

**Dissertation**

**Identifikation von Genen die mit Autismus-  
Spektrum-Störungen assoziiert sind**

Eingereicht durch

Mag. et Mag. rer.nat.

Gerald Egger

zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktor der medizinischen Wissenschaft**

(Dr. scient. med.)

an der

**Medizinischen Universität Graz**

**Institut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. et Dr. scient. med. Erwin Petek

2012

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfasst und alle Menschen und Organisationen, die in jedweder Weise zur Dissertation beigetragen haben, namentlich genannt habe. Außerdem habe ich im Text alle Materialien die verwendet wurden angeführt. Während der gesamten Dissertationsarbeit und für alle dazu in Verbindung stehenden Publikationen habe ich die Richtlinien der „Good Scientific Practice“ befolgt.

Graz, am:

Unterschrift:

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen recht herzlich bedanken, die mich während meines gesamten Studiums begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt allen MitarbeiterInnen vom Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz, allen voran Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Christian Windpassinger und Christine Beichler, MSc für geleistete Hilfe, Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit.

Weiters möchte ich John B. Vincent, PhD und allen MitarbeiterInnen des Molecular Neuropsychiatry and Development Laboratory, Centre for Addiction and Mental Health in Toronto, Kanada danken.

Großer Dank gilt auch Anath Lionel, MSc und allen MitarbeiterInnen am Centre for Applied Genomics in Toronto, Kanada.

Auch bedanken möchte ich mich für die Hilfe auf dem Weg zum Dr. scient. med. bei der Leiterin der *Doctoral School for Lifestyle-Related Diseases* [LIFEMED], Frau Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Sandra Wallner-Liebmann.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Betreuer, Ao.Univ.-Prof. DDr. Erwin Petek, für die Vergabe des Themas und die Unterstützung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation den Dank aussprechen.

## **Kurzfassung**

Autismus oder Autismus-Spektrum-Störungen (Autism Spectrum Disorders, ASD) sind eine schwere, bereits im Kindesalter auftretende Entwicklungsstörung, gekennzeichnet durch eine gestörte Sprachentwicklung, periodisch wiederkehrende Verhaltensweisen und einen Mangel an sozialer Interaktion.

Ein genetischer Einfluss auf das Krankheitsbild des Autismus ist durch mehrere unabhängige Zwillingsstudien bereits erwiesen (Le Couteur et al., 1996; Ronald et al., 2010), der Vererbungsmodus jedoch noch unklar. Eine Vererbung, die nicht den Mendelschen Regeln folgt scheint zuzutreffen. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass einzelne zum Phänotyp beitragenden Faktoren nach Mendels Regeln vererbt werden. Auch konnte bereits in einzelnen Familien ein monogener Erbgang bestätigt werden (Chiocchetti et al., 2011).

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurden 245 Personen aus dem Einzugsgebiet der Steiermark rekrutiert und ihre DNA isoliert. Mit der DNA der AutismuspatientInnen wurde eine Affymetrix Genome-Wide human SNP Microarray-CGH 6.0 durchgeführt und damit das Gesamtgenom auf Zugewinne und Verluste (Copy Number Variations, CNVs) gescreent. Veränderungen der Kopienanzahl in gewählten Bereichen des Genoms wurden mittels Real-Time PCR (qRT-PCR) validiert, auf ihr Vorkommen in der DNA der Eltern überprüft, und bei bestätigten familiären CNVs folgend eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hergestellt. Ein Genbereich innerhalb einer CNV wurde mittels qRT-PCR validiert, wenn Veränderungen im jeweiligen Gen bereits in anderen PatientInnen mit einer Autismus-Spektrum-Störung assoziiert waren, wenn Assoziationsstudien bzw. Linkage-Analysen oder Bruchpunkte struktureller Chromosomenanomalien auf die jeweilige genomische Region hinwiesen (positionelles Kandidatengen), oder wenn Genbereiche für Proteine codierten, die ihre Funktion in neurogenen Geweben wie Gehirn, Rückenmark, Neuronen, Synapsen oder Transmittern erfüllten (funktionelles Kandidatengen).

16 CNV-Bereiche, die Gene enthielten, welche den oben erwähnten Kriterien entsprachen, wurden durch die Array-CGH detektiert und im Anschluss daran auf ihre Validität geprüft. Die Zugewinne und Verluste konnten bei 15 der gewählten 16 Gene durch die Anwendung der qRT-PCR bestätigt werden. Eine kausale Vererbung hinsichtlich Genomveränderung ist bei 7 der 16 CNVs sehr wahrscheinlich.

## **Abstract**

Autism or Autism-Spectrum-disorders (ASD) is a range of neurodevelopment disorders starting in early childhood, characterized by impairments in communication and reciprocal social interaction, and the presence of restricted and repetitive patterns of behaviour.

The contribution of genetic factors to autism is well established by twin studies (Le Couteur et al., 1996; Ronald et al., 2010), but the kind of genetic transmission is unclear. However, the factor that ASD is a complex non-Mendelian disorder is apparent in most cases (Chicchetti et al., 2011).

For the current research work we recruited 245 people from Styria and isolated DNA from their blood samples. The DNA of the ASD-patients was used to complete an Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH to screen for Copy Number Variations (CNVs) in their genomes. After prescreening our samples with the Array-CGH method, the application of quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) was used to validate CNVs in genes of interest. Furthermore we used the qRT-PCR to determine their presence in the DNA-samples from the parents of the ASD-patients.

A gene in a CNV-area was validated if there has previously been a linkage to this gene with ASD earlier in other studies or if the proteins of the included genes showed their function in neural tissue as brain, spinal cord, neurons, synapses or transmitter (functional gene).

16 CNV-areas which were detected by Array-CGH SNP 6.0, included genes that displayed our inclusion criteria. The subsequent qRT-PCR-Validation showed positive results for 15 of these genes. Inheritance from one of the parents of the patients is likely in 7 out of our 16 cases.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Autismus, Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) .....	1
1.2 Diagnostik der Autismus-Spektrum-Störungen .....	3
1.3 Wissenschaftlicher Stand .....	3
1.4 Genetik der Autismus-Spektrum-Störungen (ASD).....	6
<b>2. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Rekrutierung und Einstufung der PatientInnen .....	15
3.1.1 Diagnostische Beobachtungsskala, ADOS .....	15
3.1.2 Diagnostisches Interview für Autismus – revidiert, ADI-R .....	16
3.2 DNA-Isolierung.....	18
3.2.1 Verwendete Materialien .....	18
3.2.2 Methodischer Ablauf.....	19
3.3 Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH .....	21
3.3.1 Verwendete Materialien .....	21
3.3.2 Methodischer Ablauf.....	22
3.4 Real Time – PCR.....	37
3.4.1 Verwendete Materialien .....	38
3.4.2 Methodischer Ablauf.....	38
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
4.1 DNA-Isolierung.....	40

4.2 Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH .....	42
4.3 dChip-Software-Analyse des X-Chromosoms .....	49
4.4 Literaturrecherche hinsichtlich der in CNVs vorkommenden Gene .....	50
4.4 Quantitative Real-Time PCR .....	52
4.4.1 Validierung der Array-CGH-Ergebnisse mittel qRT-PCR.....	54
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Autismus, Autismus-Spektrum-Störungen (ASD)

Autistische Störungen sind eine Gruppe von psychischen Störungen, die zum einen durch eine Minderung der sozialen Interaktion und Kommunikation, zum anderen durch periodisch wiederkehrende stereotype Verhaltensmuster, Interessen und Aktivitäten gekennzeichnet sind. Die Prävalenz der ASD wird mit 6 – 7 pro 1000 geschätzt (Bryson et al., 2008). Das Geschlechterverhältnis m:f wurde in den vergangenen Jahren mit 4:1 angegeben. Neuere Studien zeigen jedoch einen weit größeren Geschlechterunterschied mit 7 bis 8:1 (Whiteley, 2010).

Anhand von überlieferten Berichten sogenannter Wolfskinder wie Kasper Hauser im Jahre 1828 in Nürnberg (Der Spiegel, 1996), die dem Autismus sehr ähnliche Besonderheiten aufwiesen, geht man davon aus, dass es das Phänomen des Autismus schon lange vor der medizinischen Definition gab.

Im Jahre 1911 wurde erstmals der Begriff Autismus vom Schweizer Psychiater Eugen Bleuler in seiner „Dementia Praecox oder Gruppe der Schizophrenien“ verwendet. Er verstand darunter die Loslösung von der Wirklichkeit und den damit verbundenen Rückzug in eine eigene Welt. Schizophrene Menschen, die eine extreme Selbstbezogenheit und einen starken sozialen Rückzug aufwiesen wurden damals als autistisch bezeichnet. Auch der Kinderarzt Hans Asperger aus Wien und der in die USA emigrierte Psychiater Leo Kanner griffen den Begriff des Autismus auf und beschrieben unabhängig voneinander das Krankheitsbild. Dabei unterschieden sie die Schizophrenie als ein Bild, bei dem sich ein Mensch aktiv in sich selbst zurückzieht von dem des Autismus, in welchem der Mensch von Geburt an in innerer Zurückgezogenheit lebt.

Das Kanner-Syndrom, oder auch frühkindlicher Autismus genannt, ist durch Leo Kanner definiert und wurde zur Zeit seiner Beschreibung international anerkannt (Kanner, 1943). Anders bei Hans Asperger (1938), dessen Erkenntnisse zum Autismus, die von ihm genannte autistische Psychopathie, in

der Wissenschaft anfangs kaum wahrgenommen wurde. Lorna Wing, eine englische Psychiaterin, griff Hans Aspergers Forschungsergebnisse zu Beginn der 80er Jahre erneut auf und bezeichnete das Syndrom als Asperger-Syndrom (Wing, 1981). Erst zu Beginn der 90er Jahre erlangten die Forschungsergebnisse Aspergers Anerkennung in den Fachkreisen.

Wissenschaftler fassen heute Autismus, Asperger Syndrom und tiefgreifende Entwicklungsstörungen (PDD-NOS pervasive developmental disorder – not otherwise specified) häufig als eine Störung zusammen, deren Unterscheidung hauptsächlich in der Schwere des Krankheitsbildes zu finden ist (Freitag et al., 2010).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO World Health Organisation) unterteilt in ihrer Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) tiefgreifende Entwicklungsstörungen in

- den frühkindlichen Autismus
- den atypischen Autismus
- das Asperger Syndrom
- das Rett-Syndrom
- sonstige desintegrative Störungen des Kindesalters
- überaktive Störungen mit Intelligenzminderung und Bewegungsstereotypien und
- sonstige nicht näher bezeichnete tiefgreifende Entwicklungsstörungen.

Es werden zusätzlich die Beeinträchtigungen in qualitative Beeinträchtigungen der sozialen Gegenseitigkeit, qualitative Beeinträchtigung der Kommunikation und Sprache, eingeschränkte Interessen und stereotype Verhaltensmuster unterteilt (ICD-10 Version:2010).

## 1.2 Diagnostik der Autismus-Spektrum-Störungen

Der Goldstandard in der heutigen Autismus-Diagnostik ist durch 2 miteinander verknüpfte Untersuchungen definiert, der Beobachtungsskala für autistische Störungen (ADOS) und dem diagnostischen Interview – revidiert (ADI-R) (Bölte, 2005).

## 1.3 Wissenschaftlicher Stand

Die *National Autistic Society* gibt auf ihrer Website 4 grundlegende Fragestellungen in der Autismusforschung an:

- was kann Autismus auslösen und wie kann man das Wissen darüber nutzen, um den Familien mit autistischen Angehörigen das Leben zu erleichtern?
- welche Charakteristika von Autismus, sind zugänglich und behandelbar ?
- wie kann man die Krankheit früher erkennen und diagnostizieren?
- wie kann man die Veränderungen des Autismus im Verlauf des Lebens besser detektieren und rechtzeitig passende Behandlungswege einschlagen?

