

Corelații între implicațiile genetice și clinice în autism: un studiu preliminar

Correlations between the Genetical and Clinical Implications in Autism: a Preliminary Study

Nussbaum Laura*^{1,2}, Ageu Luminita², Corches Axinia*², Micu-Serbu Bianca², Dumitriu Simona^{3,4}, Andreescu Nicoleta⁴, Puiu Maria*⁴

* Autorii au drepturi egale - primii autori / The authors have equal rights - first authors

REZUMAT

Tulburările de Spectru Autist (TSA) sunt o constelație de tulburări neurodevelopmentale caracterizate prin deficite în interacțiunea socială și limbaj / comunicare care asociază prezența unor interese restrictive și a unor comportamente repetitive. Deoarece aproape două treimi dintre genele din genom sunt implicate în dezvoltarea creierului prin participarea la căi și mecanisme diferite, devine evident de ce procesele neurodevelopmentale care duc la tulburări multifactoriale sunt extrem de complexe, prin urmare căutarea genelor candidate pentru autism a relevat cele mai interesante rezultate. Vor fi selectați pacienții cu diagnostic clinic de TSA realizat de un medic psihiatru pediatru certificat în conformitate cu Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-V (DSM-V). Diagnosticul clinic va fi confirmat prin utilizarea instrumentelor de diagnostic standardizate, considerate “standardul de aur” - asocierea testelor Chestionarul comunicării sociale (SCQ), Interviul diagnosticului pentru autism - revizuit (ADI), Program de observare și diagnostic a autismului (ADOS) pentru diagnosticul clinic. Studiu genetic al tulburării de spectru autist vor include indicatori genetici și determinarea Variante de copii ale genelor (CNV) pentru regiunea 15q prin qPCR. Proiectul va genera efecte sociale și economice prin rezultatele preconizate care vor duce la obținerea de protocoale de evaluare și monitorizare a TSA, adăugând un plus de control tehnicilor clasice și contribuind la creșterea calității actului terapeutic, în beneficul evident al pacienților.

Cuvinte cheie: autism, gene, polimorfism, diagnostic

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are a constellation of neurodevelopmental disorders characterized by the deficits in social reciprocity and language/communication ability, the presence of restricted interests and repetitive behaviors. Since almost two thirds of the genes in the genome are involved in brain development by participating in different ways and mechanisms, it becomes obvious why neurodevelopmental processes that lead to multifactorial disorders are extremely complex; therefore the candidate genes for autism search revealed the most interesting results. Patients with a clinical diagnosis of ASD, made by board-certificated child psychiatrists according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-V (DSM-V), will be recruited. Clinical diagnosis will be confirmed by the use of standardized diagnostic tools, considered the “gold standard” - SCQ, ADI, ADOS for clinical diagnosis. The genetic study of autism spectrum disorders will include genetic markers and determine CNV 15q region by qPCR. The project will generate social and economic effects, deliverables that will result in the assessment and monitoring protocols TSA, adding a touch of classical control techniques and enhancing the quality of treatment, the evident benefit of patients.

Keywords: autism, gene, polymorphism, diagnostic

1 Universitatea de Medicină și Farmacie „V. Babeș” Timișoara, Disciplina de Pedopsihiatrie, Departamentul de Neuroștiințe

2 Clinica de Neurologie și Psihiatrie pentru Copii și Adolescenți, Timișoara

3 University College London, Department of Medicine, Royal Free Hospital

4 Universitatea de Medicină și Farmacie „V. Babeș” Timișoara, Disciplina de Genetică

e-mail: nussbaumlaura@yahoo.com

1 University of Medicine and Pharmacy „V. Babeș” Timișoara, Paedopsychiatry Discipline, Department of Neurosciences

2 Clinic of Neurology and Psychiatry for Children and Adolescents, Timișoara

3 University College London, Department of Medicine, Royal Free Hospital

4 University of Medicine and Pharmacy „V. Babeș” Timișoara, Discipline of Genetics

e-mail: nussbaumlaura@yahoo.com

INTRODUCERE

Tulburările de Spectru Autist (TSA) sunt o constelație de tulburări neurodevelopmentale caracterizate prin deficite în interacțiunea socială și limbaj / comunicare care asociază prezența unor interese restrictive și a unor comportamente repetitive. Prevalența TSA a fost estimată aproximativ la 1:110 copii cu o rată băieți : fete de 4:1, fără variații legate de rasă și aria geografică. Studiile genetice recente au început să identifice gene care ar putea participa la etiologia acestor tulburări complexe [2].

Deoarece aproape două treimi dintre genele din genom sunt implicate în dezvoltarea creierului prin participarea la căi și mecanisme diferite devine evident de ce procesele neurodevelopmentale care duc la tulburări multifactoriale sunt extrem de complexe, prin urmare căutarea genelor candidate pentru autism a relevat cele mai interesante rezultate [13]. Datorită etiologiei multifactoriale, studiul necesită o abordare interdisciplinară, integrativă.

Pornim de la observații recente care au arătat că genele care modelează expresia sinaptică și conectivitatea neuronală dintre diferite regiuni ale creierului, polimorfisme ale acestor gene și asocieri ale lor sunt investigate curent în tulburările de neurodezvoltare cu simptome pervazive [9]. Articolul își propune analiza polimorfismelor genei GABRB3, care codează subunitatea B3 a receptorului GABA_A în populația pediatrică cu TSA, Sindrom Prader Willi (PWS) și Sindrom Angelman (AS) și într-un lot de control randomizat. Genotipurile identificate vor fi analizate în raport cu scorurile diagnostice determinate cu instrumente standardizate - Chestionarul comunicării sociale (SCQ), Interviuul diagnosticului pentru autism - revizuit (ADI), Program de observare și diagnostic al autismului (ADOS).

Această direcție de cercetare nu a fost dezvoltată până în prezent și nu s-a efectuat nici un studiu în populația noastră. Identificarea unor corelații între SNPs, expresia GABRB3 și fenotipul pacienților poate aduce date valoroase despre evoluția clinică și răspunsul la terapia antiepileptică la grupul care asociază și epilepsie.

