers VT, Sequeira JM, Diduca M, Vrancken G, Thomas A, Philippe C, Peters M, Jadot A, Quadros E V. (2019) Improving Outcome in Infantile Autism with Folate Receptor Autoimmunity and Nutritional Derangements: A Self-Controlled Trial.
- [136] Al-Baradie RS, Chaudhary MW. (2014) Diagnosis and management of cerebral folate deficiency A form of folinic Acid-Responsive seizures. *Neurosciences*, 19: 312–316.
- [137] Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC,



- Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* (80- ), 341:.
- [138] Kleefstra T, Schenck A, Kramer JM, Van Bokhoven H. (2014) The genetics of cognitive epigenetics. *Neuropharmacology* 80: 83–94.
- [139] Ryu H, Park E, Kim Y, Ryu H, Kowall NW, Lee J. (2014) Epigenetic mechanisms of Rubinstein-Taybi syndrome. *NeuroMolecular Medicine* 16: 16–24.
- [140] Waite J, Moss J, Beck SR, Richards C, Nelson L, Arron K, Burbidge C, Berg K, Oliver C. (2015) Repetitive Behavior in Rubinstein–Taybi Syndrome: Parallels with Autism Spectrum Phenomenology. *J Autism Dev Disord*, 45: 1238–1253.
- [141] Weinberg DN, Papillon-Cavanagh S, Chen H, Yue Y, Chen X, Rajagopalan KN, Horth C, McGuire JT, Xu X, Nikbakht H, Lemiesz AE, Marchione DM, Marunde MR, Meiners MJ, Cheek MA, Keogh MC, Bareke E, Djedid A, Harutyunyan AS, Jabado N, Garcia BA, Li H, Allis CD, Majewski J, Lu C. (2019) The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature* 573: 281–286.
- [142] Martin C, Zhang Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 838–849.
- [143] Bock I, Németh K, Pentelényi K, Balicza P, Balázs A, Molnár MJ, Román V, Nagy J, Lévy G, Kobolák J, Dinnyés A. (2016) Targeted next generation sequencing of a panel of autism-related genes identifies an EHMT1 mutation in a Kleefstra syndrome patient with autism and normal intellectual performance. *Gene*, 595: 131–141.
- [144] Gao Z, Lee P, Stafford JM, Schimmelfmann M Von, Schaefer A, Reinberg D. (2014) An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature*, 516: 349–354.
- [145] Hori K, Hoshino M. (2017) Neuronal migration and AUTS2 syndrome. *Brain Sciences* 7:.
- [146] Beunders G, van de Kamp J, Vasudevan P, Morton J, Smets K, Kleefstra T, de Munnik SA, Schuurs-Hoeijmakers J, Ceulemans B, Zollino M, Hoffjan S, Wiczorek S, So J, Mercer L, Walker T, Velsher L, Parker MJ, Magee AC, Elffers B, Kooy RF,

- Yntema HG, Meijers-Heijboer EJ, Sistermans EA. (2016) A detailed clinical analysis of 13 patients with AUTS2 syndrome further delineates the phenotypic spectrum and underscores the behavioural phenotype. *J Med Genet*, 53: 523–532.
- [147] Todd MAM, Picketts DJ. (2012) PHF6 interacts with the nucleosome remodeling and deacetylation (NuRD) complex. *J Proteome Res*, 11: 4326–4337.
- [148] Crawford J, Lower KM, Hennekam RCM, Van Esch H, Mégarbané A, Lynch SA, Turner G, Gécz J. (2006) Mutation screening in Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome: Identification of a novel de novo PHF6 mutation in a female patient. *J Med Genet*, 43: 238–243.
- [149] Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, Cole KE, De Baere E, Decroos C, Di Donato N, Ernst S, Francey LJ, Gyftodimou Y, Hirashima K, Hullings M, Ishikawa Y, Jaulin C, Kaur M, Kiyono T, Lombardi PM, Magnaghi-Jaulin L, Mortier GR, Nozaki N, Petersen MB, Seimiya H, Siu VM, Suzuki Y, Takagaki K, Wilde JJ, Willems PJ, Prigent C, Gillissen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K. (2012) HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*, 489: 313–317.
- [150] Boudaoud I, Fournier É, Baguette A, Vallée M, Lamaze FC, Droit A, Bilodeau S. (2017) Connected gene communities underlie transcriptional changes in cornelia de lange syndrome. *Genetics*, 207: 139–151.
- [151] Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, Van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467: 430–435.
- [152] Rohatgi S, Clark D, Kline AD, Jackson LG, Pie J, Siu V, Ramos FJ, Krantz ID, Deardorff MA. (2010) Facial diagnosis of mild and variant CdLS: Insights from a dysmorphologist survey. *Am J Med Genet Part A*, 152: 1641–1653.
- [153] Walz K, Cohen D, Neilsen PM, Foster J, Brancati F, Demir K, Fisher R, Moffat M, Verbeek NE, Bjørge K, Lo Castro A, Curatolo P, Novelli G, Abad C, Lei C, Zhang L, Diaz-Horta O, Young JI, Callen DF, Tekin M. (2015) Characterization of

- ANKRD11 mutations in humans and mice related to KBG syndrome. *Hum Genet*, 134: 181–190.
- [154] Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CEJ, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. (2008) Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet*, 82: 477–488.
- [155] Tahiliani M, Mei P, Fang R, Leonor T, Rutenberg M, Shimizu F, Li J, Rao A, Shi Y. (2007) The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*, 447: 601–605.
- [156] Öunap K, Puusepp-Benazzouz H, Peters M, Vaheer U, Rein R, Proos A, Field M, Reimand T. (2012) A novel c.2T > C mutation of the KDM5C/JARID1C gene in one large family with X-linked intellectual disability. *Eur J Med Genet*, 55: 178–184.
- [157] Dunford A, Weinstock DM, Savova V, Schumacher SE, Cleary JP, Yoda A, Sullivan TJ, Hess JM, Gimelbrant AA, Beroukheim R, Lawrence MS, Getz G, Lane AA. (2017) Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet*, 49: 10–16.
- [158] Iwase S, Bérubé NG, Zhou Z, Kasri NN, Battaglioli E, Scandaglia M, Barco A. (2017) Epigenetic etiology of intellectual disability. *J Neurosci*, 37: 10773–10782.
- [159] Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19: 187–191.
- [160] Laget S, Joulie M, Le Masson F, Sasai N, Christians E, Pradhan S, Roberts RJ, Defossez PA. (2010) The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One*, 5:.
- [161] Talkowski ME, Mullegama S V., Rosenfeld JA, Van Bon BWM, Shen Y, Repnikova EA, Gastier-Foster J, Thrush DL, Kathiresan S, Ruderfer DM, Chiang C, Hanscom C, Ernst C, Lindgren AM, Morton CC, An Y, Astbury C, Brueton LA,