Sehr viele Menschen mit autistischen Angehörigen sind weltweit mittels Internet im ständigen Erfahrungsaustausch und die Vernetzung national und international, zwischen Eltern und auch Wissenschaftlern, ist flächendeckend über den ganzen Globus verteilt. Viele Vereine und Gesellschaften haben sich gebildet, die es sich zum Ziel gemacht haben Stiftungen zu gründen, für Forschungsgelder zu werben, betroffene Familien zum Gedankenaustausch zusammenzuführen und Informationen ja sogar frühe selbstdiagnostische Ansätze, bereitzustellen (Autism Society, Autistic Society, The National Autistic Society, Autismus Deutschland, Autistenhilfe-Dachverband Österreich, Verein Libelle - Zentrum für Autismus Steiermark etc.).

Die *Autismus Society* schreibt auf Ihrer Website über die möglichen Gründe für Autismus, dass kein alleiniger Grund für das autistische Krankheitsbild bekannt ist, aber es sei bekannt dass bei den Menschen mit Autismus-Spektrum-Störungen Anomalitäten der Gehirnstruktur bzw. -funktion auftreten. Gehirn Scans haben Unterschiede in der Form und Struktur bei autistischen Kindern im Vergleich zu neuro-typischen Kindern gezeigt.

Wissenschaftler forschen in verschiedene Richtungen und bieten eine Vielzahl an Theorien im Bereich Vererbung, aber auch psychologische, psychosoziale und medizinische Ansätze, die für das autistische Krankheitsbild relevant sein könnten.

Autismus tritt häufiger in Verbindung mit anderen medizinischen Konditionen, wie Fragilem X Syndrom, Tuberosklerose, angeborenem Rubella Syndrom und unbehandelter Phenylketonurie auf (Moss et al., 2009; Steiner et al., 2007). In der Literatur findet man jedoch auch Beschreibung von Co-Morbiditäten mit anderen neuropsychiatrischen Störungen, wie dem Tourette Syndrom oder dem ADHS (Fernandez et al., 2011; Lionel et al., 2011).

Auch toxische Substanzen, die während der Schwangerschaft von der Mutter konsumiert werden, sind mit einer erhöhten Krankheitswahrscheinlichkeit beim Neugeborenen assoziiert.

Die Wissenschaft deutet klar darauf hin, dass andere Faktoren wie Umweltgifte (z.B.: Schwermetalle, wie Quecksilber) neben dem genetischen Einfluss einen in manchen Einzelfällen bedeutenden Anteil am Ursachenmosaik dieser heterogenen, multifaktoriellen Erkrankung ausmachen (D. Geier et al., 2010). Menschen mit Autismus-Spektrum-Störungen könnten auf solche Umweltgifte anfälliger reagieren, diese schlechter verstoffwechseln und entgiften als andere Menschen.

So breit das Spektrum der Ursachen für Autismus ist, so viele verschiedene Therapieansätze werden angeboten. Für das jeweilige Entwicklungsprofil des einzelnen Patienten wird ein Plan für die Behandlung erstellt, in dem auf einzelne Symptome fokussiert wird und die unterschiedlichen Behandlungsformen aufeinander abgestimmt werden. Im Kinder- und Jugendalter wird das ganze Umfeld (Schule, Familie etc.) in den Plan mit

einbezogen (Poustka, 2004). Die Website der *National Autistic Society* unterteilt in

- Verhaltensinterventionen (Interventionen, die entwickelt wurden, um das Verhalten des Menschen zu verändern)
- Ergänzungstherapien (z.B.: ergänzende Therapie mit Hunden oder Delphinen)
- Diäten und Nahrungsergänzungen (z.B.: bestimmte Vitamine)
- Medizinische Interventionen (Behandlung mit verschriebenen Medikamenten und anderen medizinischen Methoden)
- Physiologische Behandlungswege (Interventionen, basierend auf der Veränderung der mechanischen, physischen und biochemischen Funktion des Körpers)
- Auf Beziehungen gestützte Interventionen (Behandlungswege, die Festigung und Bindungen zu Bezugspersonen fördern)
- Auf Service basierende Interventionen (Verfügbarkeit von Services, beinhaltend die Erziehung und Unterstützung der Eltern)
- Auf Fähigkeiten und Fertigkeiten basierende Interventionen (Behandlungen die darauf abzielen, spezielle Fähigkeiten zu entwickeln und zu erhalten)
- Standard Therapien (entsprechen Therapien, die im Standard-Gesundheitswesen angewandt werden) und
- Technologien (Therapieanwendungen, die auf speziellen Technologien gründen).

Die *American Autism Society* führt zusätzlich als wichtige Therapieformen für Kinder an:

- die sensorisch-integrative Therapie
- die Wilbarger Deep Pressure Technik
- die auditorisch-integrative Therapie und
- die sensorische Therapie.

## 1.4 Genetik der Autismus-Spektrum-Störungen (ASD)

Das Gesamtgenom des Menschen, das aus etwa 3 gb (Gigabasen) besteht, ist auf die Chromosomen im Zellkern und zu einem sehr geringen Teil auf die Mitochondrien verteilt.

Es umfasst ca. 25.000 Gene, die die Informationen über Funktion und Struktur aller Zellen tragen.

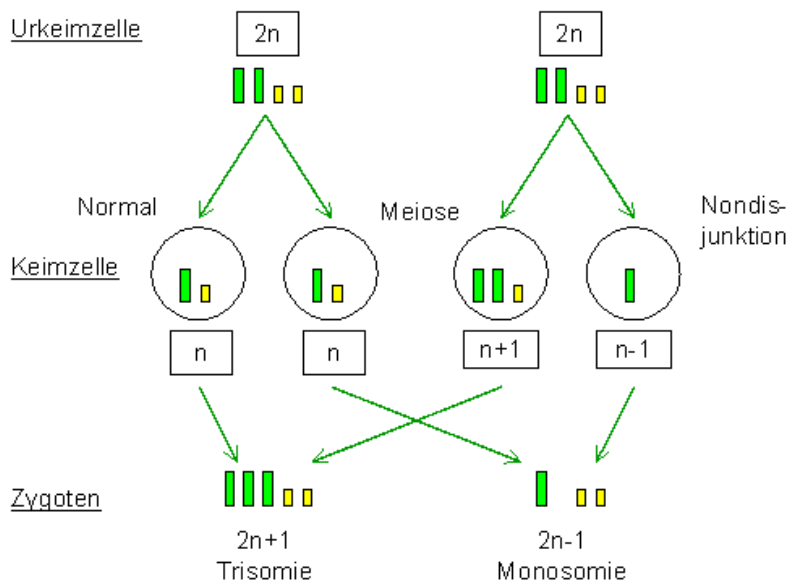
Bei den Veränderungen der Chromosomenstruktur durch Austausch, Verdoppelung oder Verlust von Chromosomen- oder Chromatidstücken, wird zwischen den strukturellen und den numerischen Chromosomenaberrationen unterschieden.

### **Numerische Chromosomenaberrationen**

Die numerische Chromosomenaberration oder auch Genommutation ist gekennzeichnet durch eine nicht erblich bedingte Chromosomenzahlveränderung. Das doppelte Auftreten oder Fehlen von ganzen Chromosomen entsteht dabei durch eine Fehlverteilung der homologen Chromosomen während der Meiose. Die diploide menschliche Körperzelle enthält gesamt 46 Chromosomen, von denen 44 Autosomen und 2 Gonosomen sind. Sie befindet sich im euploiden Zustand.

Bei polyploiden Zellen tritt ein Vielfaches der Gesamtchromosomenzahl auf. Von Aneuploidie spricht man, wenn kein vielfaches des haploiden (einfachen) Chromosomensatzes vorhanden ist. Dies kann der Fall sein, wenn es zu einer fehlerhaften Trennung der homologen Chromosomen während der Meiose kommt.

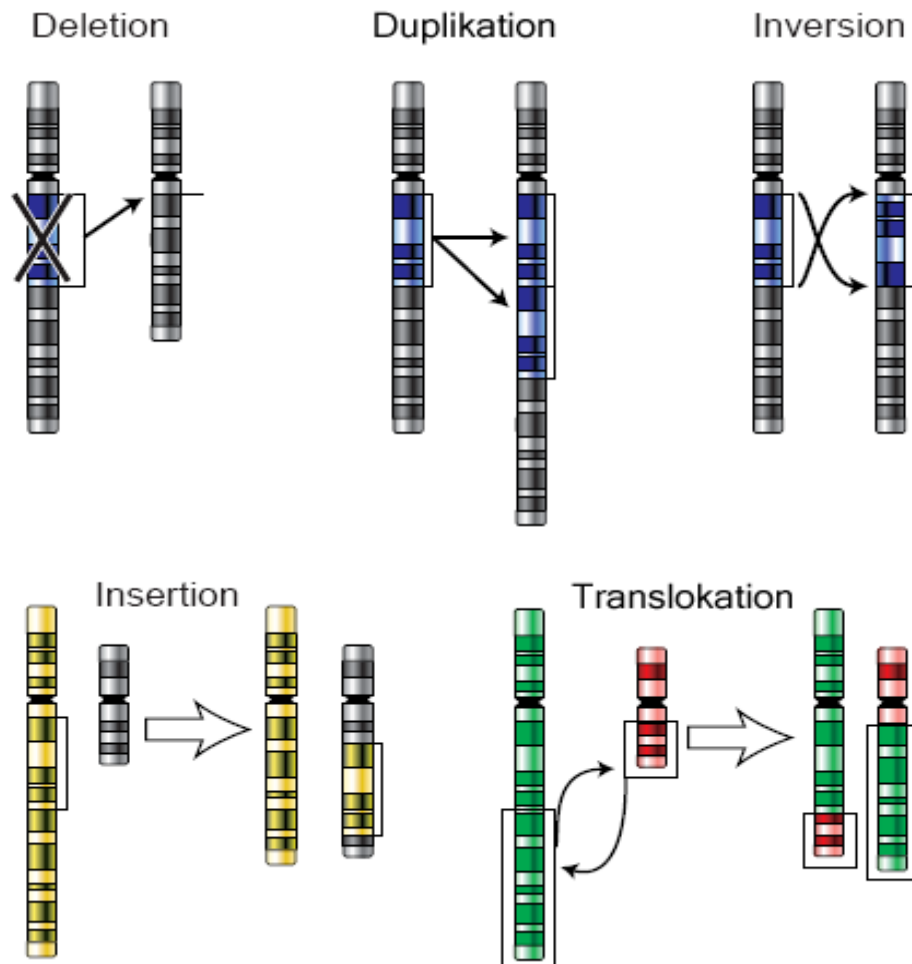
## Zygoten



**Abbildung 1:** Numerische Chromosomenaberrationen: Entstehung von Trisomie und Monosomie aufgrund von Non-Disjunktion in der Meiose; entnommen aus: Klinische Strahlenbiologie, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1990

### Strukturelle Chromosomenaberrationen

Die strukturelle Chromosomenaberration kommt durch ein Verlieren von Chromosomenstücken in Form von Abbrüchen oder funktionell durch fehlerhaftes Zusammenfügen von Chromosomenmaterial zustande. Auslöser sind Einzel- oder Doppelstrangbrüche. Translokationen (ein Austausch von Chromosomenabschnitten im gleichen oder zwischen verschiedenen Chromosomen), Deletionen (Verlust eines Chromosomenstückes), Duplikationen (Verdoppelung von Chromosomenteilen) und Inversionen (Inverser Einbau eines Chromosomenstückes) werden unterschieden (Hennig, 2002).



**Abbildung 2:** Strukturelle Chromosomenaberrationen: Deletion, Duplikation, Inversion, Insertion, Translokation; entnommen aus: <http://biosiva.50webs.org>

Einige strukturelle Chromosomenaberrationen wurden in den vergangenen Jahren im Genom von PatientInnen mit autistischem Krankheitsbild festgestellt und die Möglichkeit des Einflusses von Genen in den Bruch-, Deletions- oder Duplikationsbereichen diskutiert (Borg et al., 2002; Kroisel et al., 2004).