Evidențierea cauzelor genetice ale TSA ne va permite acordarea unui sfat genetic adecvat și evitarea riscului de recurență a bolii în familie, profilaxia fiind în această patologie un deziderat important.

Proiectul va genera efecte sociale și economice

prin rezultatele preconizate care vor duce la obținerea de protocoale de evaluare și monitorizare a TSA, adăugând un plus de control tehnicilor clasice și contribuind la creșterea calității actului terapeutic, în beneficiul evident al pacienților.

MATERIAL ȘI METODĂ

Vor fi recrutați pacienții cu diagnostic clinic de TSA realizat de un medic psihiatru pediater certificat în conformitate cu Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-V⁴ (DSM-V) vor fi recrutați din Clinica de Psihiatrie și Neurologie pentru Copii și Adolescenți, Timișoara, din centrul specializat pentru terapia copiilor cu TSA "Casa Faenza" Timișoara și din Centrul de Sănătate Mentală al Spitalului de Urgență pentru Copii "Louis Țurcanu" Timișoara. Pacienții cu PWS - Prader Willi și AS- Sindrom Angelman vor fi recrutați din registrul de pacienți al Asociației Prader Willi și al Alianței Naționale pentru Boli Rare și al Departamentului de Genetică al Spitalului de Urgență pentru Copii "Louis Țurcanu" Timișoara [11].

Diagnosticul clinic va fi confirmat prin utilizarea instrumentelor de diagnostic standardizate, considerate "standardul de aur" - asocierea testelor SCQ, ADI, ADOS pentru diagnosticul clinic.

Interviul Diagnosticului pentru Autism-Revizuit (ADI-R) este un interviu amănunțit al părintelui (sau al persoanei de îngrijire) a unui individ suspectat ca având tulburare din spectrul autist [1]. Interviul poate fi utilizat pentru evaluarea adulților și a copiilor, cu condiția ca vârsta lor mintală să fie peste 2 ani.

Program de Observare și Diagnostic al Autismului (ADOS-G) este un instrument semistrukturat standardizat de evaluare a interacțiunii sociale, comunicării, jocului și utilizării cu imaginație a anumitor materiale de către persoane suspectate de tulburări din spectrul autist [1].

Chestionarul comunicării sociale (SCQ) - ajută la evaluarea abilităților și funcționării sociale a copiilor care pot suferi de autism sau de alte tulburări din spectrul autismului [14].

Evaluarea pacienților cu TSA, PWS și AS se va face în prezența și în colaborare cu părinții/asistenții maternali, iar înregistrarea datelor se va face împreună cu cea a coeficientului de dezvoltare/nivelului intelctului pentru cele 2 categorii: TSA și sindroame cauzate de modificări genetice ale regiunii 15q 11-13- PWS

și AS. Studiul genetic al tulburării de spectru autist va include Indicatori genetici și Determinarea CNV pentru regiunea 15q prin qPCR. Genotipare prin RT-PCR presupune utilizarea de kit-uri și reactivi compatibili cu aparatul Applied Biosystem 7900HT. Pentru analiza genotipului GABRB3 se va utiliza metoda de discriminare alelică utilizând kit-uri TaqMan SNP Genotyping Assay Cat. No. 4351379 (Life Technologies, Carlsbad, CA) și Locked Nucleic Acids probes (LNA) cu design specific (Sigma Aldrich) în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Determinarea CNV pentru regiunea 15q prin qPCR presupune generarea oligonucleotide pentru amplificarea acestei regiunii folosind softul Primer3 și se va verifica specificitatea folosind instrumentul BLAT din browserul UCSC Human Genome Browser. Protocolul de lucru pentru qPCR se bazează pe utilizarea SYBR Green I dye (disponibile sub iQ™ SYBR® Green Supermix produs de BioRad, Cat. No.170-8880) care conține *iTaq* DNA polymerase, o polimerază hot-start care minimizează amplificarea produșilor PCR nespecifici.

Se vor recolta probe biologice pentru genotipare (sânge periferic recoltat pe EDTA din care se va extrage ADN).

Metodologia analizei statistice cuprinde evaluarea rolului hazardului, a erorilor sistematice și a factorilor de confuzie cu explicații alternative pentru rezultatele înregistrate. Nici un subiect inclus într-un grup de studiu nu se omite de la analiză. În prelucrarea statistică a rezultatelor studiului va fi folosit programul SPSS pentru analiza corelației – relații între două variabile cantitative. Se vor stabili: Gradul de dependență, Corelația lineară, Dreapta de regresie, Corelația pentru variabile ordinale.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Fără îndoială la ora actuală PCR reprezintă cea mai importantă tehnică utilizată în domeniul biologiei moleculare. Ceea ce se poate realiza prin PCR în termeni tehnici poate fi descris foarte simplu: permite amplificarea rapidă și nelimitată a secvențelor specifice de acizi nucleici independent de concentrația în care aceștia sunt prezenți în soluția/ proba sursă. Motivarea utilizării pe scară largă a PCR în cercetare, diagnostic și monitorizarea evoluției terapeutice este dată de sensibilitatea metodei- molecule unice de ADN pot fi detectate și analizate; specificitatea-

toate polimorfismele, de la o singură schimbare nucleotidică la rearanjamente largi poate fi identificată prin designul unui test PCR corespunzător. Al treilea argument ar fi rapiditatea - se poate genera un răspuns la o ipoteză de cercetare sau diagnostic într-o perioadă de la una la câteva zile. Mai mult, perioada recentă a adăugat o altă calitate metodei- democrația: atunci când anumite perechi de secvențe nucleotidice folosite pentru a interoga o anumită reacție PCR este publicată, oricine poate utiliza aceste secvențe pentru a reproduce aceeași reacție.

Odată ce alelele alternative au fost secvențiate și o singură schimbare nucleotidică a fost identificată între cele două allele devine posibil designul unui protocol PCR care permite urmărirea segregării uneia dintre acestea. Inițial sunt identificați primerii care permit amplificarea specifică a regiunii de interes care conține site-ul nucleotidic unde a fost nominalizată varianta (pentru această aplicație lungimea secvenței nu este critică, putându-se întinde de la 150 la 400 de nucleotide). Apoi două oligonucleotide cu specificitate alelică sunt produse pentru fiecare variantă, încercându-se localizarea variantei cât mai aproape de centru secvenței. Ideal se folosește o secvență de 19-21 de nucleotide, destul de scurtă pentru a permite hibridizarea diferențială bazată pe prezența unei deferențe de doar o bază azotată și destul de lungă pentru a permite specificitate de locus.