- Lichtenbelt KD, Ades LC, Fichera M, Romano C, Innis JW, Williams CA, Bartholomew D, Van Allen MI, Parikh A, Zhang L, Wu BL, Pyatt RE, Schwartz S, Shaffer LG, de Vries BBA, Gusella JF, Elsea SH. (2011) Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*, 89: 551–563.
- [162] Basson MA, van Ravenswaaij-Arts C. (2015) Functional Insights into Chromatin Remodelling from Studies on CHARGE Syndrome. *Trends in Genetics* 31: 600–611.
- [163] Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. (2010) Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 152: 674–686.
- [164] Terrone G, Cappuccio G, Genesio R, Esposito A, Fiorentino V, Riccitelli M, Nitsch L, Brunetti-Pierri N, Del Giudice E. (2014) A case of 14q11.2 microdeletion with autistic features, severe obesity and facial dysmorphisms suggestive of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 164: 190–193.
- [165] Thompson BA, Tremblay V, Lin G, Bochar DA. (2008) CHD8 Is an ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factor That Regulates  $\beta$ -Catenin Target Genes. *Mol Cell Biol*, 28: 3894–3904.
- [166] Gécz J, Cloosterman D, Partington M. (2006) ARX: a gene for all seasons. *Current Opinion in Genetics and Development* 16: 308–316.
- [167] Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi KI, Abuelo DN, Barr M, Bonneau D, Brady AF, Carpenter NJ, Ciperio KL, Frisone F, Fukuda T, Guerrini R, Iida E, Itoh M, Lewanda AF, Nanba Y, Oka A, Proud VK, Saugier-veber P, Schelley SL, Selicorni A, Shaner R, Silengo M, Stewart F, Sugiyama N, Toyama J, Toutain A, Vargas AL, Yanazawa M, Zackai EH, Dobyns WB. (2004) Mutations of ARX Are Associated with Striking Pleiotropy and Consistent Genotype-Phenotype Correlation. *Human Mutation* 23: 147–159.
- [168] Tischfield MA, Bosley TM, Salih MAM, Alorainy IA, Sener EC, Nester MJ, Oystreck DT, Chan WM, Andrews C, Erickson RP, Engle EC. (2005) Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nat Genet*, 37: 1035–1037.

- [169] Huang WH, Guenther CJ, Xu J, Nguyen T, Schwarz LA, Wilkinson AW, Gozani O, Chang HY, Shamloo M, Luo L. (2016) Molecular and Neural Functions of Rai1, the Causal Gene for Smith-Magenis Syndrome. *Neuron*, 92: 392–406.
- [170] Williams SR, Zies D, Mullegama S V., Grotewiel MS, Elsea SH. (2012) Smith-magenis syndrome results in disruption of CLOCK gene transcription and reveals an integral role for RAI1 in the maintenance of circadian rhythmicity. *Am J Hum Genet*, 90: 941–949.
- [171] Mullegama S, Alaimo J, Fountain M, Burns B, Balog A, Chen L, Elsea S. (2017) RAI1 Overexpression Promotes Altered Circadian Gene Expression and Dyssomnia in Potocki–Lupski Syndrome. *J Pediatr Genet*, 06: 155–164.
- [172] Toulouse A, Rochefort D, Roussel J, Joobert R, Rouleau GA. (2003) Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia. *Genomics*, 82: 162–171.
- [173] Ding N, Zhou H, Esteve P, Chin HG, Kim S, Xu X, Joseph SM, Friez MJ, Schwartz CE, Pradhan S, Boyer TG. (2008) Mediator Links Epigenetic Silencing of Neuronal Gene Expression with X-Linked Mental Retardation. *Mol Cell*, 31: 347–359.
- [174] Patil S, Somashekar P, Shukla A, Siddaiah S, Bhat V, Girisha K, Rao P. (2017) Clinical Variability in Familial X-Linked Ohdo Syndrome–Maat-Kievit-Brunner Type with MED12 Mutation. *J Pediatr Genet*, 06: 198–204.
- [175] Johnson TB, Mechels K, Anderson RE, Cain JT, Sturdevant DA, Braddock S, Pinz H, Wilson MA, Landsverk M, Roux KJ, Weimer JM. (2018) Characterization of a recurrent missense mutation in the forkhead DNA-binding domain of FOXP1. *Sci Rep*, 8: 1–8.
- [176] Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Vasu MM, Yamada K, Ueki T, Iwayama Y, Toyota T, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Suzuki K, Sugiyama T, Tsujii M, Yoshikawa T, Mori N. (2014) Zinc finger protein 804A (ZNF804A) and verbal deficits in individuals with autism. *J Psychiatry Neurosci*, 39: 294–303.
- [177] Li H, Lu M, Liu X. (2018) Zinc-Finger Proteins in Brain Development and Mental Illness. *Mini Rev J Transl Neurosci Cit*, 3: 4.
- [178] McKinsey GL, Lindtner S, Trzcinski B, Visel A, Pennacchio LA, Huylebroeck D,