Einen bis vor kurzem unterschätzten Anteil an der Variation des Genoms haben DNA-Kopienvarianten (Copy Number Variations, CNVs), die einen Verlust oder Zugewinn von genomischer DNA darstellen und bis zu mehreren Megabasen lang sein können. Viele CNVs unterschiedlicher Größe sind bereits kartiert. Durch neuere hochauflösende genetische Techniken wie der Array-CGH oder

dem Next-Generation Sequencing, kommt es zu einer raschen Zunahme an neu gefundenen CNVs (Cook & Scherer, 2008).

### Exome Sequencing

Die Sequenzierung eines Gesamtgenoms mittels herkömmlicher Sequenzierungsmethoden, wie dem Sanger Sequencing, ist aufgrund von zu hohem Zeitaufwand und Kosten durch neuere Methoden wie dem Next-Generation-Sequencing abgelöst worden.

Das Exome Sequencing ist eine Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode, bei der alle codierenden Regionen des Genoms eines Individuums sequenziert werden. Sie stellt eine gute Alternative zum Whole-Genome-Sequencing dar, bei der das Gesamtgenom, d.h. sowohl exonische als auch intronische Bereiche der DNA, sequenziert werden (Ng et al., 2010). Der Anteil an codierenden Sequenzen im Genom des Menschen beläuft sich auf etwa 1% des Gesamtgenoms. Man geht davon aus, dass etwa 85% der krankheitsverursachenden Veränderungen im Genom in den proteincodierenden Bereichen zu finden sind. Das Ziel ist es, sowohl nach Mendel vererbte, als auch nicht mendelisch vererbte Krankheitsursachen zu erkennen (Choi et al., 2009).

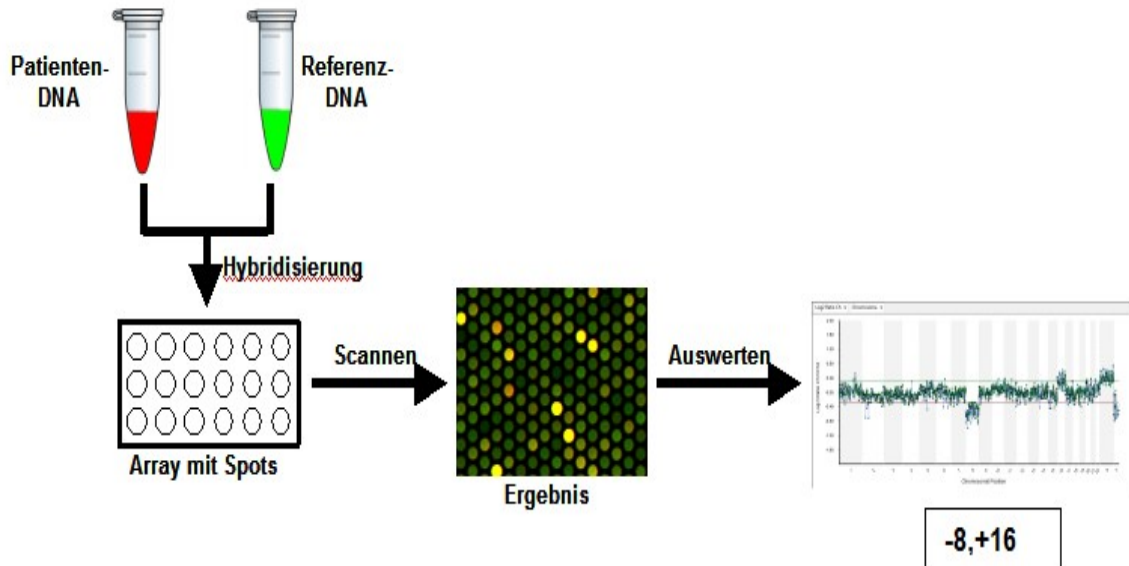
### Array CGH

Die Array CGH ist eine Form der vergleichenden genomischen Hybridisierung. Die Hybridisierung findet dabei auf einem sogenannten Microarray statt. Die genomische Ziel-DNA liegt nicht wie etwa bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Metaphasen-Chromosomen vor, sondern als viele kleine Fragmente definierter Größe, die in einem Koordinatensystem auf einer Glasfläche fixiert sind.

Dieses Verfahren bietet im Vergleich zur FISH die Möglichkeit sehr viel kleinere Chromosomenaberrationen von < 100 Kilobasen zu erkennen.

Dabei vergleicht man jeweils die Test-DNA mit der Referenz-DNA. Durch Farbcodes, im Regelfall grün und rot, wird ein Zugewinn oder Verlust an DNA angezeigt und dieser im Anschluss durch Berechnungssysteme (Algorithmen) bioinformatisch detektiert.

Somit kann die Test- und Referenz-DNA auf Amplifikationen und Deletionen gescreent werden (Murken et al., 2006).



**Abbildung 3:** Vereinfachte schematische Darstellung der Array Comparative Genomic Hybridization (Array-CHG)-Methode; entnommen aus: <http://www.reprogenetics-hh.de>

Wie bei vielen anderen Erkrankungen wurde auch beim Krankheitsbild der ASD ein genetischer Einfluss diskutiert. Seit Veröffentlichung von Zwillingsstudien (Le Couteur et al., 1996) scheint ein genetischer Beitrag zum autistischen Phänotyp unabwendbar. Man weiß bereits, dass es sich um einen nicht-mendelischen Vererbungsmodus handelt und geht von einer oligogenen bzw. polygenen Erkrankung aus (Gillis & Rouleau, 2011). Das heißt, dass das Krankheitsbild nicht nur durch eine genetische Veränderung an einem Gen ausgelöst wird, sondern mehreren Veränderungen in unterschiedlichen Genbereichen zugrunde liegt. Außerdem handelt es sich beim Autismus um eine genetisch heterogene Erkrankung. Wenn unterschiedliche Gene in verschiedenen Patienten mit demselben Krankheitsbild Veränderungen, die das Krankheitsbild verursachen aufweisen, spricht man von einer genetisch heterogenen Erkrankung (Geschwind, 2011). Hohe Überschneidungsraten in den Chromosomenveränderungen der Patienten sind häufig.

Autismus-Spektrum-Störungen sind also komplexe, heterogene Erkrankungen die sowohl durch Umwelteinflüsse als auch genetisch determiniert sind.

In der Autismusforschung wurden anfangs aufgrund der großartigen Erfolge bei monogenen Erkrankungen, Linkage-Studien durchgeführt, die bereits Regionen auf Chromosomen, wie zum Beispiel 7q, 16p (Ashley-Koch et al., 1999; Bradford et al., 2001) aufgezeigt haben. Jedoch konnten Gene in diesen Bereichen bis jetzt noch nicht mit Sicherheit dem Autismus zugeordnet werden. Da es sich bei ASD, wie oben erwähnt, um eine genetisch heterogene Erkrankung handelt, sind der Linkage- Analyse Grenzen gesetzt.

Die Unterschiede in der Anzahl von Kopien (CNVs) gewisser DNA-Abschnitte, wurden im Verlauf der letzten Jahre zum neuen fortschrittlichen Marker für genetische Krankheitsursachen.

Man hat festgestellt, dass es im Genom von Organismen Unterschiede in der Anzahl von Kopien (Copy Number Variations, CNVs) gewisser DNA-Abschnitte gibt, die sich phänotypverändernd auswirken können (Redon et al., 2006). Einflüsse von CNVs zum Krankheitsbild neuropsychiatrischer Erkrankungen sind bekannt (Lionel et al., 2011; Morrow, 2011).

Durch die Anwendung der Array-CGH (array comparative genomic hybridization) wurde es möglich, Zugewinne (Duplikationen) oder Verluste (Deletionen), die sich über mehr als 1000 Basenpaare erstrecken im Gesamtgenom zu detektieren. Eine Zunahme an nicht vererbten Änderungen der Kopien-Anzahl von DNA-Abschnitten im Genom, sogenannter *de novo* CNVs, wurde bereits in Studien (Jacquemont et al., 2006; Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2010; Xu et al., 2008) als krankheitsbeitragend zu ASD vorgeschlagen.

Eine Auflistung von Genen, die in vergangenen Jahren bereits mit Autismus assoziiert wurden, ist in Tabelle 1 angeführt (Sutcliffe, 2008).

**Tabelle 1:** Mutmaßliche und bekannte mit Autismus assoziierte Gene, (Sutcliffe, 2008)

PUTATIVE AND KNOWN AUTISM RELATED GENES (Sutcliffe, 2008)	
<b>Glutamatergic synapse function and/or neuronal cell adhesion</b>	
FMR1	Fragile X mental retardation 1
NLGN3	Neurologin 3
NLGN4	Neurologin 4
NRXN1	Neurexin 1
SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
CNTNAP2	Contactin-associated protein-like 2
<b>PCDH10</b>	<b>Protocadherin 10</b>
<b>CNTN3</b>	<b>Contactin 3</b>
<b>Endosomal Trafficking</b>	
<b>NHE9 (SLC9A9)</b>	<b>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 9</b>
NHE6 (SLC9A6)	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger isoform &
<b>DIA1 (c3orf58)</b>	<b>Deleted in Autism 1</b>
A2BP1	Ataxin 2-binding protein 1
<b>Neuronal activity regulation</b>	
FMR1	Fragile X mental retardation 1
MECP 2	Methyl CpG binding protein 2
<b>DIA1 (c3orf58)</b>	<b>Deleted in Autism 1</b>
<b>PCDH10</b>	<b>Protocadherin 10</b>
<b>NHE9 (SLC9A9)</b>	<b>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 9</b>
A2BP1	Ataxin 2-binding protein 1
UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
<b>Implicated in related disorders</b>	
FMR1	Fragile X mental retardation
MECP2	Methyl CpG binding protein
NHE6 (SLC9A6)	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger isoform 6
A2BP1	Ataxin 2-binding protein 1
UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
<b>Other functions</b>	

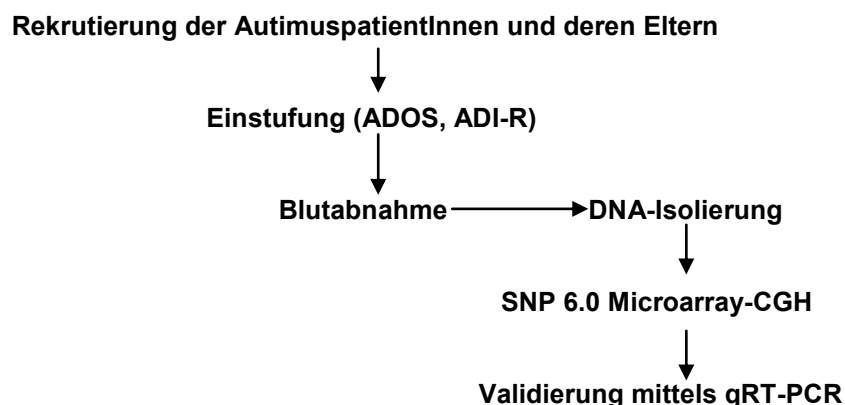
EN2	Engrailed homeobox 2
SLC6A4	Serotonin transporter (SERT, 5-HTT)
MET	Met proto-oncogene (c-Met, HGFR)
<b>SCN7A</b>	<b>Na<sup>+</sup> channel, voltage-gated, type VII</b>
<b>RNF8</b>	<b>Ring finger protein 8</b>

## 2. Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass dem Phänotyp der Autismus-Spektrum-Störungen nicht nur Umwelt-, sondern auch genetische Faktoren zu Grunde liegen (Le Couteur et al., 1996; Holt et al., 2011). Außerdem weiß man, dass das Krankheitsbild des Autismus keine monogene Erkrankung ist, sondern durch polygene Veränderungen ausgelöst wird, die nicht nach den drei von Mendel postulierten Regeln vererbt sind.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Copy Number Variations (CNVs), die Einfluss auf das Krankheitsbild der Autismus-Spektrum-Störungen haben.