Q-PCR- PCR cantitativ este utilizat pentru măsurarea specifică a cantității de acizi nucleici (ADN/ARN) în probă prin măsurarea amplificării doar în faza de creștere exponențială cantitatea de produs măsurată reflectă cantitatea inițială a probei target. Metodele de Q-PCR folosesc marker fluorescent precum Sybr Green sau probe conținând fluorofori, precum TaqMan, pentru a măsura cantitatea de produs amplificat pe măsură ce procesul de amplificare se derulează.

Sistemul GABA-ergic joacă un rol crucial în dezvoltarea inițială a creierului. Atât studiile de asociere genetică cât și cele de expresie sugerează un rol cheie al sistemului GABA-ergic în autism. Mai precis, variațiile genei GABRB3 au fost anterior implicate în empatie și TSA în studiile la oameni. Primul studiu care a asociat variații ale genei GABRB3 cu TSA a identificat o asociere semnificativ statistică între markerul 155CA-2 și indivizii cu TSA folosind testul de dezechilibru al transmisiei multiple la 140 de familii [5].

Rezultatul a fost replicat ulterior de un alt studiu care a inclus 80 de familii cu autism [3].

Variații ale GABRB3 au fost de asemenea asociate cu sensibilitatea tactilă, care este atipică la unii indivizi cu TSA [16].

Mai mult, modelul murin GABRB3 knockout a prezentat deficite în relaționarea și comportamentul social, putând fi considerat ca un potențial model animal pentru autism [6].

GABRB3 codează subunitatea B3 a receptorului GABA_A. Receptorul GABA_A este un receptor ionotrop dependent de ligand, care face parte din sinapsele inhibitorii ale creierului adultului și conduce selectiv ionii de Cl. De-a lungul dezvoltării GABRB3 este foarte importantă pentru creșterea și diferențierea neurală și mediază semnalizarea excitatorie [10]. Warrier et al. au testat importanța genei GABRB3 ca genă candidată în TSA și în măsurarea endofenotipică a 6 potențiale a spectrului autist: 3 măsoară auto-raportarea (trasături autiste, empatia, sistematizarea) și 3 măsoară performanța (recunoașterea emoțiilor, atenția la detalii, procesarea spațială) [18]. Măsurătorile auto-raportării folosite sunt următoarele; Coeficientul Tulburărilor de Spectru Autist (Autism Spectrum Quotient - AQ) este o măsurătoare a trăsăturilor autiste. Interpretarea - scor AQ mai mare de 32 este predictiv pentru TSA. Scorurile AQ arată o ereditate semnificativă în eșantionul populației generale. Empatia a fost măsurată utilizând Coeficientul de Empatie (Empathy Quotient - EQ). În medie, indivizii cu diagnosticul de TSA vor avea scoruri semnificativ mai mici decât loturile de control la EQ.

Atenția la detalii a fost măsurată folosind Embedded Figures Test (EFT) în care participanții erau solicitați să localizeze forma încadrabilă într-un model complex. Indivizii cu TSA au scoruri peste medie. Procesarea spațială a fost măsurată utilizând Testul de Rotație Mentală (Mental Rotation Test - MRT) în care indivizii erau solicitați să potrivească părți dintr-o scrisoare și să identifice dacă părțile din scrisoare sunt identice sau sunt imagini în oglindă. În acest studiu indivizii cu TSA au avut rezultate mai bune decât lotul de control la MRT.

Trei SNPs (rs7180158, rs7165604, rs12593579) au fost asociate semnificativ cu sindromul Asperger, în timp ce alte două SNPs (rs9806546, rs11636966) au fost asociate semnificativ cu EQ. Două perechi de SNPs, rs12438141-rs1035751 și rs12438141-rs7179514 au arătat asociere semnificativă cu variația

scorurilor EFT. O altă pereche de SNPs, rs7174437-rs1863455, a fost semnificativ asociată cu variația scorurilor MRT. Mai mult, câteva haplotipuri, incluzând un bloc de 19 kb care în acest studiu a prezentat dezechilibru de înlănțuire la linkage, conținând numeroși SNPs a fost găsită în asociere semnificativă cu sindromul Asperger.

Cromozomul 15q11-q13 este o regiune cromozomială cu incidență crescută a delețiilor și duplicațiilor care sunt frecvent asociate cu tulburările dezvoltamentale incluzând TSA. Deleția segmentului paternal 15q11.2-q12 este asociat cu Sindromul Prader-Willi, în timp ce deleția segmentului maternal a 15q11-13 este asociat cu Sindromul Angelman, ambele tulburări genetice cu afectare globală a dezvoltării și particularități fenotipice legate atât de limbaj, procesare vizuo-spațială și relaționare interpersonală, cu un grad semnificativ de suprapunere cu patologia pervazivă. Mai mult decât atât, duplicația maternală a 15q11-q13 a fost găsită la aproximativ 1-3% din pacienții cu TSA. Prin urmare, genele localizate în aceasta regiune sunt considerate ca gene candidate pentru TSA.

Acidul gamma-aminobutiric (GABA) este principalul neurotransmițător inhibitor al creierului. Un grup de gene subunitare receptorilor GABA_A incluzând GABRB3, GABRA5 și GABRG3 care codifică subunități β3, α5, γ3, au fost mapate la cromozomul 15q12. Studii recente au arătat că o cale GABA-ergic modificată este asociată cu patogeneza autismului [15]. De exemplu, reducerea expresiei receptorilor GABA_A, subunitare incluzând GABRB3 și enzimele GABA sintetizate, decarboxilaza acidului glutamic (GAP) 65 și 67 au fost găsite în mai multe regiuni din creierul pacienților cu autism.

Mai multe studii de linkage și de asociere au investigat asocierea a 3 receptori GABA_A subunitar genelor la cromozomul 15q11-13 cu TSA. Cook et al., au raportat prima dată existența unui dezechilibru de asociere între autism și markerul genetic GABRB3 [5, 8, 16].