- Higashi Y, Rubenstein JLR. (2013) *Dlx1&2-Dependent Expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) Regulates the Fate Switch between Cortical and Striatal Interneurons*. *Neuron*, 77: 83–98.
- [179] Badcock C. (2011) *The imprinted brain: How genes set the balance between autism and psychosis*. *Epigenomics* 3: 345–359.
- [180] Crespi BJ. (2019) *Autism, psychosis, and genomic imprinting: recent discoveries and conundrums*. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 25: 1–7.
- [181] Veltman MWM, Craig EE, Bolton PF. (2005) *Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: A systematic review*. *Psychiatric Genetics* 15: 243–254.
- [182] Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. (2016) *Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment*. *Molecular Syndromology* 7: 122–137.
- [183] Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. (2014) *Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: An overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46: 202–217.
- [184] Rossignol DA, Frye RE. (2012) *Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis*. *Molecular Psychiatry* 17:290–314.
- [185] Lombard J. (1998) *Autism: A mitochondrial disorder?* *Med Hypotheses*, 50: 497–500.
- [186] Giulivi C, Zhang YF, Omanska-Klusek A, Ross-Inta C, Wong S, Hertz-Picciotto I, Tassone F, Pessah IN. (2010) *Mitochondrial dysfunction in autism*. *JAMA - J Am Med Assoc*, 304: 2389–2396.
- [187] Oliveira G, Diogo L, Grazina M, Garcia P, Ataíde A, Marques C, Miguel T, Borges L, Vicente AM, Oliveira CR. (2005) *Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study*. *Dev Med Child Neurol*, 47: 185–189.
- [188] Filiano JJ, Goldenthal MJ, Harker Rhodes C, Marin-Garcia J. (2002) *Mitochondrial Dysfunction in Patients With Hypotonia, Epilepsy, Autism, and Developmental Delay: HEADD Syndrome*. *J Child Neurol*, 17: 435–439.

- [189] Parikshak NN, Gandal MJ, Geschwind DH. (2015) Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Genetics* 16: 441–458.
- [190] Napoli E, Wong S, Hertz-Picciotto I, Giulivi C. (2014) Deficits in bioenergetics and impaired immune response in granulocytes from children with autism. *Pediatrics*, 133:
- [191] Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Cohen BH. (2007) Mitochondrial disease: A practical approach for primary care physicians. *Pediatrics* 120: 1326–1333.
- [192] Kazachkova N, Ramos A, Santos C, Lima M. (2013) Mitochondrial DNA damage patterns and aging: Revising the evidences for humans and mice. *Aging and Disease* 4: 337–350.
- [193] Palmieri L, Persico AM. (2010) Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: Cause or effect? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1797: 1130–1137.
- [194] Smith M, Spence MA, Flodman P. (2009) Nuclear and mitochondrial genome defects in autisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1151: 102–132.
- [195] Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A. (2013) Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl Psychiatry*, 3:.
- [196] Varga NÁ, Pentelényi K, Balicza P, Gézsi A, Reményi V, Hársfalvi V, Bencsik R, Illés A, Prekop C, Molnár MJ. (2018) Mitochondrial dysfunction and autism: comprehensive genetic analyses of children with autism and mtDNA deletion. *Behav Brain Funct*, 14: 4.
- [197] Weissman JR, Kelley RI, Bauman ML, Cohen BH, Murray KF, Mitchell RL, Kern RL, Natowicz MR. (2008) Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: A cohort analysis. *PLoS One*, 3:.
- [198] Frye RE, Rossignol DA. (2011) Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. *Pediatr Res*, 69:.
- [199] Shen M, Wang F, Li M, Sah N, Stockton ME, Tidei JJ, Gao Y, Korabelnikov T,

- Kannan S, Vevea JD, Chapman ER, Bhattacharyya A, van Praag H, Zhao X. (2019) Reduced mitochondrial fusion and Huntingtin levels contribute to impaired dendritic maturation and behavioral deficits in *Fmr1*-mutant mice. *Nat Neurosci*, 22: 386–400.
- [200] Bengler M, Kinali M, Mazarakis ND. (2018) Autism spectrum disorder: Prospects for treatment using gene therapy. *Molecular Autism* 9: 1–10.
- [201] Méhes K. (1986) Informative Morphogenetic Variants (Minor Congenital Anomalies). *Orv Hetil*, 127: 3001–3003.
- [202] Remenyi V, Inczedy-Farkas G, Komlosi K, Horvath R, Maasz A, Janicsek I, Pentelenyi K, Gal A, Karcagi V, Meleg B, Molnar MJ. (2015) Retrospective assessment of the most common mitochondrial DNA mutations in a large Hungarian cohort of suspect mitochondrial cases. *Mitochondrial DNA*, 26: 572–578.
- [203] Pentelényi K. (2016) Az intergenomiális hatások és gén-környezet interakciók vizsgálata mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló kórképekben.
- [204] Li H, Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754–1760.
- [205] DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, 43: 491–498.
- [206] Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly (Austin)*, 6: 80–92.
- [207] Cooper DN, Ball E V., Krawczak M. (1998) The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res*, 26: 285–287.
- [208] Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. (2014) ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*, 42:.
- [209] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. (2010) A method and server for predicting damaging



- missense mutations. *Nature Methods* 7: 248–249.
- [210] Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. (2012) SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*, 40:.
- [211] Lubeck E, Coskun AF, Zhiyentayev T, Ahmad M, Cai L. (2012) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 9: 743–748.
- [212] Reva B, Antipin Y, Sander C. (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: Application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*, 39:.
- [213] Kircher M, Witten DM, Jain P, O’roak BJ, Cooper GM, Shendure J. (2014) A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, 46: 310–315.
- [214] Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet*, 24: 2125–2137.
- [215] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17: 405–424.
- [216] Rao AR, Nelson SF. (2018) Calculating the statistical significance of rare variants causal for Mendelian and complex disorders. *BMC Med Genomics*, 11: 53.
- [217] Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. (2013) Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet*, 9: e1003709.
- [218] Gotham K, Pickles A, Lord C. (2009) Standardizing ADOS scores for a measure of severity in autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 39: 693–705.
- [219] Ziats MN, Goin-Kochel RP, Berry LN, Ali M, Ge J, Guffey D, Rosenfeld JA, Bader P, Gambello MJ, Wolf V, Penney LS, Miller R, Lebel RR, Kane J, Bachman K, Troxell R, Clark G, Minard CG, Stankiewicz P, Beaudet A, Schaaf CP. (2016) The complex behavioral phenotype of 15q13.3 microdeletion syndrome. *Genet Med*, 18:

1111–1118.