Dazu wurden 245 Personen aus der Steiermark rekrutiert und es erfolgte eine Einstufung und Testung mittels ADOS und ADI-R durch PsychologInnen des „Verein Libelle – Zentrum für Autismus Steiermark“ bzw. durch einen Psychiater der Universitätsklinik der Medizinischen Universität Graz. Anschließend wurden Blutproben von den PatientInnen und deren Eltern abgenommen, die DNA isoliert und eine „Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH“ durchgeführt. Die Ergebnisse wurden danach auf ihre Relevanz geprüft und ausgewählte CNV-Bereiche mittels Real-Time PCR validiert. Außerdem wurde geprüft, ob die Bereiche vererbt waren, also auch bei einem Elternteil vorkamen oder *de novo* – neu entstanden sind.



**Abbildung 4:** Work Flow-Chart

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Rekrutierung und Einstufung der PatientInnen**

Nach dem erfolgten positiven Ethikvotum der Medizinischen Universität Graz für die vorliegende Untersuchung, wurden im Verlauf von drei Jahren 245 PatientInnen aus dem Einzugsgebiet der Steiermark für das Projekt rekrutiert. Mittels der 3 Rekrutierungsschienen, Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz, Verein Libelle – Zentrum für Autismus Steiermark und Kinderklinik der Universitätsklinik Graz, wurde der PatientInnenkontakt bzw. Kontakt zu deren Familien hergestellt und darauffolgend die Einverständniserklärungen für die Teilnahme an der Studie eingeholt. Die Einstufung der AutismuspatientInnen erfolgte durch PsychologInnen des Vereins Libelle – Zentrum für Autismus Steiermark.

Für die diagnostische Einstufung der AutismuspatientInnen wurden die Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS) und das Diagnostische Interview für Autismus – revidiert (ADI-R) angewendet.

#### **3.1.1 Diagnostische Beobachtungsskala, ADOS**

Bei der diagnostischen Beobachtungsskala gibt es unterschiedliche Module, die jeweils dem Stand des Sprachniveaus eines Menschen im jeweiligen Alter angepasst sind. Diese beginnt im Kleinkindalter im Modul 1, wo man von einzelnen Worten oder auch vorsprachlichen Lauten ausgeht, geht dann über das Sprechen in ganzen Sätzen in Modul 2 bis zu fließenden Sprechen bei Kindern und Jugendlichen in Modul 3 bis Modul 4, wobei bei Jugendlichen und Erwachsenen ein Interview mit der Person vorausgesetzt wird. ADOS dient als klinisches Beobachtungsinstrument und wird parallel zum ADI-R angewandt. Anwendbar ist die diagnostische Beobachtungsskala ab dem 2.Lebensjahr, wobei die Dauer der Durchführung zwischen 30 bis 90 Minuten variieren kann (Lord et al., 2000).

### 3.1.2 Diagnostisches Interview für Autismus – revidiert, ADI-R

Das „Diagnostische Interview – revidiert“ ist ein untersuchungsbegleitetes Interview und kann zwischen 2 und 4 Stunden dauern. Die Durchführung findet mit der Bezugsperson, die dem Kind am nächsten steht, statt. Hierbei geht es um die Umsetzung der diagnostischen Kriterien nach ICD-10 (Internationale Klassifikation der Krankheiten 10. Revision) und DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders der American Psychiatric Association).

Beim Interview handelt es sich um Fragen über Kind und Familiensituation, über die frühe Entwicklungsgeschichte, den Erwerb und Verlust von Kompetenzen, über autismspezifische Verhaltensweisen (Sprache, Kommunikation, Spielverhalten, Interessen, repetitives Verhalten). Ein Großteil der Fragen bezieht sich auf das Alter von 4 – 5 Jahren, da zu dieser Zeit die Symptome des Autismus meist am massivsten ausgeprägt sind (Lord et al., 1994).

Nach der Feststellung, dass der Patient/die Patientin die Symptome des Autismus aufweist, erfolgte eine Einstufung hinsichtlich der Ausprägungsform des Autismus. Die ICD-10 unterteilt die tiefgreifenden Entwicklungsstörungen in 7 Einheiten, wovon 3 dem Autismus zugeordnet sind (ICD-10 Version:2010).

- Den frühkindlichen Autismus
- Den Atypischen Autismus
- Das Asperger-Syndrom
- Das Rett-Syndrom
- Sonstige desintegrative Störungen des Kindesalters
- Überaktive Störungen mit Intelligenzminderung und Bewegungsstereotypien
- Sonstige nicht näher bezeichnete tiefgreifende Entwicklungsstörungen

Bei Vergleich der unterschiedlichen Formen der Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) kann laut *„Multitaxialem Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO“* in Bezug auf das Alter des Erstauftretens, die Symptomatik, die Sprache, die motorischen Fertigkeiten,

die Intelligenz und das Geschlechterverhältnis unterschieden werden (Remschmidt et al., 2008).

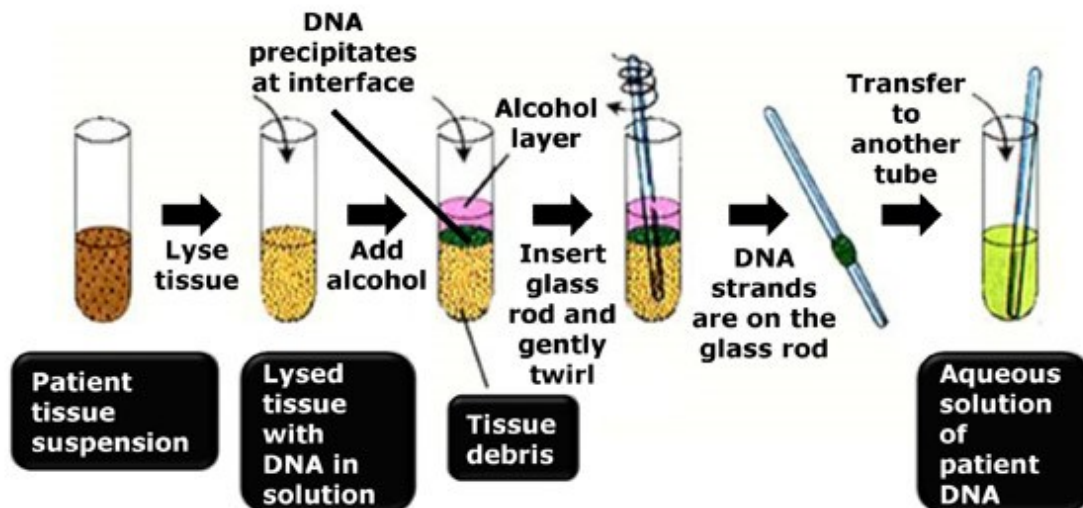
Beim frühkindlichen Autismus ist die Manifestation der Symptome bereits vor Erreichen des 4. Lebensjahres erkennbar. Die typische Symptomatik ist durch einen Mangel an sozialer Interaktion, einer auffallenden Kommunikation, repetitiven Verhaltensweisen und einem Fehlen des symbolischen Spiels definiert. Die Intelligenz der PatientInnen mit frühkindlichem Autismus ist beeinträchtigt, motorisch sind jedoch keine Auffälligkeiten erkennbar.

Der atypische Autismus kann sich in jeder Altersstufe erstmals manifestieren. Die Symptomatik entspricht der des frühkindlichen Autismus, kann aber unvollständig vorkommen. Häufig hat der Patient mit atypischem Autismus eine geistige Behinderung. In Bezug auf motorische Fähigkeiten gibt es jedoch keine typischen Einschränkungen. Das Geschlechterverhältnis wird beim frühkindlichen und atypischen Autismus männlich : weiblich jeweils mit 3 : 1 angegeben.

PatientInnen mit Asperger-Syndrom zeigen erste autistische Anzeichen erst ab dem 4. Lebensjahr. Typische Symptome sind ein Mangel an sozialer Interaktion und stereotype Interessen. Die Sprachentwicklung ist normal, die PatientInnen neigen eher zu einem förmlichen Sprachstil und weisen eine auffallende Sprachmelodie auf. Die Intelligenz ist nicht beeinträchtigt, doch findet man Ungeschicklichkeit in der Motorik und Koordinationsstörungen. Das Geschlechterverhältnis männlich : weiblich beim Asperger-Syndrom ist mit 8 : 1 angegeben. Es ist die häufigste Form der Autismus-Spektrum-Störungen weltweit (Remschmidt et al., 2008).

## 3.2 DNA-Isolierung

Von den rekrutierten Personen wurde im Anschluss eine Blutprobe entnommen und die Lymphozyten-DNA von Biomedizinischen Analytikern des Instituts für Humangenetik isoliert.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der DNA-Isolierung: Die DNA-Isolierung dient dem Sammeln der DNA von Geweben oder Körperflüssigkeiten, um für anschließende molekularbiologische und forensische Anwendungen in adäquater Form zur Verfügung zu stehen; entnommen aus: <http://dna-rna.net>

### 3.2.1 Verwendete Materialien

- 10 ml Vollblut
- Pipettensatz
- Spitzen (Barrier Tips)
- Handschuhe
- Greiner Röhrchen
- Lysepuffer
- Kühlschrank

- 1x SE-Puffer
- 20% SDS-Solution
- Proteinase K-Solution
- Brutschrank
- Vortexer
- 6M NaCl-Lösung
- Nukleasefreies Wasser
- Zentrifuge für Greiner Röhrchen
- ETOH absolut
- Bunsenbrenner
- Pasteurpipette
- 1xTE-Puffer
- Steriles Cryo-Tube

### 3.2.2 Methodischer Ablauf

- die Blutprobe in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführen
- mit 3-5 fachem Volumen an Lysepuffer überschichten und das Röhrchen schwenken
- das Röhrchen für ca. 45 min auf Eis stellen zum Lysieren (das Platzen der roten Blutkörperchen ist das Ziel)
- danach für 20 min mit 1300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren
- den Überstand verwerfen
- das Pellet (die Leukozyten) im Röhrchen in 20ml Lysepuffer lösen = Waschschrift
- und abermals für 20 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
- Röhrchen danach vorsichtig ausleeren, Restflüssigkeit abpipettieren, Leukozytenpellet bleibt am Grund des Röhrchens

## Ansetzen des „Verdau“:

- 5 ml 1xSE (Saline EDTA-Puffer) für 10ml an Blut Ausgangsvolumen
- 250 µl 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) beifügen
- 25 µl Proteinkinase K beimengen
- und danach bei 37° Celsius im Brutschrank über Nacht verdauen lassen

## Am darauffolgenden Tag:

- 1,4 ml 6-molare NaCl-Lösung zum Verdau dazugeben (der Ansatz ist für ein Endvolumen von 5ml)
- die Probe mittels Vortexer kurz mischen
- für 30 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
- Überstand danach in ein steriles 50 ml Greiner Röhrchen überführen (Zelltrümmer bleiben zurück und werden verworfen)
- mit 3-5 fachem Volumen ETHO Absolut (Ethanol) überschichten (abhängig vom Volumen des Überstandes, bei 5 ml Lösung auf 25 ml im Greiner Röhrchen auffüllen)
- DNA fällt als weißes Knäuel aus
- mit Hilfe einer steril gebogenen Pasteurpipette DNA aus dem Röhrchen nehmen und kurz in ETHO 70% tauchen = Waschschrift
- DNA auf der Pasteurpipette an der Luft für ca. 10 min trocknen lassen (DNA wird farblos)
- In ein steriles Cryo-Tube 1xTE (Tris-ETDA) vorlegen (je nach Pelletgröße 500 µl -1000 µl) und die DNA durch leichtes Bewegen der Pasteurpipette darin lösen

Die isolierte DNA wird kurzfristig im Kühlschrank und langfristig im Gefrierschrank gelagert.