Menold et al., au găsit doi markeri genetici în GABRB3 asociați cu autismul iar Mc Canley et al. a efectuat o analiză legată de dezechilibrul de markeri genetici care se întind pe 1MB a cromozomului 15q12; ei au găsit 6 markeri între GABRB3 și GABRA5 asociați cu autismul [12].

În viziunea heterogenității clinice a pacienților cu TSA, mai multe grupuri au studiat asocierea genetică a acestor receptori GABA_A subunitar genelor cu

seturi de pacienți cu TSA bazate pe fenotipurile particulare. Warrier *et al.* au examinat asocierea între 45 SNPs și GABRB3 și sindromul Asperger, găsind o asociere semnificativă a 3 SNPs cu sindromul Asperger și multiple endofenotipuri în legătură cu TSA.

Sensibilitatea senzorială atipică este una din nuclele caracteristice a pacienților cu autism și Tavasoli *et al.*, au găsit o asociere între markerii genetici a GABRB3 și sensibilitatea tactilă în dezvoltarea tipică la copii. Aceste dovezi convergente din aceste studii, susțin ideea ca GABRB3 poate fi o genă candidată importantă pentru TSA

Regiunile proximale ale cromozomilor acrocenrici în mod special, 15q11.2, sunt frecvent implicate în rearanjarea structurală. Între rearanjamentele regiunii 15q, duplicațiile interstițiale sunt mai frecvente la câțiva pacienți analizați prin tehnici moleculare. Christofolini *et al.*, au descris un rearanjament interstițial al cromozomului 15 compus din triplicația a -6.9Mb, între 15q11.2 to 15q13.2 urmată de duplicația -2.4Mb, între 15q13.2 to 15q13.3 [4, 7, 17, 18]. Acești pacienți prezintă manifestări clinice diferite incluzând întârzieri în dezvoltare și dizabilități intelectuale, dismorfism facial minor, epilepsie și comportament autist.

Screening-ul genomului prin modificări ale numărului copiilor ADN-ului a fost realizat fie prin tehnici citogenetice clasice cum ar fi hibridizarea metafazei comparative genomice și hibridizarea fluorescentă in situ (FISH), fie prin arrayCGH sau PCR cantitativ. Chiar dacă arrayCGH și tehnicile FISH au fost utilizate pe scară largă pentru detectarea numărului de copii modificate ADN, aceste abordări au propriile lor limite. Analiza FISH se aplică când regiunea de interes a fost definită anterior; utilizarea ei nu oferă suficientă rezoluție pentru detectarea de microdeleții și necesită o expertiză tehnică ridicată și o perioadă prelungită de timp până la obținerea rezultatelor.

Hibridizare Genomică Comparativă pe Microarare (ArrayCGH) este folosit pentru detectarea micilor modificări ale numărului de copii ADN simultan la nivelul întregului genom. Au demonstrat că o creștere a specificității, sensibilității și a transferului comparativ cu alte metode folosite pentru analizarea modificărilor numărului de copii. Cercetări recente în curs de dezvoltare din studiile arrayCGH pentru microdeleții/microduplicații, indică faptul că se impune o validare semnificativă pentru a face interpretări feno-

tip-genotip. Până în prezent această procedură nu este disponibilă pe scară largă pentru screenarea diagnosticului unui număr mare de pacienți și este limitată de costuri. În acest studiu am ales să validăm utilizarea PCR-ului cantitativ (qPCR) pentru detecția de microdeleții și microduplicații ale regiunii 15q utilizând ADN genomic. qPCR a fost anterior folosit pentru a cuantifica nivelul expresiei genelor dar nu a fost utilizat pentru screenarea de rutină a copiilor cu autism pentru CNV ale 15q.

Studiul lui Van Esch *et al.* a utilizat qPCR al copiilor ADN pentru confirmarea arrayCGH la 4 pacienți cu duplicații MECP2 [7, 17]. Luând în considerare design-ul biobăncii noastre și avantajele tehnice îmi propun să dezvolt qPCR realizat într-un singur tub utilizând ADN-ul pacienților pentru detectarea de modificări ale numărului de copii în gena GABRB3 și restului regiunii 15q. qPCR-ul oferă o mare adaptabilitate și flexibilitate, în timp ce necesită un cadru tehnic mai puțin extins decât FISH, fiind disponibil în marea majoritate a laboratoarelor. Această tehnică oferă avantajul mării de înaltă rezoluție a regiunii de interes și o adaptabilitate înaltă bazată pe design-ul diferit a perechilor de primeri și pe optimizarea condițiilor PCR pentru un proiect specific. Metoda propusă va fi validată utilizând ADN de la pacienții diagnosticați deja prin array CGH. Chiar dacă tulburarea are loc spontan la cei mai mulți indivizi afectați, riscul de recurență la al doilea copil este mai puțin de 1%, este recomandat să oferim diagnostic prenatal la aceste cupluri, chiar dacă modificarea genetică a fost sau nu identificată la părinți.

Abordarea utilizată în acest studiu poate fi adaptată pentru diagnosticul molecular al oricărei regiuni genomice care poate avea deleții sau duplicații, oferind o măsurătoare precisă cantitativă a copiilor ADN. Implementarea qPCR-ului pentru numărul de copii va produce de asemenea date importante pentru corelarea fenotip-genotip.

Referitor la aspectele clinice se consideră “standard de aur” asocierea testelor SCQ, ADI, ADOS pentru diagnosticul clinic.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) este un interviu amănunțit al părintelui (sau persoanei de îngrijire) unui individ suspectat ca având tulburare din spectrul autist. Interviuul poate fi utilizat pentru evaluarea adulților și a copiilor, cu condiția ca vârsta lor mintală să fie peste 2 ani. Interviuul este compus din 93 itemi, cu trei domenii funcționale: limbaj și comu-

nicare; interacțiuni sociale reciproce; comportamente și interese restrânse, repetitive și stereotipe. ADI-R este foarte eficient în diferențierea autismului de alte tulburări de dezvoltare, și în evaluarea sindroamelor de graniță; s-au identificat astfel subgrupuri noi și a putut fi cuantificată simptomatologia autistă. Pentru a putea face o apreciere adecvată a comportamentului unei persoane, simptomatologia trebuie analizată în situații diferite în care interacțiunea să fie intenționat structurată. În acest scop, au fost create scalele de psihodiagnostic (scale de observație pentru diagnosticul tulburărilor psihiatrice).