- [220] van der Sluijs PJ, Jansen S, Vergano SA, Adachi-Fukuda M, Alanay Y, AlKindy A, Baban A, Bayat A, Beck-Wödl S, Berry K, Bijlsma EK, Bok LA, Brouwer AFJ, van der Burgt I, Campeau PM, Canham N, Chrzanowska K, Chu YWY, Chung BHY, Dahan K, De Rademaeker M, Destree A, Dudding-Byth T, Earl R, Elcioglu N, Elias ER, Fagerberg C, Gardham A, Gener B, Gerkes EH, Grasshoff U, van Haeringen A, Heitink KR, Herkert JC, den Hollander NS, Horn D, Hunt D, Kant SG, Kato M, Kayserili H, Kersseboom R, Kilic E, Krajewska-Walasek M, Lammers K, Laulund LW, Lederer D, Lees M, López-González V, Maas S, Mancini GMS, Marcelis C, Martinez F, Maystadt I, McGuire M, McKee S, Mehta D, Metcalfe K, Milunsky J, Mizuno D, Moeschler JB, Netzer C, Ockeloen CW, Oehl-Jaschkowitz B, Okamoto N, Olminkhof SNM, Orellana C, Pasquier L, Pottinger C, Riehmer V, Robertson SP, Roifman M, Rooryck C, Ropers FG, Rosello M., Ruivenkamp CAL, Sagiroglu MS, Sallevelt SCEH, Calvo AS, Simsek-Kiper PO, Soares G, Solaeche L, Sonmez FM, Splitt M, SteenbeekD, Stegmann APA, Stumpel CTRM, Tanabe S, Uctepe E, Utine GE, Veenstra-Knol HE, Venkateswaran S, Vilain C, Vincent-Delorme C, Vulto-van Silfhout AT, Wheeler P, Wilson GN, Wilson LC, Wollnik B, Kosho T, Wieczorek D, Eichler E, Pfundt R, de Vries BBA, Clayton-Smith J, Santen GWE. (2019) The ARID1B spectrum in 143 patients: from nonsyndromic intellectual disability to Coffin–Siris syndrome. *Genet Med*, 21: 1295–1307.
- [221] Li BM, Liu XR, Yi YH, Deng YH, Su T, Zou X, Liao WP. (2011) Autism in Dravet syndrome: Prevalence, features, and relationship to the clinical characteristics of epilepsy and mental retardation. *Epilepsy Behav*, 21: 291–295.
- [222] Hartshorne TS, Grialou TL, Parker KR. (2005) Autistic-like behavior in CHARGE syndrome. *Am J Med Genet*, 133 A: 257–261.
- [223] Liu L, Lei J, Sanders SJ, Willsey AJ, Kou Y, Cicek AE, Klei L, Lu C, He X, Li M, Muhle RA, Ma’Ayan A, Noonan JP, Šestan N, McFadden KA, State MW, Buxbaum JD, Devlin B, Roeder K. (2014) DAWN: A framework to identify autism genes and subnetworks using gene expression and genetics. *Mol Autism*, 5:.
- [224] Morava E, Van Den Heuvel L, Hol F, De Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ,

- Smeitink JAM. (2006) Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology*, 67: 1823–1826.
- [225] American Psychiatric Association. (2013) *DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MENTAL DISORDERS MANUAL OF FIFTH EDITION DSM-5*. 2013.
- [226] Frigaux A, Evrard R, Lighezzolo-Alnot J. (2019) ADI-R and ADOS and the differential diagnosis of autism spectrum disorders: Interests, limits and openings. *Encephale*, 45: 441–448.
- [227] Ferri SL, Abel T, Brodtkin ES. (2018) Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. *Curr Psychiatry Rep*, 20:.
- [228] Zhang Y, Li N, Li C, Zhang Z, Teng H, Wang Y, Zhao T, Shi L, Zhang K, Xia K, Li J, Sun Z. (2020) Genetic evidence of gender difference in autism spectrum disorder supports the female-protective effect. *Transl Psychiatry*, 10: 4.
- [229] Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WSW, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. (2012) Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 488: 471–475.
- [230] Taylor JL, Debost JCPG, Morton SU, Wigdor EM, Heyne HO, Lal D, Howrigan DP, Bloemendal A, Larsen JT, Kosmicki JA, Weiner DJ, Homys J, Seidman JG, Seidman CE, Agerbo E, McGrath JJ, Mortensen PB, Petersen L, Daly MJ, Robinson EB. (2019) Paternal-age-related de novo mutations and risk for five disorders. *Nat Commun*, 10:.
- [231] Gardner RM, Dalman C, Rai D, Lee BK, Karlsson H. (2020) The Association of Paternal IQ With Autism Spectrum Disorders and Its Comorbidities: A Population-Based Cohort Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 59: 410–421.
- [232] Lintas C, Persico AM. (2009) Autistic phenotypes and genetic testing: State-of-the-art for the clinical geneticist. *Journal of Medical Genetics* 46: 1–8.
- [233] Devlin B, Scherer SW. (2012) Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev*, 22: 229–237.