### 3.3 Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH

Genotypisierung der PatientInnen-Proben mittels Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH um Zugewinne und Verluste im Genom – CNVs (copy number variations) zu detektieren. Dabei wurden die einzelnen Arbeitsschritte folgend dem Originalprotokoll von Affymetrix durchgeführt. Ein SNP 6.0 Microarray enthält 1,8 Millionen Marker für CNV-Calls.

#### 3.3.1 Verwendete Materialien

- Vortexer
- Zentrifuge
- Pipettensatz
- Thermocycler
- Thermomixer
- AccGene Water
- NE Puffer 3 (10x)
- BSA (110x, 10 mg/mL)
- Sty 1 (10U/μl)
- Wasserbad
- T4 DNA Ligase Puffer (10x)
- Adaptor, Sty1 (50 μM)
- T4 DNA Ligase (400 U/μl)
- Titanium Taq PCR Puffer (10x)
- GC-Melt (5M)
- dNTP (2,5 mM)
- PCR Primer (100 μM)
- Titanium Taq DNA Polymerase (50x)
- Ne Puffer (2x)

- BSA (100x, 10 mg/ml)
- Nsp 1 (10U /  $\mu$ l)
- Adapter, Nsp 1 (50  $\mu$ M)
- T4 DNA Ligase (400U/ $\mu$ l)
- TITANIUM Taq PCR Puffer (10x)
- GC-Melt (5M)
- 10x Fragmentation Puffer
- Fragmentation Reagent (2,5 U/ $\mu$ l; DNase 1)
- TdT Puffer (5x)
- DNA Labeling Reagent (30 mM)
- TdT Enzyme (30 U/  $\mu$ l)
- MES (12x; 1,25M)
- Denhardt's Solution (50X)
- EDTA (0,5M)
- HS DNA (10 mg/ml)
- OCR, 100
- Human Cot-1 DNA (1 mg/mL)
- Tween-20 (3%)
- DMSO (100%)
- TMACL (5 M)

### 3.3.2 Methodischer Ablauf

(der Ablauf wird für eine SNP Microarray-CGH 6.0 von 48 Proben beschrieben)

#### **Tag 1:**

#### Sty Restriktionsenzymatischer Verdau

- Vorbereitung einer 96 well Plate: In jedes well werden 5  $\mu$ l genomische DNA (c = 50 ng/ $\mu$ l) pipettiert. 4wells werden mit AccuGene Water als Negativ-Kontrollen geführt

- Vorbereitung des Verdau-Mastermix dafür werden
  - 637.6 µl AccuGene Water
  - 110,4 µl NE Puffer 3 (10x)
  - 11 µl BSA (110x; 10 mf/ml)
  - 55,2 µl Sty 1 (10 U/µl) zusammen pipettiert
- danach wird der Mastermix in einen 12er Strip (67 µl/Tube) aliquotiert und mittels Multipipette jeweils 14,75 µl des Mastermixes zu den 48 Proben der Platte zugefügt
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- daraufhin wird die Platte in den Thermocycler stellen und das Programm GW5.0/6.0 Digest (Tab. 2) zum Verdauen anwählen

**Tabelle 2:** Temperaturprogramm am Thermocycler für den Verdau

<b>GW 5.0/6.0 Digest</b>	
Temperature	Time
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	Hold

## Ligation

- Vorbereitung des Ligations-Mastermixes :
  - 150 µl T4 DNA Ligase Puffer (10x)
  - 45 µl Adaptor, Sty 1 (50 µM)
  - 120 µl T4 DNA Ligase (400 U/ µl)
- das Gesamtvolumen von 315 µl des Ligations-Mastermix wird auf ein 12er Strip, Luftblasenfrei, aliquotiert (25 µl/Tube)

- mithilfe der Multikanalpipette werden zu jeder verdauten Probe 5,25 µl des Ligations-Mastermixes hinzugefügt
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- danach wird die Platte in den Thermocycler gestellt und das GW5.0/6.0 Programm zum Ligieren (Tab. 3) gestartet

**Tabelle 3:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Ligation

<b>GW 5.0/6.0 Ligate</b>	
Temperature	Time
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Hold

- die ligierten Proben werden dann zentrifugiert und mittels Multikanalpipette wird je 75 µl AccuGENE Wasser beigemischt (Spitzen bei jeder Reihe wechseln)
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- nun werden mittels Multikanalpipette jeweils 10 der verdünnten Proben auf drei 96 well Plates aufgeteilt, sodass man 3 Platten, mit jeweils dem gleichen Inhalt enthält
- danach wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert

## PCR

- Der PCR Mastermix wird in einem 50 ml Gefäß auf Eis vorbereitet
  - 6,541 ml AccuGENE Wasser
  - 1,656 ml TITANIUM Taq PCR Puffer (10x)

- 3,312 ml GC-Melt (5M)
  - dNTP (2,5 mM)
  - Primer 002 (100 mM)
  - TITANIUM Taq DNA Polymerase (50x)
- danach ordentlich vortexen
  - zu jedem der davor verdünnten, gebundenen Proben mittels Multipipette 90 µl des PCR Mastermix pipettieren (PCR Mastermix auf Eis halten)
  - anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
  - Platten auf Eis stellen
  - danach die 3 Platten in den vorgeheizten Thermocycler stellen und das passende GW5.0/6.0 Programm (Tab. 4) wählen (dieser Schritt muss innerhalb von 30 Minuten nach Beimengen des PCR Mastermixes zu den Proben erfolgen)

**Tabelle 4:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Amplifikation

<b>GeneAmp PCR System 9700 GW 5.0/6.0 PCR</b>		
Temperature	Time	Repeats
94 °C	3 min	-
94 °C	30 sec	30 x
60 °C	45 sec	
68 °C	15 sec	
68 °C	7 min	-
4 °C	Hold	

## Tag 2:

### Nsp Restriktionsenzymatischer Verdau

- Vorbereitung von einer der 96 well Plates. In jedes well werden 5  $\mu$ l genomischer DNA (c= 50 ng/  $\mu$ l) gegeben. 4 Wells werden mit AccuGene water als Negativ-Kontrollen geführt
- Vorbereitung des Nsp Verdau Mastermix
  - 637,6  $\mu$ l AccuGENE Water
  - 110,4  $\mu$ l NE Puffer 2 (10x)
  - 11  $\mu$ l BSA (100X; 10 mg/  $\mu$ l)
  - Nsp 1 (10 U/ $\mu$ l)
- der Mastermix wird wiederum in einen 12er Strip aliquotiert (67  $\mu$ l/Tube)
- mithilfe einer Multikanalpipette wird nun in jedes Well 14,75  $\mu$ l des Nsp Digestion Mastermix überführt
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- die Platte im Anschluss in den Thermocycler stellen und das Programm GW5.0/6.0 Digest (Tab. 5) wählen

**Tabelle 5:** Temperaturprogramm am Thermocycler für den Verdau

<b>GW 5.0/6.0 Digest</b>	
Temperature	Time
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	Hold

## Nsp Ligate

- Vorbereitung des Nsp Ligations Mastermix
  - 150 µl T4 DNA Ligase Puffer (10x)
  - 45 µl Adaptor, Nsp 1 (50 mM)
  - T4 DNA Ligase (400 U/µl)
- zusammenpipettieren, danach vortexen und abzentrifugieren
- das Mastermix in ein 12er Strip-Tube aliquotieren (25 µl in jedes Tube)
- eine Multipipette verwenden um je 5,25 µl des Mastermix in jedes Well mit den verdauten Proben pipettieren
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- die Platte in den Thermocycler stellen und das GW5.0/6.0 Ligate Programm (Tab. 6) einschalten

**Tabelle 6:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Ligation

<b>GW 5.0/6.0 Ligate</b>	
Temperature	Time
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Hold

- danach die Platte abzentrifugieren
- 75 µl AccuGENE Wasser in jedes der 48 Wells mit dem Adaptor, Nsp1 gebundenen Samples beifügen
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- dann werden die verdünnten Proben auf vier 96 Well PCR Plates aufgeteilt

in jedes Well kommen 10 µl der verdünnten, gebundenen Samples,

sodass man am Ende 4 PCR Platten mit jeweils dem gleichen Inhalt hat.

## Nsp PCR

- der Nsp Mastermix wird in einem 50 ml Tube auf Eis zubereitet
  - 8,722 ml AccuGENE water
  - 2,208 ml TITANIUM Taq PCR Puffer (10x)
  - GC-Melt (5M)
  - dNTP (2,5 mM)
  - PCR Primer 002 (100 µM)
  - TITANIUM Taq DNA Polymerase (50x)
- den Nsp Mastermix auf Eis stellen
- mit Hilfe der Multikanalpipette werden je 90 µl des Nsp Mastermix zu jeder der Nsp gebundenen, verdünnten Proben pipettiert
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen, gevortext und zentrifugiert
- die 4 PCR Platten werden nun in den vorgeheizte Thermocycler gestellt und das GW5.0/6.0 PCR Programm (Tab. 7) gestartet (das passiert innerhalb von 30 min nach Zugabe des Nsp Mastermixes zu den Proben)

**Tabelle 7:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Amplifikation

<b>GeneAmp PCR System 9700 GW 5.0/6.0 PCR</b>		
Temperature	Time	Repeats
94 °C	3 min	
94 °C	30 sec	30 x
60 °C	45 sec	
68 °C	15 sec	
68 °C	7 min	-
4 °C	Hold	

## Tag 3:

### Aufreinigung des PCR Produkts mittels AMPure XP Beads

- Die Qualität der PCR Produkte wird nun auf einem 2% TBE Gel überprüft.

Es wird jeweils nur eine repräsentative Probe von den 3 gleichen Sty PCR Platten bzw. 4 gleichen Nsp PCR Platten verwendet.

Dazu werden jeweils 3  $\mu$ l des PCR Produkts mit 3  $\mu$ l eines 2x Gel Loading Dye gemischt und in die Geltasche aufgetragen. Außerdem wird in die erste und letzte Geltasche jeweils ein Size Standard (1 kb DNA Ladder) aufgetragen.

Das Gel lässt man dann bei 120V für ca. 45 min im Gleichstromfeld laufen.

Die PCR-Produkt-Verteilung am Gelbild muss zwischen ~200 und 1100 Basenpaare liegen.