Proram de Observare și Diagnostic a Autismului (ADOS-G - Autism Diagnostic Observation Schedule)⁴⁸⁵ un instrument semistrukturat standardizat de evaluare a interacțiunii sociale, comunicării, jocului și utilizării cu imaginație a anumitor materiale de către persoane suspectate de tulburări din spectrul autist. Programul de observație constă din patru module, fiecare cu durata de aproximativ 40 minute, în funcție de capacitatea de limbaj expresiv și de vârsta cronologică a persoanei testate: 1 – fără limbaj expresiv; 2 – limbaj non-fluent; 3 – limbaj fluent; 4 – limbaj fluent, adolescenți și adulți. Jocul în modulele 1 și 2 implică o cameră de examinare cu jucării în care copilul și examinatorul să se poată mișca liber. Modulele 3 și 4 pot fi completate la masă (implică discuții). Modulele se filmează, se pot ulterior coda. Există scoruri de cut-off pentru toate tulburările din spectru - PDD-NOS, autism atipic, spectru autist. Codările ADOS-G stabilesc un scor care nu depinde de capacitatea de limbaj.

Chestionarul Comunicării Sociale (Social Communication Questionnaire - SCQ) este al treilea component al triadei recunoscute la nivel internațional drept "Golden Standard" pentru evaluarea autismului, alături de ADI-R și ADOS. Acest instrument concis ajută la evaluarea abilităților și funcționării sociale a copiilor care pot suferi de autism sau de alte tulburări din spectrul autismului. Fiind un chestionar ce poate fi completat de un părinte sau de către un alt tutore în mai puțin de 10 minute, SCQ reprezintă o modalitate eficientă pentru a determina dacă o persoană ar trebui sau nu să fie inclusă într-un program complet de evaluare diagnostică. Chestionarul este disponibil în două variante - *Pe parcursul întregii vieți* – legat de evaluarea de-a lungul vieții (*Lifetime*) și *Actual* – legat de evaluarea situației curente (*Current*).

Varianta de evaluare a întregii vieți este centrată

pe întreaga istorie a dezvoltării copilului, oferind un scor total care este interpretat în funcție de anumite puncte de delimitare. Acest scor identifică persoanele care pot avea autism și care ar trebui să se supună unei evaluări complete cu Autism Diagnostic Interview-Revised (ADIR) sau cu Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). SCQ prezintă unele asemănări cu ADI-R, iar concordanța dintre scorurile SCQ și ADI-R este mare și nu este afectată de vârstă, gen, nivelul limbajului și performanța IQ. Așadar, SCQ este un instrument de screening valid, oferind o imagine rezonabilă asupra severității simptomelor. Varianta de evaluare a situației curente se concentrează pe comportamentul copilului din ultimele 3 luni de până la momentul administrării. Rezultatele oferite de această variantă pot fi utile pentru planificarea tratamentului, intervenția educațională și măsurarea gradului de schimbare în timp.

CONCLUZII

Studiile genetice derulate nu au putut identifica o singură genă responsabilă de toate variațiile din spectru autist, majoritatea studiilor trasând direcția importanței geneticii în neurodezvoltare. Genele implicate în dezvoltarea creierului (incluzând gene implicate în formarea sau stabilizarea sinapselor și gene implicate în neurotransmisia în aceste circuite neuronale imature), au fost asociate în mod constant cu autismul.

Deoarece cauzele genetice ale autismului nu sunt încă decodate complet, la acest capitol sunt listate sindroame genetice cunoscute (sindrom X fragil, Gilbert sau Timothy) în care autismul poate fi recunoscut. Este de asemenea recunoscută contribuția la autism a mai multe forme distincte de variații genetice (comune sau rare) și a factorilor de mediu.

Evidențierea cauzelor genetice ale TSA ne va permite acordarea unui sfat genetic adecvat și evitarea riscului de recurență a bolii în familie, profilaxia fiind în această patologie un deziderat important.

Proiectul va genera efecte sociale și economice prin rezultatele preconizate care vor duce la obținerea de protocoale de evaluare și monitorizare a TSA, adăugând un plus de control tehnicilor clasice și contribuind la creșterea calității actului terapeutic, în beneficiul evident al pacienților.

BACKGROUND

Autism spectrum disorders (ASD) are a constellation of neurodevelopmental disorders characterized by the deficits in social reciprocity and language/communication ability and the presence of restricted interests and repetitive behaviors. The prevalence of ASD was estimated approximately as 1 per 110 children, with a male-to-female ratio of approximately 4:1, without race and geographical variations. Recent genetic studies have begun to identify genes likely to be involved in the etiology of these disorders complex [2].

Since almost two thirds of the genes in the genome are involved in brain development by participating in different ways and mechanisms, it becomes obvious why neurodevelopmental processes that lead to multifactorial disorders are extremely complex; therefore the candidate genes for autism search revealed the most interesting results [13]. Because of the multifactorial etiology, the study requires an interdisciplinary, integrative approach.

We begin from the fact that the recent observations have shown that the expression of genes that shape neuronal synaptic connectivity between different regions of the brain, polymorphisms in these genes and their combinations are currently investigated in neurodevelopmental disorders and pervasive symptoms [9]. The article analyzes the GABRB3 gene polymorphisms which encodes a subunit of the GABAA receptor B3 in the pediatric population with ASD, Prader Willi Syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS) and a randomized control group. Genotypes identified will be assessed against established standardized diagnostic tools scores - ADI-R, ADOS, SCQ.

This line of research has not yet been developed and so far there is no study in our population. Identifying correlations between SNPs, GABRB3 expression and phenotype of patients, can bring valuable data about the clinical course and response to antiepileptic therapy group associating epilepsy.

Highlighting the genetic causes of TSA will allow the granting of appropriate genetic counseling and the risk of recurrence of the disease in the family, prevention being an important goal in this pathology.