- [234] Collins SC, Mikhaleva A, Vrcelj K, Vancollie VE, Wagner C, Demeure N, Whitley H, Kannan M, Balz R, Anthony LFE, Edwards A, Moine H, White JK, Adams DJ, Reymond A, Lelliott CJ, Webber C, Yalcin B. (2019) Large-scale neuroanatomical study uncovers 198 gene associations in mouse brain morphogenesis. *Nat Commun*, 10: 1–12.
- [235] Maussion G, Diallo AB, Gigeck CO, Chen ES, Crapper L, Thérroux JF, Chen GG, Vasuta C, Ernst C. (2015) Investigation of genes important in neurodevelopment disorders in adult human brain. *Hum Genet*, 134: 1037–1053.
- [236] Amir RE, Van Den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 23: 185–188.
- [237] Sheikh TI, Ausió J, Faghfoury H, Silver J, Lane JB, Eubanks JH, MacLeod P, Percy AK, Vincent JB. (2016) From Function to Phenotype: Impaired DNA Binding and Clustering Correlates with Clinical Severity in Males with Missense Mutations in MECP2. *Sci Rep*, 6:.
- [238] Feng W, Kawauchi D, Körkel-Qu H, Deng H, Serger E, Sieber L, Ariel Lieberman J, Jimeno-Gonzalez S, Lambo S, Hanna BS, Harim Y, Jansen M, Neuerburg A, Friesen O, Zuckermann M, Rajendran V, Gronych J, Ayrault O, Korshunov A, Jones DTW, Kool M, Northcott PA, Lichter P, Cortés-Ledesma F, Pfister SM, Liu HK. (2017) Chd7 is indispensable for mammalian brain development through activation of a neuronal differentiation programme. *Nat Commun*, 8: 1–14.
- [239] Nakajima T, Kaneko Y, Dharmawan T, Kurabayashi M. (2019) Role of the voltage sensor module in Nav domain IV on fast inactivation in sodium channelopathies: The implication of closed-state inactivation. *Channels* 13: 331–343.
- [240] Bender AC, Natola H, Ndong C, Holmes GL, Scott RC, Lenck-Santini PP. (2013) Focal *Scn1a* knockdown induces cognitive impairment without seizures. *Neurobiol Dis*, 54: 297–307.
- [241] Barad DH, Darmon S, Weghofer A, Latham GJ, Wang Q, Kushnir VA, Albertini DF, Gleicher N. (2017) Association of skewed X-chromosome inactivation with FMR1 CGG repeat length and anti-Mullerian hormone levels: A cohort study. *Reprod*

Biol Endocrinol, 15:.

- [242] Kraan CM, Hocking DR, Georgiou-Karistianis N, Metcalfe SA, Archibald AD, Fielding J, Trollor J, Bradshaw JL, Cohen J, Cornish KM. (2014) Age and CGG-repeat length are associated with neuromotor impairments in at-risk females with the FMR1 premutation. *Neurobiol Aging*, 35: 2179.e7-2179.e13.
- [243] Tamás G, Kovács N, Varga NÁ, Barsi P, Eröss L, Molnár MJ, Balás I. (2016) Deep brain stimulation or thalamotomy in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome? Case report. *Neurol Neurochir Pol*, 50: 303–308.
- [244] Flanigan KM, Dunn DM, Von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ, United Dystrophinopathy Project Consortium; Weiss RB. (2009) Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat*, 30: 1657–1666.
- [245] Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BHY, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougale CJ, McGrath J, McMahan WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Pilorge M, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A,

- Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, RickabJ, Roberts W, Roeder C, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppion V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan B, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum J, Cantor R, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines J, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI Jr, Paterson AD, Pericak-Vance M, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C. (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466:368–372.
- [246] Péter B. (2018) Új generációs szekvenálási eljárások klinikai alkalmazása ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában Doktori értekezés. Egyetem, Semmelweis János, Szentágotthai Doktori Iskola, Idegtudományi,
- [247] Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S, Goldberg AP, Jinlu C, Keaney JF, Klei L, Mandell JD, Moreno-De-Luca D, Poultney CS, Robinson EB, Smith L, Solli-Nowlan T, Su MY, Teran NA, Walker MF, Werling DM, Beaudet AL, Cantor RM, Fombonne E, Geschwind DH, Grice DE, Lord C, Lowe J, Mane SM, Martin DM, Morrow EM, Talkowski ME, Sutcliffe JS, Walsh CA, Yu TW, Autism Sequencing Consortium; Ledbetter DH, Martin CL, Cook EH, Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Roeder K, State MW. (2015) Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87: 1215–1233.
- [248] Bakker M, Pajkrt E, Bilardo CM. (2014) Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: What next? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 28: 355–366.
- [249] Ataman B, Boulting GL, Harmin DA, Yang MG, Baker-Salisbury M, Yap EL, Malik AN, Mei K, Rubin AA, Spiegel I, Durrezi E, Sharma N, Hu LS, Pletikos M, Griffith EC, Partlow JN, Stevens CR, Adli M, Chahrour M, Sestan N, Walsh CA,

- Berezovskii VK, Livingstone MS, Greenberg ME. (2016) Evolution of Osteocrin as an activity-regulated factor in the primate brain. *Nature*, 539: 242–247.
- [250] Turrigiano G. (2012) Homeostatic synaptic plasticity: Local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4: a005736.
- [251] Altmüller F, Pothula S, Annamneedi A, Nakhaei-Rad S, Montenegro-Venegas C, Pina-Fernández E, Marini C, Santos M, Schanze D, Montag D, Ahmadian MR, Stork O, Zenker M, Fejtova A. (2017) Aberrant neuronal activity-induced signaling and gene expression in a mouse model of RASopathy. *PLOS Genet*, 13: e1006684.
- [252] Romcy-Pereira RN, Erraji-Benchekroun L, Smyrniotopoulos P, Ogawa S, Mello C V., Sibille E, Pavlides C. (2009) Sleep-dependent gene expression in the hippocampus and prefrontal cortex following long-term potentiation. *Physiol Behav*, 98: 44–52.
- [253] Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Di Lullo NM, Parikhshak NN, Stein JL, Walker MF, Ober GT, Teran NA, Song Y, El-Fishawy P, Murtha RC, Choi M, Overton JD, Bjornson RD, Carriero NJ, Meyer KA, Bilguvar K, Mane S, Sestan N, Lifton RP, Günel M, Roeder K, Geschwind DH, Devlin B, State MW. (2012) De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, 485: 237–241.
- [254] Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA. (2019) Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics* 60: 37–47.
- [255] Ferri SL, Abel T, Brodtkin ES. (2018) Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. *Curr Psychiatry Rep*, 20: 9.
- [256] O’Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD, Turner EH, Stanaway IB, Vernot B, Malig M, Baker C, Akey JM, Borenstein E, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Shendure J, Eichler EE. (2012) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485: 246–250.
- [257] Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, Lionel