- Danach werden die Sty PCR Produkte und Nsp PCR Produkte in eine Deep Well Pooling Plate überführt.
- Jetzt werden 1ml Magnetic beads jeder Probe beigefügt. Es ist wichtig, dass sich die Magnetic beads gut in der Probe verteilen, deshalb 5 mal auf- und abpipettieren nachdem man die Magnetic beads dazu pipettiert hat
- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert
- im Anschluss wird eine Millipore Filterplatte auf einem Vakuum Verteiler platziert
- die inkubierten Proben werden nun auf die Filterplatte übertragen
- die 48 leeren Wells werden mit Adhesive Film verschlossen
- das Vakuum bleibt so lange angesetzt bis die ganze Flüssigkeit durch den Filter diffundiert ist (ca. 50 min)

- danach stellt man sicher, dass die ganze Flüssigkeit von der Filterplatte weggesaugt ist
- jede Probe wird anschließend mit 1,8ml 75% Ethanol gewaschen. Hierfür verwendet man eine 1200 ml Pipette und pipettiert bei angesetztem Vakuum 900 ml zu jeder Probe. Nach weiteren 2 Minuten werden weitere 900 ml Ethanol dazupipettiert. Das Vakuum bleibt so lange angesetzt bis die ganze Flüssigkeit durch die Filter gesaugt ist (ca. 10-15min)
- dann muss man überprüfen ob das ganze Ethanol von der Filterplatte weg ist

## DNA-Eluierung

- die Catch Plate wird an der Filter Plate mittels Klebeband befestigt
- es werden nun 60 µl Puffer EB jeder Probe beigefügt
- die Platte wird dann lose mit einem Deckel von einer Filter-Tip-Box verschlossen
- die Platte wird so für 30 min bei 50 °C in den Brutschrank gestellt
- danach wird der Deckel abgenommen und die Platte gut mit Adhesive Film verschlossen
- für 30 min auf Stufe 7 wird die Platte nun auf den Jitterbug gestellt
- daraufhin wird der Adhesive Film entfernt und der Plattenstapel in der Vakuumvorrichtung platziert
- das Vakuum bleibt so lange angesetzt bis die ganze Flüssigkeit durch gesaugt ist (ca. 10 min)
- das Vakuum wird dann abgeschaltet, die ganze Platte mit Adhesive Film verschlossen und der Plattenstapel für 5 min bei 1400 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert
- die Auffangplatte, die nun die herausgelöste DNA enthält, wird entfernt. Es sollten nun in etwa 50 µl in jedem Well erkennbar sein
- die verdünnte DNA wird dann noch einmal am Jitterbug für 5 min auf Stufe 7 gemixt und danach kurz abzentrifugiert

- jetzt werden 45 µl jeder Probe mittels Multikanalpipette in eine neue PCR Platte (Fragmentierungsplatte) überführt

## Quantifizierung

- es werden jeweils 2 µl mit 198 µl Wasser für die anschließende Absorptionsmessung verdünnt
- Wasser und die Probe müssen gut gevortext werden
- vor der Absorptionsmessung wird die Eichung mit 200 µl Wasser am UV/VIS Spektrometer durchgeführt:  
OD260 range 0,9-1,2  
acceptable range:4,5-6 µg/ µl

## Tag 4:

### Fragmentierung

- dafür wird ein 12er Strip genommen und in jedes Tube 28 µl 10x Fragmentierungspuffer pipettiert
- mithilfe der Multikanalpipette wird dann jeder Probe 5 µl davon beigemischt
- danach wird ein Fragmentierungs-Mastermix hergestellt, der auf Eis gehalten wird
  - 309,6 µl AccuGENE Wasser
  - 10x Fragmentierungspuffer
  - 14,4 µl Fragmentierungsreagenz (2,5 U/ µl; DNase 1)
- den Mix vortexen, runterzentrifugieren und auf Eis stellen
- jeder Probe wird nun 5 µl des Fragmentierungs-Mastermix beigefügt

- anschließend wird die Platte mittels Adhesive Film verschlossen und gevortext
- die Platte wird nun in eine gekühlte Plattenhalterung gestellt und bei 4°C und 2000 rpm für 30 sec zentrifugiert
- im Anschluss wird die Platte abermals in einen auf 37 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das GW5.0/6.0 Fragmentierungsprogramm (Tab. 8) gestartet

**Tabelle 8:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Fragmentierung

<b>GW 5.0/6.0 Fragment</b>	
Temperature	Time
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Hold

### Fragmentierungsskontrolle mittels Agarose-Gel

- dafür entnimmt man 1,5 µl von jeder Probe, mischt dies mit 4 µl Gel loading dye und vortext gründlich
- danach trägt man den Mix auf ein 4% TBE Gel auf und lädt die erste und letzte Geltasche mit einem Size Standard (1 kb DNA Ladder)
- das Gel lässt man bei 120V für ca. 45 min laufen
- die durchschnittliche Größe der Fragmente sollte kleiner als 180 bp sein
- Nun wird der Labeling Mastermix vorbereitet
  - 772,8 µl TdT Puffer (5x)
  - 110,4 µl DNA Labeling Reagent (30 mM)
  - 193,2 µl TdT Enzyme (30 U/ µl)
- zuerst den Mastermix gut vortexen und runterzentrifugieren

- jeder Probe wird nun mittels Multikanalpipette 19,5 µl das Labeling Mastermix beigefügt
- mit Adhesive Film verschließen, vortexen und zentrifugieren
- erneut die Platte zu einem vorgeheizten Thermocycler bringen, reinstellen (die Platte davor sehr gut verschließen, um Evaporation zu vermeiden) und das Label-Programm GW5.0/6.0 (Tab. 9) starten

**Tabelle 9:** Temperaturprogramm am Thermocycler für das Labeling

<b>GW 5.0/6.0 Label</b>	
Temperature	Time
37°C	4 h
95°C	15 min
4°C	Hold

Am Tag 4 werden auch die Stain Solution und der Holding Puffer vorbereitet. Zuerst muss der Stain Puffer vorbereitet werden, dafür benötigt man

- 44,162 ml AccuGENE Wasser
- 19,872 SSPE (20x)
- 3% Tween 20
- Denhardt's (50x)

Für die SAPE Stain Solution werden

- 32,788 ml Stain Puffer
- 332 µl SAPE gemischt

Für die Antikörper Stain Solution werden

- 32,788 ml Stain Puffer
- 332 µl Biotin-Ab pipettiert

Nach dem pipettieren ordentlich vortexen und danach abzentrifugieren.  
Sowohl von der SAPE Stain Solution, als auch von der Antikörper Stain Solution werden jeweils 600 µl in ein 1,5 ml Tube pipettiert. Die beiden Stain Solutions werden am Tag des Gebrauchs zubereitet.

Auch der Array Holding Puffer muss rechtzeitig zubereitet werden

- 8,3 ml MES Stock Puffer (12x)
- 18,5 ml 5 M NaCl
- 0,1 ml Tween 20 (10%)
- 73,1 ml Aqua bidest

Vom Holding Puffer werden jeweils 1 ml in ein 1,5 ml Tube pipettiert.

Ort der Flüssigkeiten im Gerät:

- Position 1 – SAP Stain Solution
- Position 2 – Antikörper Stain Solution
- Position 3 – Array Holding Puffer

## **Tag 5:**

### Hybridisierung

- der Hybridisierungssofen wird für eine Stunde auf 50 °C und 60 rpm vorgeheizt
- die Arrays werden vorbereitet und auf Raumtemperatur erwärmt
- nun wird ein Hybridisierungsmastermix auf Eis vorbereitet
  - 660 µl MES (12x; 1,25 M)
  - 715 µl Denhardt's Solution (50x)

- 165 µl EDTA (0,5 M)
  - 165 µl HS DNA (10 mg/ml)
  - 110 µl OCR, 0100
  - 165 µl Human Cot-1 DNA (1 mg/ml)
  - 55 µl Tween 20 (3%)
  - 715 µl DMSO (100%)
  - 7,7 ml TMACL
- vortexen, zentrifugieren und auf Eis stellen
  - darauffolgend wird zu jeder gelabelten Probe mittels Multikanalpipette 190 µl des Hybridisierungsmastermix pipettiert
  - die Platte wird daraufhin sorgfältig mit Adhesive Film verschlossen und nochmal gevortext und abzentrifugiert
  - der Adhesive Film wird zwischen jeder Reihe durchgeschnitten
  - die Platte wird danach in den Thermocycler gestellt und das Hybridisierungsprogramm GW5.0/6.0 (Tab. 10) gestartet

**Tabelle 10:** Temperaturprogramm am Thermocycler für die Hybridisierung

<b>GW 5.0/6.0 Hyb</b>	
Temperatur	Time
95°C	10 min
49 °C	Hold

- danach wird der Adhesive Film von einer Reihe entfernt und 200 µl von jedem well auf einen Array übertragen
- jeweils 4 Arrays werden zusammen in ein Gestell platziert und in den Ofen gestellt
- dieser Prozess wird mit allen Proben durchgeführt
- danach wird der Ofen auf 50°C geheizt und die Proben bei 60 rpm für 16 bis 20 Stunden hineingestellt

## Charakterisierung der CNVs

Um die Sensitivität der CNV-Suche zu verfeinern wurden 3 verschiedene Algorithmen angewandt: Birdsuite (BS), iPattern (IPN) und die Genotyping Konsole von Affymetrix (GTC).

Ob eine detektierte CNV als zwingend („*stringent*“) geltend gemacht wurde, hing von der Anzahl der Algorithmen ab welche denselben spezifischen Zugewinn (gain) oder Verlust (loss) erkannten. Ein CNV musste dafür zumindest durch 2 der 3 Algorithmen detektiert worden sein. Laut Literatur ist dadurch die Wahrscheinlichkeit der Validität bezüglich der CNVs über 90% (D. Pinto et al., 2010).

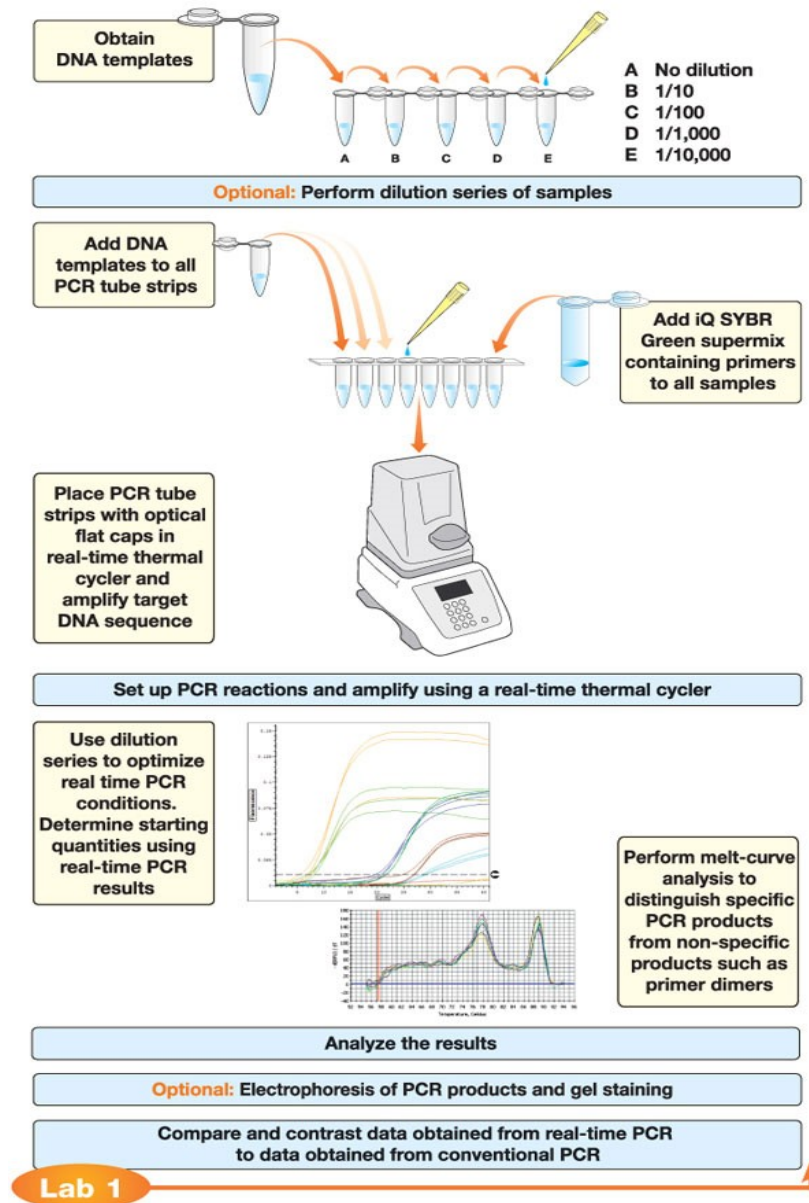
Um seltene CNVs in Bezug auf Autismus zu finden, wurden die Ergebnisse mit 3 verschiedenen Kontrollsets verglichen:

1. Die Datenbank genomischer Variationen (Database of Genome Variants, DGV)
2. POPGEN, eine Ergebnissammlung von 1123 Menschen europäischen Ursprungs, aus der Population Norddeutschlands rekrutiert und mittels Affymetrix 6.0 und Birdsuite, iPattern und GTC analysiert
3. OHI, eine Sammlung von 1234 Menschen mit europäischen Wurzeln. Rekrutiert von Ottawa Valley um als Kontrollen bei einer Herzstudie des Ottawa Heart Institute zu dienen. Auch mittels Affymetrix 6.0 und den Berechnungssystemen Birdsuite, iPattern und GTC analysiert

Ein 50% Kriterium in Bezug auf Überlappung wurde für unsere Analyse angesetzt. Das heißt, ein Zugewinn oder Verlust eines DNA-Abschnittes in einem Patienten, welcher in weniger als 50% in CNVs der DGV und den anderen Kontrollen zu finden war, wurde als selten angenommen.