The project will generate social and economic effects, deliverables that will result in the assessment and monitoring protocols in TSA, adding a touch of

classical control techniques and enhancing the quality of treatment and the evident benefit of patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients with a clinical diagnosis of ASD made by board-certificated child psychiatrists according to the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-V* (DSM-V), were recruited from the Clinic of Psychiatry and Neurology for Children and Adolescents, Timisoara, from „Casa Faenza” Timisoara and from the Children’s Mental Health Center from Timisoara [11]. Patients with a clinical diagnosis of PWS and AS will be recruited from Prader Willi Association, Rare Diseases Association and from Genetic Department of Children’s Emergency Hospital “Louis Turcanu” Timișoara.

The clinical diagnosis is confirmed by the use of standardized diagnostic tools considered the “gold standard” - SCQ association tests, ADI, ADOS for clinical diagnosis.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) is a detailed interview of the parent (or caregiver) of an individual suspected of having autism spectrum disorder [1]. The interview can be used to assess adults and children, provided that their mental age is over 2 years. ADOS-G (Autism Diagnostic Observation Schedule) is a standardized semi-structured instrument for assessing social interaction, communication, play and imaginative use of certain materials by patients suspected of autism spectrum disorders.

Social Communication Questionnaire (SCQ, Social Communication Questionnaire) - helps to assess skills and social functioning of children who may suffer from autism or autism spectrum disorders [14]. Evaluation of patients with ASD, PWS and AS will be in the present and in collaboration with parents / foster parents, and data recording will be made with the coefficient D / intellect level for the 2 categories: TSA and syndromes caused by genetic 11-13- 15q region PWS and AS. Genetic study of autism spectrum disorder include genetic markers and determination CNV 15q region by qPCR. Genotyping by RT-PCR involves the use of kits and reagents compatible with the machine 7900HT Applied Biosystem. For GABRB3 genotype analysis will be used allelic discrimination method using TaqMan SNP genotyping kits Assay Cat. No. 4351379 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and probes Locked Nucleic

Acids (LNA) with specific design (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Determination CNV 15q region by qPCR amplification oligonucleotides involves the generation of this region using Primer3 software and check the instrument COUNTER TOP specificity using UCSC Human Genome Browser browser. The working protocol for qPCR is based on the use of SYBR Green I dye (available under the iQ™ SYBR® Green Supermix produced by BioRad, Cat. No.170-8880) containing Itaqi DNA polymerase, a hot-start polymerase, that minimizes the amplification of PCR products non-specific.

Regarding the collection of biological samples will be both genotyping samples (EDTA peripheral blood of which will be extracted DNA). Statistical analysis methodology includes assessing the role of chance, bias and the confounding factors with alternative explanations for the results achieved. No topics included in a study group is not omitted from the analysis. The statistical processing of survey results will be used for correlation analysis SPSS - relationships between two quantitative variables.

It shall establish: degree of dependence, linear correlation, Regression, Correlation for ordinal variables.

RESULTS AND DISCUSSIONS

No doubt today PCR is the most important technique used in molecular biology. What can be done by PCR in technical terms can be described very simply enables fast and unlimited amplification of specific sequences of nucleic acids independent of concentration in which they are present in the solution / sample source. Motivation widespread use of PCR in the research, diagnosis and monitoring therapeutic progress is given by the sensitivity of the method - single molecules of DNA can be detected and analyzed; specificity- all the polymorphisms of a single nucleotide change in large rearrangements may be identified by appropriate design of the PCR test. The third argument is rapidity- can generate a response to a research or diagnostic hypothesis in a period of one to several days. Moreover, recent years have added another quality metodei- democracy: when certain pairs of nucleotide sequences used to query a specific PCR reaction is published, anyone can use these sequences to reproduce the same reaction.

Once the alternative alleles were sequenced and a single nucleotide change was found between the two alleles becomes possible design of a PCR protocol allowing segregation follow one of them. Initially are identified the primers that allow specific amplification of the region of interest containing the site where it was nominated variant nucleotide (for this application sequence length is not critical, and can be spread from 150 to 400 nucleotides). Then two allele-specific oligonucleotides are produced for each variant, trying to locate as close to the center variant sequence. Ideal it is used a sequence of 19-21 nucleotides, quite short to allow differential hybridization based on the presence of difference just a nitrogenous base and long enough to allow locus specificity.

Q-PCR is a quantitative PCR, used to measure the amount of specific nucleic acids (DNA / RNA) in the sample by measuring the amplification in the exponential growth phase but the amount of product measured reflects the initial amount of the target sample. Methods for Q-PCR using SYBR Green fluorescent dye and the sample containing or fluorophores, such as TaqMan, to measure the amount of product amplified as the process of amplification are made.

GABAergic system plays a crucial role in the initial development of the brain. Both genetic association studies and the expression suggests a key role of the GABAergic system in autism. More specifically, GABRB3 gene variations have been previously implicated in empathy and TSA studies in humans. The first study GABRB3 gene variations associated with TSA has identified a statistically significant association between marker 155CA-2 and individuals with ASD using multiple transmission disequilibrium test to 140 families [5]. The result was subsequently replicated by another study that included 80 families with autism [3]. Variations of the GABRB3 have also been associated with the tactile sensitivity which is unusual for some individuals with ASD [16]. Moreover, GABRB3 knockout murine model showed deficits in social networking and comportementul can be regarded as a potential animal model for autism [6].

B3 has GABRB3 encoding the GABAA receptor subunit. GABAA receptor is a ligand-dependent ionotropic receptors, which is part of the adult brain inhibitory synapses and selective lead ions Cl. Throughout development is very important GABRB3 bags for growth and differentiation of neural and signaling mediates excitatory [10]. Warrier et al. tested im-

portance GABRB3 gene as candidate gene in TSA and potential measurement endofenotipică 6 autistic spectrum: 3 self-reporting measures (trasăuri autistic, empathy, systematization) and 3 measures the performance (recognition of emotions, attention to detail, spatial processing) [18]. Self-reporting measurements used are as follows; Autism Spectrum Quotient (AQ) is a measure of autistic traits. Interpretation - AQ score greater than 32 is predictive of TSA and AQ scores show a significant heritability general population sample. Empathy was measured using the Empathy Quotient (EQ). On average, individuals diagnosed with ASD will have significantly lower scores than the control groups EQ.