- AC, Yuen RKC, Uddin M, Roberts W, Weksberg R, Woodbury-Smith M, Zwaigenbaum L, Anagnostou E, Wang Z, Wei J, Howe JL, Gazzellone MJ, Lau L, Sung WWL, Whitten K, Vardy C, Crosbie V, Tsang B, D'Abate L, Tong WWL, Luscombe S, Doyle T, Carter MT, Szatmari P, Stuckless S, Merico D, Stavropoulos DJ, Scherer SW, Fernandez BA. (2015) Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, 314: 895.
- [258] Kalsner L, Twachtman-Bassett J, Tokarski K, Stanley C, Dumont-Mathieu T, Cotney J, Chamberlain S. (2017) Genetic testing including targeted gene panel in a diverse clinical population of children with autism spectrum disorder: Findings and implications. *Mol Genet Genomic Med*,
- [259] Weiner DJ, Wigdor EM, Ripke S, Walters RK, Kosmicki JA, Grove J, Samocha KE, Goldstein JI, Okbay A, Bybjerg-Grauholm J, Werge T, Hougaard DM, Taylor J, Skuse D, Devlin B, Anney R, Sanders SJ, Bishop S, Mortensen PB, Børghlum AD, Smith GD, Daly MJ, Robinso EB (2017) Polygenic transmission disequilibrium confirms that common and rare variation act additively to create risk for autism spectrum disorders. *Nat Genet*, 49: 978–985.
- [260] Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, Hus V, Lowe JK, Willsey AJ, Moreno-De-Luca D, Yu TW, Fombonne E, Geschwind D, Grice DE, Ledbetter DH, Lord C, Mane SM, Martin CL, Martin DM, Morrow EM, Walsh CA, Melhem NM, Chaste P, Sutcliffe JS, State MW, Cook Jr EH, Roeder K, Devlin B (2012) Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Mol Autism*, 3:.
- [261] Ramaswami G, Geschwind DH. (2018) Genetics of autism spectrum disorder. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., 2018.; pp. 321–329.
- [262] Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H, Pallesen J, Agerbo E, Andreassen OA, Anney R, Awashti S, Belliveau R, Bettella F, Buxbaum JD, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M, Cerrato F, Chambert K, Christensen JH, Churchhouse C, Dellenvall K, Demontis D, De Rubeis S, Devlin B, Djurovic S, Dumont AL, Goldstein JI, Hansen CS, Hauberg ME, Hollegaard MV, Hope S, Howrigan DP, Huang H, Hultman CM, Klei L, Maller J, Martin J, Martin AR, Moran



JL, Nyegaard M, Nærland T, Palmer DS, Palotie A, Pedersen CB, Pedersen MG, dPoterba T, Poulsen JB, St Pourcain B, Qvist P, Rehnström K, Reichenberg A, Reichert J, Robinson EB, Roeder K, Roussos P, Saemundsen E, Sandin S, Satterstrom FK, Smith GD, Stefansson H, Steinberg S, Stevens CR, Sullivan PF, Turley P, Walters GB, Xu X, Autism Spectrum Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, BUPGEN, Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 23andMe Research Team, Stefansson K, Geschwind DH, Nordentoft M, Hougaard DM, Werge T, Mors O, Mortensen PB, Neale BM, Daly MJ, Børghlum AD (2019) Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nat Genet*, 51: 431–444.

[263] Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, Witherspoon K, Gerds J, Baker C, Vulto-Van Silfhout AT, Schuurs-Hoeijmakers JH, Fichera M, Bosco P, Buono S, Alberti A, Failla P, Peeters H, Steyaert J, Vissers LELM, Francescato L, Mefford HC, Rosenfeld JA, Bakken T, O’Roak BJ, Pawlus M, Moon R, Shendure J, Amaral DG, Lein E, Rankin J, Romano C, de Vries BBA, Katsanis N, Eichler EE (2014) Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell*, 158: 263–276.

[264] Liu C, Kraja AT, Smith JA, Brody JA, Franceschini N, Bis JC, Rice K, Morrison AC, Lu Y, Weiss S, Guo X, Palmas W, Martin LW, Chen Y-DI, Surendran P, Drenos F, Cook JP, Auer PL, Chu AY, Giri A, Zhao W, Jakobsdottir J, Lin LA, Stafford JM, Amin N, Mei H, Yao J, Voorman A, CHD Exome+ Consortium; ExomeBP Consortium; GoT2DGenes Consortium; T2D-GENES Consortium; Larson MG, Grove ML, Smith AV, Hwang SJ, Chen H, Huan T, Kosova G, Stitzel NO, Kathiresan S, Samani N, Schunkert H, Deloukas P, Myocardial Infarction Genetics and CARDIoGRAM Exome Consortia; Li M, Fuchsberger C, Pattaro C, Gorski M, CKDGen Consortium; Kooperberg C, Papanicolaou GJ, Rossouw JE, Faul JD, Kardina SLR, Bouchard C, Raffel LJ, Uitterlinden AG, Franco OH, Vasani RS, O’Donnell CJ, Taylor KD, Liu K, Bottinger EP, Gottesman O, Daw EW, Giulianini F, Ganesh S, Salfati E, Harris TB, Launer LJ, Dörr M, Felix SB, Rettig R, Völzke H, Kim E, Lee WJ, Lee IT, Sheu WHH, Tsoie KS, Edwards DRV, Liu Y, Correa A,