### 3.4 Real-Time PCR

Die Validierung der Affymetrix 6.0 Microarray-CGH Ergebnisse und Kontrolle ob vererbt oder *de novo* erfolgte mittels qRT-PCR (quantitativer Real-Time PCR), die wie eine gewöhnliche Polymerasenkettenreaktion funktioniert bei der jedoch die Zugewinne an DNA im Verlauf mittels Fluoreszenz erfasst werden (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der Real-Time PCR; entnommen aus: <http://www.bio-rad.com>

### 3.4.1 Verwendete Materialien

- ViiA™ 7 Real-Time PCR System (von Applied Biosystems)
- MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (von Applied Biosystems)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX (BIO-RAD)
- UV – VIS Spectralphotometer, NanDrop
- Pipettensatz (Gilson)
- Multipipette (Eppendorf)
- Safe-lock Tubes 1,5ml PCR clean (Eppendorf)
- Spitzen (Barrier Tips)
- Einweghandschuhe
- Aqua bidest
- Vortexer
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml Tubes
- Mikrozentrifuge für PCR 8er-Strips
- c = 5 ng/ µl der jeweiligen PatientInnen- bzw. Eltern-DNA
- c = 5 ng/ µl von 3 bis 5 Kontroll-DNAs
- Forward- und Reverse-Primer im Bereich der gewählten Genbereiche
- Forward- und Reverse-Primer der internen Kontrolle (FOXP2 Loci am Chromosom 7)

### 3.4.2 Methodischer Ablauf

- Konzentration der PatientInnen-DNA vermessen und auf c= 5 ng/µl mit Aqua bidest verdünnen
- Konzentration der 3 bis 5 Kontroll-DNAs vermessen und auf auf c= 5ng/µl mit Aqua bidest verdünnen
- das Gesamtvolumen des Mastermix pro Well beträgt 14 µl, zusammengesetzt aus

- 7,5 µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX
  - 5,5 µl Aqua bidest
  - 0,5 µl Forward-Primer (5 µM)
  - 0,5 µl Reverse-Primer (5 µM)
- oben angeführte Mengen in ein 1,5 µl Eppendorf Tube geben
- je nachdem für wie viele Proben man denselben Primermix benötigt, können Mastermixe mit einem Vielfachen der oben angegebenen Mengen vorbereitet werden
- ausgiebig vortexen
- Volumen in ein PCR 8er-Strip aufteilen
- von den DNAs (PatientInnen bzw. Kontrollen) welche auf 5 ng/µl verdünnt wurden jeweils 2 µl in das dafür vorgesehene Well der Optical 384-Well Reaction-Plate pipettieren
- mit der Multipipette 14 µl des davor vorbereiteten Mastermix mit der jeweiligen Primermischung beifügen
- Vorsicht beim Pipettieren mit der Multipipette, da nur jedes zweite Well der 384-Well Reaction Plate beim pipettieren erreicht werden kann
- nachdem alle Wells 2 µl der DNA und 14 µl des Mastermix enthalten, wird die 384-Well Reaction Plate mittels Optical Adhesive Film verschlossen
- es ist darauf zu achten, dass der Optical Adhesive Film jedes Well ordentlich verschließt. Nötigenfalls mit einer Spatel jeden Zwischenraum zwischen zwei Wellreihen mit etwas Druck nachziehen
- darauffolgend 384-Well Plate für 3 Minuten abzentrifugieren
- kontrollieren ob keine Luftblasen in den einzelnen Wells zu erkennen sind
- Platte ins ViiA™ 7 Real-Time PCR stellen, den gewünschten Modus wählen (comparative Analysis, 384 well plate, Fast) und das Plattenschema erstellen

## 4. Ergebnisse

### 4.1 DNA-Isolierung

Die Lymphozyten-DNA-Isolierung wurde bei allen Proben erfolgreich durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen befanden sich bei den meisten Proben im Bereich zwischen 70ng/μl – 400ng/μl. Deren Ratios bewegten sich im Bereich zwischen 1,80 und 2,18.

Die Konzentrations- und Ratiowerte der Proben von den IndexpatientInnen sind in Tabelle 11 angeführt.

**Tabelle 11:** DNA-Proben der IndexpatientInnen mit Konzentrationsangaben und Ratiowerten

DNA-Nummer [#]	DNA-Konzentration [ng/μl]	260/280 Ratio	260/230 Ratio
A2	310	1,82	2,01
A5	247	1,87	2,00
A6	236	1,94	1,87
A8	316	1,80	1,98
A14	291	2,02	2,11
A16	224	1,81	1,97
A19	434	1,81	2,18
A21	202	1,89	1,98
A23	279	1,96	1,96
A27	191	1,82	1,83
A32	151	1,94	1,99
A35	255	1,99	1,99
A38	222	1,83	2,04
A41	193	1,80	2,01
A44	390	2,01	2,15
A47	414	2,00	2,03
A50	258	1,85	2,01
A56	205	1,81	2,09
A58	357	1,97	1,99

DNA-Nummer [#]	DNA-Konzentration [ng/μl]	260/280 Ratio	260/230 Ratio
A60	290	1,96	2,02
A62	250	2,05	2,00
A67	301	1,99	2,00
A70	255	1,82	1,96
A73	259	1,83	1,99
A75	123	1,98	2,01
A79	237	1,92	2,17
A83	230	1,80	2,11
A86	163	1,84	2,17
A94	167	1,97	1,98
A100	184	1,98	1,96
A103	168	1,83	1,88
A107	264	1,86	2,01
A108	417	1,91	2,04
A116	238	2,02	1,99
A121	226	1,87	2,01
A123	96	1,81	1,92
A124	50	1,93	1,95
A126	165	1,89	2,00
A130	247	1,85	1,99
A132	236	1,87	2,03
A136	172	1,87	2,07
A140	247	1,96	2,01
A144	204	2,00	2,14
A147	161	1,97	2,11
A150	161	1,83	1,83
A153	185	1,80	1,89
A156	64	1,91	2,05
A161	181	1,86	2,01
A162	707	1,83	1,99
A165	134	1,89	2,01
A170	390	1,84	1,96
A174	259	1,88	2,03
A177	332	1,95	2,00

DNA-Nummer [#]	DNA-Konzentration [ng/μl]	260/280 Ratio	260/230 Ratio
A179	71	1,83	1,99
A182	304	1,97	1,86
A184	185	1,86	2,03
A187	231	1,82	2,03
A194	544	1,95	2,09
A196	80	1,88	2,01
A198	129	1,85	2,03
A200	219	1,85	1,96
A201	257	1,90	1,97
A204	191	1,92	1,96
A207	424	1,83	2,01
A210	330	1,84	1,96
A213	276	1,88	2,13
A215	68	1,81	2,11
A217	225	1,92	2,00
A219	117	1,80	2,03
A223	163	1,93	1,99
A226	353	1,87	2,01
A233	294	1,83	2,05
A239	195	1,95	2,01
A244	313	1,80	2,04

## 4.2 Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH

Die Array-CGH lieferte für 72 IndexpatientInnen Ergebnisse über Zugewinne und Verluste im Genom ab ca. 50 kb.

Die PatientInnennummer (A-Nummer), in welchem Bereich sich die Veränderung befindet, CNV-Start und -Ende, die CNV Größe und ob es sich um einen Zugewinn oder Verlust handelt ist in Tabelle 12 aufgelistet.

In der Tabelle sind nur CNVs angeführt, die als „zwingend“ (*stringent*) bewertet wurden, d.h. sie wurden von mindestens 2 der 3 algorithmischen Berechnungssysteme detektiert.

In der Tabelle zu erkennen ist auch, dass jeder Mensch eine unterschiedliche Anzahl an CNVs in seinem Genom trägt. Deshalb kommen die Probennummern in der Tabelle unterschiedlich häufig vor.

**Tabelle 12:** *Stringent* Array-CGH-Ergebnisse der IndexpatientInnen mit Chromosomenangabe, Beginn und Ende der CNV, Größe des CNV-Bereichs und Status der CNV

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A150	X	24.513.979	27.864.451	3.350.473	-,2	Gain
A161	21	43.994.161	46.921.385	2.927.225	-,1	Loss
A47	6	104.272.570	105.050.116	777.547	3,-	Gain
A67	16	47.911.712	48.519.007	607.296	-,3	Gain
A67	X	111.485.534	112.035.904	550.371	3,-,3	Gain
A50	7	68.391.493	68.846.056	454.564	-,3	Gain
A2	15	29.786.937	30.231.488	444.552	-,1	Loss
A73	9	16.651.092	17.071.683	420.592	3,-	Gain
A136	14	42.042.787	42.360.663	317.877	1,-	Loss
A79	17	74.912.218	75.225.624	313.407	3,-	Gain
A62	21	31.680.657	31.991.168	310.512	-,3,-	Gain
A136	16	28.660.952	28.951.376	290.425	1,-	Loss
A21	11	45.325.795	45.611.920	286.126	3,-	Gain

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A21	11	83.108.466	83.378.706	270.241	3,-	Gain
A62	2	10.208.865	10.474.077	265.213	1,-	Loss
A23	1	108.512.791	108.712.268	199.478	1,-	Loss
A116	1	234.661.160	234.853.096	191.937	3,-,4,3	Gain
A44	17	39.578.594	39.756.006	177.413	-,3	Gain
A136	12	115.655.372	115.797.029	141.658	3,-,-	Gain
A23	6	5.170.870	5.308.007	137.138	-,1	Loss
A94	7	137.590.323	137.725.732	135.410	3,-	Gain
A156	2	133.600.528	133.728.969	128.442	-,1	Loss
A83	6	88.234.016	88.350.126	116.111	3,-	Gain
A132	X	5.307.505	5.414.614	107.110	-,2	Gain
A67	10	35.393.771	35.496.363	102.593	1,-	Loss
A27	3	158.558.282	158.639.900	81.619	3,-	Gain
A47	5	4.276.216	4.346.378	70.163	3,-	Gain
A35	7	153.462.809	153.529.856	67.048	-,1	Loss
A67	3	157.787.094	157.853.668	66.575	1,-	Loss
A27	8	13.574.472	13.639.602	65.131	1,-	Loss
A38	X	68.811.631	68.873.651	62.021	-,3	Gain
A144	18	75.895.798	75.956.745	60.948	-,3	Gain
A153	18	75.895.798	75.956.745	60.948	3,-	Gain
A19	3	870.025	926.367	56.343	1,-	Loss
A50	1	104.851.885	104.908.120	56.236	-	Gain
A170	4	92.867.658	92.923.288	55.631	1,-	Loss
A27	3	158.401.436	158.456.498	55.063	3,-	Gain