The attention to detail was measured using the Embedded Figures Test (EFT) in which participants were asked to locate the form enclosed in a complex pattern. Individuals with ASD have scores above average. Spatial processing was measured using the Mental Rotation Test (MRT) in which individuals were asked to match part of a letter and identify whether part of the letter are identical or mirror images. In this study, individuals with ASD had better outcomes than the control group at MRT.

Three SNPs (rs7180158, rs7165604, rs12593579) were significantly associated with Asperger's syndrome, while the other two SNPs (rs9806546, rs11636966) were significantly associated with EQ. Two pairs of SNPs, rs12438141, rs1035751 and rs12438141, rs7179514 showed significant association with variation EFT scores. Another pair of SNPs, rs7174437-rs1863455 was significantly associated with scores varying MRT. Furthermore, several haplotypes, including a block of 19 kb in this study showed linkage to linkage disequilibrium, that contained SNPs significant association was found in Asperger's syndrome.

Chromosome 15q11-q13 is an chromosomal region increased incidence of deletions and duplications that are commonly associated with developmental disorders including TSA. Deletion 15q11.2-q12 paternal segment is associated with Prader-Willi syndrome, while the maternal 15q11-13 deletion segment is associated with Angelman syndrome, genetic disorder affecting both global development and related phenotypic features as language, visuo - spatial processing and interpersonal relationship with a significant degree of overlap with pervasive pathology. Moreover, 15q11-q13 mother of duplicate was found in about

1-3% of patients with TSA. Therefore, the genes located in this region are considered as candidate genes for TSA.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the brain. A group of genes including GABAA receptor subunit GABRB3, encoding subunits GABRG3 GABRA5 and $\beta 3$, $\alpha 5$, $\gamma 3$, was mapped to chromosome 15q12. Recent studies have shown that GABA-ergic path change is associated with the pathogenesis of autism. For example, reducing GABA_A receptor expression, including GABRB3 subunit enzymes synthesized GABA, glutamic acid decarboxylase (GAP) 65 and 67 were found in several regions of the brain of patients with autism.

Several linkage and association studies have investigated the association of three receptor subunit genes on chromosome 15q11-13 GABA_A with ASD. Cook et al., Reported the first time the existence of an association between autism imbalance and genetic marker GABRB3 [5, 8, 16].

Menold et al., Found two genetic markers associated with autism in GABRB3 and Mc Canley et al. conducted an analysis of genetic markers linked to the imbalance that stretch of chromosome 15q12 1MB; they found six markers between GABRB3 and GABRA5 associated with autism [12].

In the view of the clinical heterogeneity of patients with ASD, several groups have studied the genetic association of these receptors subunit gene sets GABA_A patients with ASD phenotypes based on particular. Warriar et al. examined the association between SNPs and 45 GABRB3 and Asperger syndrome, finding a significant association of three SNPs with Asperger syndrome and multiple endofenotipuri in connection with ASD.

Atypical sensory sensitivity is one of the characteristic core of patients with autism and Tavassoli et al., Found an association between genetic markers of GABRB3 and tactile sensitivity in typical development in children. These converging evidence from these studies support the idea that GABRB3 can be an important candidate gene for ASD.

Acrocentric proximal regions chromosome specifically 15q11.2, are frequently involved in structural rearrangement. Between the region 15q rearrangements, duplications are more common interstitial few patients analyzed by molecular techniques. Cristofolini et al., Described a rearrangement of chromo-

some 15 consists of interstitial triplication of -6.9Mb between 15q11.2 to 15q13.2 followed by duplicating -2.4Mb between 15q13.2 to 15q13.3 [4, 7, 17, 18]. These patients have different clinical manifestations including developmental delays and intellectual disabilities, minor facial dysmorphism, epilepsy and autistic behavior.

Genome screening by changes in the DNA copy number was achieved either by classical cytogenetic techniques, such as comparative genomic hybridization of metaphase and fluorescence in situ hybridization (FISH), or by arrayCGH or quantitative PCR. Although arrayCGH and FISH techniques have been widely used for the detection of modified DNA copy number, these approaches have their own limitations. FISH analysis is applied when the region of interest was previously defined; its use does not provide sufficient resolution to detect microdeletions and requires high technical expertise and a prolonged period of time to obtain results.

ArrayCGH is utilised to detect small changes in DNA copy number simultaneously across the entire genome. Have shown that increasing the specificity, sensitivity and transfer compared to other methods used for analyzing copy number changes. Recent research studies in developing arrayCGH for microdeletions / microduplications indicates that validation is required to make significant phenotype-genotype interpretation. So far this procedure is not widely available for screenarea diagnosis of a large number of patients and limited costs. In this study we chose to validate the PCR using quantitative (qPCR) for the detection of microdeletions and microduplications 15q region using genomic DNA. qPCR was previously used to quantify the gene expression but not used for routine screening children with autism for CNV of 15q.

The study Van Esch et al. used DNA to confirm qPCR children arrayCGH 4 patients with MECP2 duplications [7, 17]. Taking into consideration our design and technical advantages biobăncii I propose to develop qPCR performed in a single tube using the DNA of patients for the detection of changes in the number of children in the GABRB3 gene and the rest of the region 15q. qPCR site offers great adaptability and flexibility, while requiring less extensive than technical framework FISH, available in most laboratories. This technique offers the advantage of high resolution mapping of the region of interest and

a high adaptability design based on different pairs of primers and PCR conditions optimization for a specific project. The proposed method will be validated using DNA from patients already diagnosed by array CGH. Even if the condition occurs spontaneously in most affected individuals, the risk of recurrence of the second child is less than 1%, it is recommended to offer prenatal diagnosis in these couples, even if the genetic modification or not the parents identified.

The approach used in this study can be adapted for the molecular diagnosis of any genomic regions may have deletions, or repeats, providing an accurate measurement of DNA copy quantity. Implementing's qPCR for the number of copies will also produce important data for genotype-phenotype correlation.

Regarding clinical aspects are considered "gold standard" the association of SCQ, ADI, ADOS for clinical diagnosis.

Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) is a detailed interview of the parent (or caregiver) an individual suspected of having autism spectrum disorder. The interview can be utilized for de evaluation of adults and children, with the condition that their mental age should be over 2 years. The interview is composed by 93 items, with 3 domains of functioning: language and communication; mutual social interactions; restricted, repetitive, stereotyped behaviours and interests. ADI-R is very effective in differentiating autism from other developmental disorders, and borderline syndromes assessment; were identified as new subgroups of autistic symptomatology could be quantified. In order to make a proper assessment of a person's behavior, symptoms must be analyzed in different situations which are intentionally structured interaction. To this end, were created psychodiagnostic scales (scales of observation for psychiatric diagnosis).

ADOS-G (Autism Diagnostic Observation Schedule ADOS-G (Autism Diagnostic Observation Schedule) a standardized assessment tool semi-structured social interaction, communication, play and imaginative use of certain materials by suspected autism spectrum disorders. The program consists of four modules observation, each lasting about 40 minutes, depending on the capacity of expressive language and chronological age of the person being tested: 1 - no expressive language; 2 - non-fluent language; 3 - fluent language; 4 - language fluently, adolescents and adults. Play in modules 1 and 2 involves the examina-

tion room with toys the child and the examiner can move freely. Modules 3 and 4 can be completed at the table (involving discussion). Filming modules can be subsequently encode. There are cut-off scores for all spectrum disorders - PDD-NOS, atypical autism, autistic spectrum. Encodings ADOS-G set a score that is independent of language ability.

Social Communication Questionnaire (SCQ, Social Communication Questionnaire) is the third component of the triad internationally recognized as the "Golden Standard" for evaluating autism with ADI-R and ADOS. This tool helps concise assessment skills and social functioning of children who may suffer from autism or autism spectrum disorders. Being a questionnaire that can be completed by a parent or guardian by another in less than 10 minutes, the SCQ is an effective way to determine whether a person should or should not be included in a complete diagnostic evaluation. The questionnaire is available in two versions - lifetime - relating to the evaluation of lifetime (Lifetime) and Actual - relating to the evaluation of the current situation (Current). Evaluation version of all life is centered on the history of child development, providing a total score that is interpreted according to certain boundary points. This score can identify people who have autism and who should undergo a full assessment Autism Diagnostic Interview-Revised with (ADIR) Autism Diagnostic Observation Schedule or (ADOS). SCQ has some similarities with the ADI-R and the correlation between ADI-R scores and SCQ is high and is not affected by age, gender, language level and performance IQ. So SCQ is a valid screening tool, providing a reasonable picture of the severity of symptoms.

Alternative assessment of the current situation focuses on the child's behavior in the last 3 months until use. The results provided by this variant may be useful for treatment planning, intervention and educational measure the change in time.

CONCLUSIONS

Genetic studies conducted could not identify a single gene responsible for all changes in the autistic spectrum, most studies tracing the importance of genetics in neurodevelopmental direction. The genes involved in brain development (including genes involved in the formation or stabilization of synapses and genes involved in neural circuits neurotransmission these immature) were consistently associated with autism.

Because the genetic causes of autism are not yet fully decoded, this chapter lists the known genetic syndromes (fragile X syndrome, Joubert and Timothy) that autism can be recognized. It is also recognized contribution to autism several distinct forms of genetic variations (common or rare) and environmental factors.

Highlighting the genetic causes of TSA will allow the granting of appropriate genetic counseling and the risk of recurrence of the disease in the family, prevention is an important goal in this pathology.

The project will generate social and economic effects deliverables that will result in the assessment and monitoring protocols TSA, adding a touch of classical control techniques and enhancing the quality of treatment, the benefit of patients evident.

BIBLIOGRAFIE/ REFERENCES

1. Bishop, D. V. M. Genes, Cognition, and Communication: Insights from Neurodevelopmental Disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1156**, 1–18 (2009).
2. Petrella, J. R., Mattay, V. S. & Doraiswamy, P. M. Imaging genetics of brain longevity and mental wellness: the next frontier? *Radiology* **246**, 20–32 (2008).
3. Glessner, J. T. *et al.* Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**, 569–573 (2009).
4. Home | APA DSM-5. at <<http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>>
5. Autism ADOS and ADI-R - Brookdale. at <<http://www.brookdalecare.co.uk/Autism-ADOS-and-ADI-R>>
6. Social Communication Questionnaire (SCQ) | WPS. at <<http://www.wpspublish.com/store/p/2954/social-communication-questionnaire-scq>>
7. Geschwind, D. H. & Levitt, P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 103–111 (2007).
8. Cook, E. H. *et al.* Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11–13 markers. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1077–1083 (1998).
9. Buxbaum, J. D. *et al.* Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol. Psychiatry* **7**, 311–316 (2002).
10. Tavassoli, T., Auyeung, B., Murphy, L. C., Baron-Cohen, S. & Chakrabarti, B. Variation in the autism candidate gene GABRB3 modulates tactile sensitivity in typically developing children. *Mol. Autism* **3**, 6 (2012).

11. DeLorey, T. M., Sahbaie, P., Hashemi, E., Homanics, G. E. & Clark, J. D. Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* **187**, 207–220 (2008).
12. Herlenius, E. & Lagercrantz, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp. Neurol.* **190 Suppl 1**, S8–21 (2004).
13. Warrior, V., Baron-Cohen, S. & Chakrabarti, B. Genetic variation in GABRB3 is associated with Asperger syndrome and multiple endophenotypes relevant to autism. *Mol. Autism* **4**, 48 (2013).
14. Sutcliffe, J. S., Nurmi, E. L. & Lombroso, P. J. Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosome 15q11-q13 genes in autism. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **42**, 253–256 (2003).
15. McCauley, J. L. *et al.* A linkage disequilibrium map of the 1-Mb 15q12 GABA(A) receptor subunit cluster and association to autism. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* **131B**, 51–59 (2004).
16. Christofolini, D. M. *et al.* Autistic disorder phenotype associated to a complex 15q intrachromosomal rearrangement. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* **159B**, 823–828 (2012).
17. Van Esch, H. *et al.* Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 442–453 (2005).
18. Duplication of the MECP2 region is a frequent... [Am J Hum Genet. 2005] - PubMed - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080119>>