- Weir DR, Völker U, Ridker PM, Boerwinkle E, Gudnason V, Reiner AP, van Duijn CM, Borecki IB, Edwards TL, Chakravarti A, Rotter JI, Psaty BM, Loos RJF, Fornage M, Ehret GB, Newton-Cheh C, Levy D, Chasman DI (2016) Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. *Nat Genet*, 48: 1162–1170.
- [265] Matsunami N, Hensel CH, Baird L, Stevens J, Otterud B, Leppert T, Varvil T, Hadley D, Glessner JT, Pellegrino R, Kim C, Thomas K, Wang F, Otieno FG, Ho K, Christensen GB, Li D, Prekeris R, Lambert CG, Hakonarson H, Leppert MF (2014) Identification of rare DNA sequence variants in high-risk autism families and their prevalence in a large case/control population. *Mol Autism*, 5: 5.
- [266] Griswold AJ, Dueker ND, Van Booven D, Rantus JA, Jaworski JM, Slifer SH, Schmidt MA, Hulme W, Konidari I, Whitehead PL, Cuccaro ML, Martin ER, Haines JL, Gilbert JR, Hussman JP, Pericak-Vance MA. (2015) Targeted massively parallel sequencing of autism spectrum disorder-associated genes in a case control cohort reveals rare loss-of-function risk variants. *Mol Autism*, 6:.
- [267] Prior M, Leekam S, Ong B, Eisenmajer R, Wing L, Gould J, Dowe D. (1998) Are There Subgroups within the Autistic Spectrum? A Cluster Analysis of a Group of Children with Autistic Spectrum Disorders. *J Child Psychol Psychiatry*, 39: 893–902.
- [268] Tadevosyan-Leyfer O, Dowd M, Mankoski R, Winklosky B, Putnam S, McGrath L, Tager-Flusberg H, Folstein SE.(2003) A principal components analysis of the autism diagnostic interview-revised. *J Am Acad Child Adolesc Psychi*, 42:864–872.
- [269] Hu VW, Steinberg ME. (2009) Novel clustering of items from the autism diagnostic interview-revised to define phenotypes within autism spectrum disorders. *Autism Res*, 2: 67–77.
- [270] Hu VW, Lai Y. (2013) Developing a Predictive Gene Classifier for Autism Spectrum Disorders Based upon Differential Gene Expression Profiles of Phenotypic Subgroups. *N Am J Med Sci (Boston)*, 6:.
- [271] Balicza P, Varga NÁ, Bolgár B, Pentelényi K, Bencsik R, Gál A, Gézsi A, Prekop C, Molnár V, Molnár MJ. (2019) Comprehensive analysis of rare variants of 101 autism-linked genes in a Hungarian cohort of autism spectrum disorder patients. *Front*

Genet, 10: 434.

- [272] Cholemkery H, Medda J, Lempp T, Freitag CM. (2016) Classifying Autism Spectrum Disorders by ADI-R: Subtypes or Severity Gradient? *J Autism Dev Disord*, 46: 2327–2339.
- [273] Hrdlicka M, Dudova I, Beranova I, Lisy J, Belsan T, Neuwirth J, Komarek V, Faladova L, Havlovicova M, Sedlacek Z, Blatny M, Urbanek T. (2005) Subtypes of autism by cluster analysis based on structural MRI data. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 14: 138–144.
- [274] Doshi-Velez F, Ge Y, Kohane I. (2014) Comorbidity clusters in autism spectrum disorders: An electronic health record time-series analysis. *Pediatrics*, 133:.
- [275] Krueger DA, Northrup H, Krueger DA, Roberds S, Smith K, Sampson J, Korf B, Kwiatkowski DJ, Mowat D, Nellist M, Povey S, de Vries P, Byars A, Dunn D, Ess K, Hook D, Jansen A, King B, Sahin M, International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group (2013) Tuberous sclerosis complex surveillance and management: Recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference. *Pediatr Neurol*, 49: 255–265.
- [276] Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Hosooka T, Inoue H, Matsumoto M, Koike M, Uchiyama Y, Noda T, Seino S, Kasuga M, Kido Y. (2011) Ablation of TSC2 Enhances Insulin Secretion by Increasing the Number of Mitochondria through Activation of mTORC1. *PLoS One*, 6: e23238.
- [277] Thurm A, Tierney E, Farmer C, Albert P, Joseph L, Swedo S, Bianconi S, Bukelis I, Wheeler C, Sarphare G, Lanham D, Wassif CA, Porter FD. (2016) Development, behavior, and biomarker characterization of Smith-Lemli-Opitz syndrome: An update. *J Neurodev Disord*, 8: 12.
- [278] Balogh I, Koczok K, Szabó GP, Török O, Hadzsiev K, Csábi G, Balogh L, Dzsudzsák E, Ajzner E, Szabó L, Csákváry V, Oláh A V. (2012) Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary. In: *Molecular Syndromology*. Karger Publishers, 2012.; pp. 215–222.
- [279] Chang S, Ren G, Steiner RD, Merkens L, Rouillet JB, Korade Z, DiMuzio PJ,

- Tulenko TN. (2014) Elevated autophagy and mitochondrial dysfunction in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab Reports*, 1: 431–442.
- [280] Combs JA, Norton EB, Saifudeen ZR, Honer Zu Bentrup K, Morris CA, Myers L, Kaur A, Sullivan DE, Zvezdaryk KJ. (2019) Human Cytomegalovirus Alters Host Cell Mitochondrial Function During Acute Infection 1 2 Downloaded from.
- [281] Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, Simoncic I, Lionel AC, Vergult S, Pyatt RE, Van De Kamp J, Nieuwint A, Weiss MM, Rizzu P, Verwer LENI, Van Spaendonk RML, Shen Y, Wu BL, Yu T, Yu Y, Chiang C, Gusella JF, Lindgren AM, Morton CC, van Binsbergen E, Bulk S, van Rossem E, Vanakker O, Armstrong R, Park SM, Greenhalgh L, Maye U, Neill NJ, Abbott KM, Sell S, Ladda R, Farber DM, Bader PI, Cushing T, Drautz JM, Konczal L, Nash P, de Los Reyes E, Carter MT, Hopkins E, Marshall CR, Osborne LR, Gripp KW, Thrush DL, Hashimoto S, Gastier-Foster JM, Astbury C, Ylstra B, Meijers-Heijboer H, Posthuma D, Menten B, Mortier G, Scherer SW, Eichler EE, Girirajan S, Katsanis N, Groffen AJ, Sistermans EA (2013) Exonic deletions in *AUTS2* cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet*, 92: 210–220.
- [282] Analysis of shared heritability in common disorders of the brain.
- [283] Pavlowsky A, Chelly J, Billuart P. (2012) Emerging major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Molecular Psychiatry* 17: 682–693.
- [284] Leonzino M, Busnelli M, Antonucci F, Verderio C, Mazzanti M, Chini B. (2016) The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. *Cell Rep*, 15: 96–103.
- [285] Nelson SB, Valakh V. (2015) Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87: 684–698.
- [286] Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M ming. (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, 105: 521–532.
- [287] Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly M a, Scheffer IE, Smith R, Bomar J, Sutton E, Vandeleur L, Shoubridge C, Edkins S, Turner SJ, Stevens C, O’Meara S,

Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Jones D, Lee R, Madison M, Mironenko T, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Jenkinson A, Shepherd R, Gusella JF, Afawi Z, Mazarib A, Neufeld MY, Kivity S, Lev D, Lerman-Sagie T, Korczyn AD, Derry CP, Sutherland GR, Friend K, Shaw M, Corbett M, Kim HG, Geschwind DH, Thomas P, Haan E, Ryan S, McKee S, Berkovic SF, Futreal PA, Stratton MR, Mulley JC, Géczy J (2008) X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet*, 40: 776–781.

[288] Pizzo L, Jensen M, Polyak A, Rosenfeld JA, Mannik K, Krishnan A, McCready E, Pichon O, Le Caignec C, Van Dijck A, Pope K, Voorhoeve E, Yoon J, Stankiewicz P, Cheung SW, Pazuchanics D, Huber E, Kumar V, Kember RL, Mari F, Curró A, Castiglia L, Galesi O, Avola E, Mattina T, Fichera M, Mandarà L, Vincent M, Nizon M, Mercier S, Bénétteau C, Blesson S, Martin-Coignard D, Mosca-Boidron AL, Caberg JH, Bucan M, Zeesman S, Nowaczyk MJM, Lefebvre M, Faivre L, Callier P, Skinner C, Keren B, Perrine C, Prontera P, Marle N, Renieri A, Reymond A, Kooy RF, Isidor B, Schwartz C, Romano C, Sistermans E, Amor DJ, Andrieux J, Girirajan S (2019) Rare variants in the genetic background modulate cognitive and developmental phenotypes in individuals carrying disease-associated variants. *Genet Med*, 21: 816–825.

## 11 Saját publikációk jegyzéke

### 11.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Balicza P\*, Varga NA\*, Bolgar B, Pentelényi K, Bencsik R, Gal A, Gezsi A, Prekop Cs, Molnar V, Molnar MJ. (2019) Comprehensive analysis of rare variants of 101 autism-linked genes in a Hungarian cohort of autism spectrum disorder patients. *Front. Genet.* 10:434-15.

**IF: 3,517**

Varga NA, Pentelényi K, Balicza P, Gézsi A, Reményi V, Hársfalvi V, Bencsik R, Illés A, Prekop C, Molnár MJ. (2018) Mitochondrial dysfunction and autism: Comprehensive genetic analyses of children with autism and mtDNA deletion. *Behav Brain Funct.* 14:4-14. **IF:**

**2,457**

Kékesi A\*, Varga NÁ\*, Molnár MJ. (2014) Az autizmus spektrum betegség genetikája Gyermekgyógyászat. 65:327-332.

### 11.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Varga NÁ, Barsi P, Molnár MJ. (2015) A Leigh-szindróma a genetikailag legheterogénebb mitokondriális betegség. *Gyermekgy. Tov. Szeml.* 20:75-77,3p.

Buza K., Varga NÁ (2016) ParkinsonNET: Estimation of UPDRS Score Using Hubness-Aware Feedforward Neural Networks. *App. Art. Intell.*, 30(6), 541–555. **IF: 0,652**

Tamás G, Kovács N, Varga NÁ, Barsi P, Erőss L, Molnár MJ, Balás I. (2016) Deep brain stimulation or thalamotomy in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome? Case report. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 50(4), 303–308. **IF:0,857**

Balicza P, Terebessy A, Grosz Z, Varga NA, Gal A, Fekete BA, Molnar MJ. (2018) Implementation of personalized medicine in Central-Eastern Europe: pitfalls and potentials based on citizen's attitude. *EPMA Journal*, 9(1), 103–112. **IF:3,900**

## 12 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni legelőször témavezetőmnek, Prof. Dr. Molnár Mária Juditnak, aki a kezdetektől támogatott és motivált munkámban, és akihez minden helyzetben fordulhattam segítségért. Szeretettel köszönöm a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének minden kedves munkatársának, hogy segítette munkámat. Elsősorban köszönettel tartozom Dr. Balicza Péternek és Dr. Pentelényi Klárának a sok segítségért, felügyeletért, támogatásért, amit nyújtottak, őszintén megvallva tudom, nélkülük nem sikerült volna ezt a színvonalas munkát megvalósítani. Köszönöm Magyarosi Szilviának a projekt koordinálásában betöltött szerepét. Köszönöm László Izabella, Kovács Margit, Sáry Mónika asszisztenseknek, hogy szaktudásukkal elviselhetőbbé tették betegeink részére a vérvétel okozta fájdalmakat. Köszönöm Prekop Csilla gyógypedagógusnak és a Vadaskert Gyermek- és Ifjúságpszichiátriai Kórház összes dolgozójának a betegbeválasztásban betöltött szerepét, illetve, hogy helyet biztosítottak a betegek vizsgálatára.

Köszönöm Dr. Illés Anett, Bencsik Renáta, Csabán Dóra és Kékesi Anna biológusoknak a labormunkában és a genetikai tesztek kivitelezésében betöltött szerepét, illetve köszönöm Dr. Gál Anikó laborvezető közreműködését, építő kritikáit a dolgozat megszületéséhez.

Külön köszönöm az NGS adatok kiértékelésében nyújtott segítségüket Dr. Balicza Péternek, Dr. Illés Anettnek és Dr. Búza Krisztiánnak. Köszönöm Báthory Györgyinek és Kovács Margitnak a minták biobankolásában játszott szerepét. Köszönöm az intézetünk orvosgárdájának, hogy a kezdetektől fogva mind a mai napig terelgetnek a betegellátás és menedzsment rögzös útján. Szívből köszönöm a betegek és szüleik részvételét és hozzájárulását az ASD kutatás fejlődéséhez. Illetve köszönöm családomnak és férjemnek a fáradhatatlan szeretetük mellyel munkám során támogattak.

Kutatásomhoz anyagi támogatást nyújtott a BIOKLIMA KTIA\_AIK\_12-1-2013-0017 és a KTIA\_13\_NAP-AIII/6 Nemzeti Agykutatási Program.