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A79	12	72.795.885	72.850.841	54.957	1,-	Loss
A67	10	74.184.905	74.230.349	45.445	-,1	Loss
A44	7	144.177.251	144.222.502	45.252	1,-	Loss
A47	4	31.493.121	31.537.032	43.912	3,-	Gain
A147	2	76.738.623	76.781.815	43.193	-,1	Loss
A44	6	11.192.623	11.233.071	40.449	1,-	Loss
A83	14	78.548.117	78.587.995	39.879	1,-	Loss
A16	12	108.087.877	108.127.535	39.659	1,-	Loss
A83	16	62.141.153	62.175.746	34.594	1,-	Loss
A44	4	130.986.341	131.018.714	32.374	3,-	Gain
A41	8	9.948.345	9.980.334	31.990	-,1	Loss
A47	11	41.918.177	41.949.694	31.518	1,-	Loss
A161	19	11.891.258	11.922.384	31.127	3,-	Gain
A165	10	19.286.592	19.317.323	30.732	3,-	Gain
A160	19	11.892.787	11.922.384	29.598	3,-	Gain
A38	22	17.572.596	17.601.406	28.811	1,-	Loss
A6	4	47.881.699	47.910.404	28.706	-,1	Loss
A103	2	72.080.200	72.107.634	27.435	1,-	Loss
A126	5	97.259.536	97.286.945	27.410	1,-	Loss
A86	1	218.154.670	218.179.823	25.154	3,-	Gain
A83	9	135.465.157	135.488.622	23.466	1,-	Loss
A156	16	72.726.400	72.749.654	23.255	3,-	Gain
A23	15	52.531.915	52.555.069	23.155	-,1	Loss
A140	6	19.580.163	19.602.725	22.563	-,1	Loss

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A35	14	23.355.915	23.377.938	22.024	1,-	Loss
A107	3	67.791.503	67.812.224	20.722	1,-	Loss
A108	3	67.791.503	67.812.224	20.722	1,-	Loss
A126	3	67.791.503	67.812.224	20.722	-,1	Loss
A103	7	145.687.353	145.707.079	19.727	1,-	Loss
A121	14	26.808.311	26.826.938	18.628	3,-	Gain
A94	13	69.452.461	69.471.066	18.606	1,-	Loss
A41	19	60.940.633	60.958.871	18.239	3,-	Gain
A19	6	170.655.032	170.672.932	17.901	4,-	Gain
A47	5	7.291.212	7.308.921	17.710	3,-	Gain
A19	7	11.950.086	11.967.661	17.576	1,-	Loss
A153	17	65.056.574	65.073.958	17.385	-,1	Loss
A32	21	43.535.700	43.551.408	15.709	1,-	Loss
A103	4	154.277.598	154.292.303	14.706	1,-	Loss
A160	6	133.025.435	133.040.041	14.607	1,-	Loss
A116	3	11.451.728	11.466.305	14.578	1,-	Loss
A116	18	62.454.114	62.468.199	14.086	0,-	Loss
A116	9	75.255.324	75.268.983	13.660	-,1	Loss
A27	11	113.014.667	113.028.191	13.525	1,-	Loss
A32	10	8.021.446	8.034.890	13.445	-,1	Loss
A140	5	56.308.634	56.321.532	12.899	1,-	Loss
A73	6	62.544.870	62.557.646	12.777	1,-	Loss
A160	10	13.292.838	13.305.412	12.575	1,-	Loss
A27	11	100.911.259	100.923.081	11.823	3,-	Gain

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A73	2	60.937.915	60.949.535	11.621	1,-	Loss
A19	6	169.249.708	169.260.864	11.157	1,-	Loss
A132	6	100.237.707	100.248.432	10.726	-,1	Loss
A140	14	41.777.499	41.787.363	9.865	1,-	Loss
A19	11	96.191.471	96.200.804	9.334	4,-	Gain
A23	8	97.028.995	97.037.947	8.953	1,-	Loss
A19	3	152.788.871	152.797.802	8.932	1,-	Loss
A21	11	10.697.570	10.705.188	7.619	-,1	Loss
A19	18	126.240	133.558	7.319	-	Loss
A16	5	2.604.809	2.611.914	7.106	1,-	Loss
A79	10	79.687.051	79.694.054	7.004	-,1	Loss
A47	2	55.177.792	55.183.854	6.063	1,-	Loss
A121	3	60.296.311	60.301.388	5.078	-,1	Loss
A47	14	91.740.626	91.743.941	3.316	1,-	Loss
A217	1	170.174.111	170.226.179	52.069	-,3	gain
A217	1	195.206.342	195.222.522	16.181	-,1	loss
A194	1	201.052.621	202.064.350	1.011.729	-,3	gain
A200	1	245.599.624	245.628.331	28.708	1,-	loss
A187	2	25.717.735	25.777.692	59.958	3,-	gain
A198	2	57.667.301	57.684.603	17.303	-	loss
A219	2	179.996.226	180.006.205	9.980	1,-	loss
A194	2	186.485.863	187.047.435	561.573	1,-	loss
A200	3	17.655.221	17.758.388	103.168	-,1	loss
A204	3	124.907.330	124.956.275	48.946	-,1	loss

Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A184	3	192.624.900	192.672.766	47.867	1,-	loss
A217	3	193.415.193	193.427.820	12.628	3,-	gain
A217	3	193.430.546	193.452.431	21.886	-,1	loss
A219	4	145.553.059	145.573.905	20.847	1,-	loss
A219	4	182.518.735	182.558.510	39.776	3,-	gain
A226	5	27.544.955	27.571.273	26.319	-,1	loss
A213	5	63.974.156	64.240.025	265.870	3,-	gain
A196	6	17.763.624	17.862.652	99.029	-,3	gain
A198	7	85.252.890	85.341.546	88.657	-,3	gain
A201	7	118.787.448	118.826.762	39.315	-,4	gain
A219	7	120.311.810	120.334.046	22.237	-	loss
A210	7	152.909.758	153.711.379	801.622	3,-	gain
A184	8	8.361.015	8.453.220	92.206	1,-	loss
A233	9	4.306.299	4.348.391	42.093	3,-	gain
A244	9	25.926.789	26.169.185	242.397	1,-	loss
A196	9	45.506.516	65.370.766	19.864.25	1	loss
A223	10	107.338.426	107.408.911	70.486	-,3	gain
A210	11	28.105.472	28.135.299	29.828	-,1	loss
A196	11	73.617.083	73.947.977	330.895	3,-,-	gain
A213	12	130.105.794	130.333.801	228.008	-,3,-	gain
A223	13	94.205.652	94.258.384	52.733	-,1	loss
A213	13	94.241.090	94.251.231	10.142	1,-	loss
A226	13	105.504.144	105.516.128	11.985	1,-	loss
A194	14	45.441.214	45.545.680	104.467	-,1	loss

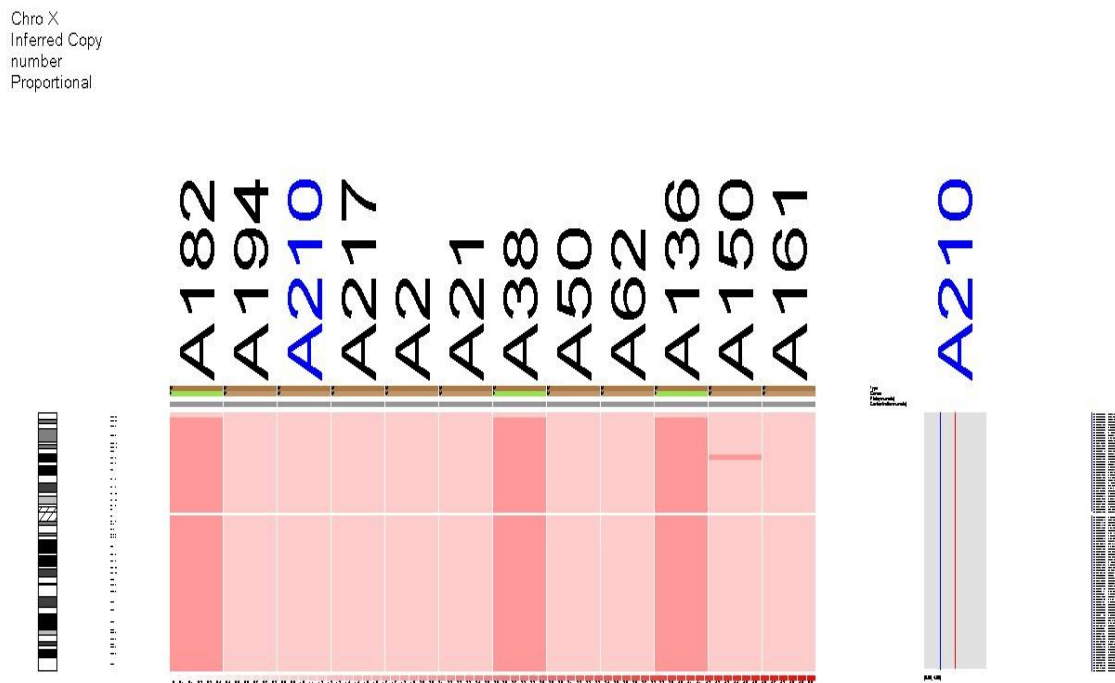
Sample	Chr	CNV start (Build36/hg18)	CNV end (Build36/hg18)	CNV size	cnState	CNV
A182	14	66.274.499	66.631.750	357.252	1,-	loss
A187	14	103.116.875	103.151.310	34.436	1,-	loss
A213	15	36.852.998	36.884.565	31.568	1,-	loss
A219	16	85.297.250	85.317.175	19.926	1,-	loss
A217	17	12.238.673	12.985.028	746.356	3,-	gain
A162	17	58.985.825	58.999.732	13.908	1,-	loss
A196	17	68.081.137	68.107.879	26.743	-	gain
A196	17	68.143.014	68.212.703	69.690	3,-	gain
A162	18	3.963.344	3.973.550	10.207	-	loss
A187	21	22.094.266	22.735.539	641.274	1,-	loss
A182	X	56.069.764	56.120.423	50.660	-	loss

Mit der Probe des Indexpatienten A179 konnte aufgrund von DNA-Verunreinigungen und geringer Konzentration keine Array-CGH durchgeführt werden. Eine nicht erfolgreich durchgeführte DNA-Isolierung scheint naheliegend. Wahrscheinlich sind bereits am ersten Tag beim Lysieren und Entfernen der roten Blutkörperchen nicht alle Erythrozyten vollständig aus der Probe entfernt worden. Zusätzlich kann es sein, dass nur ein geringer Teil der DNA am Ende der Isolierung mit der Pasteurpipette aus dem Reagenzröhrchen entnommen und in einem sterilen Cryo-Röhrchen in 1xTe gelöst wurde.

#### 4.3 dChip-Software-Analyse des X-Chromosom

Die cell- und chip-files der Array-CGH wurden auf ihr Validität durch Vergleich des X-Chromosom mittels dChip-Software geprüft (Abb. 6). Bei den männlichen Patienten war ein Verlust (Loss) also nur ein X-Chromosom erkennbar (hell

rosa), die Patientinnen zeigten hingegen ein normales diploides Vorkommen des Chromosom X (kräftig rosa). Beim Patienten A150 ist der bei der Array-CGH detektierte Zugewinn (Gain) von über 3 mb erkennbar.



**Abbildung 6:** dChip-Analyse des X-Chromosoms der PatientInnen.

#### 4.4 Literaturrecherche hinsichtlich der in CNVs vorkommenden Gene

Alle CNV-Bereiche wurden mithilfe des UCSC-Genome Browsers auf ihre beinhaltenden Gene geprüft. In Bezug auf die vorhandenen Gene wurde dann eine Literaturrecherche mittels der OVID-Suchmaske der medizinischen Universität Graz und PubMed-NCBI angestellt, um in Erfahrung zu bringen, was über die entsprechenden Gene und deren Proteine bereits bekannt ist und womit sie in der Vergangenheit in Verbindung gebracht wurden.

Dabei wurden 16 Gene festgestellt, die bereits in der Vergangenheit mit einer Neuropsychiatrischen Erkrankung assoziiert wurden oder deren Proteine

nachweislich in neurologischen Bereichen wie Gehirn, Rückenmark, Neuronen, Synapsen, Transmitter etc. ihre Funktion erfüllen.

Die Patientenummer, das Chromosom auf dem das jeweilige Gen vorkommt, der Gen-Name und der CNV-Status (ob Zugewinn oder Verlust) sind in Tabelle 13 angeführt.

**Tabelle 13:** Gene in den CNV-Bereichen der PatientInnen, die die Einschlusskriterien erfüllten

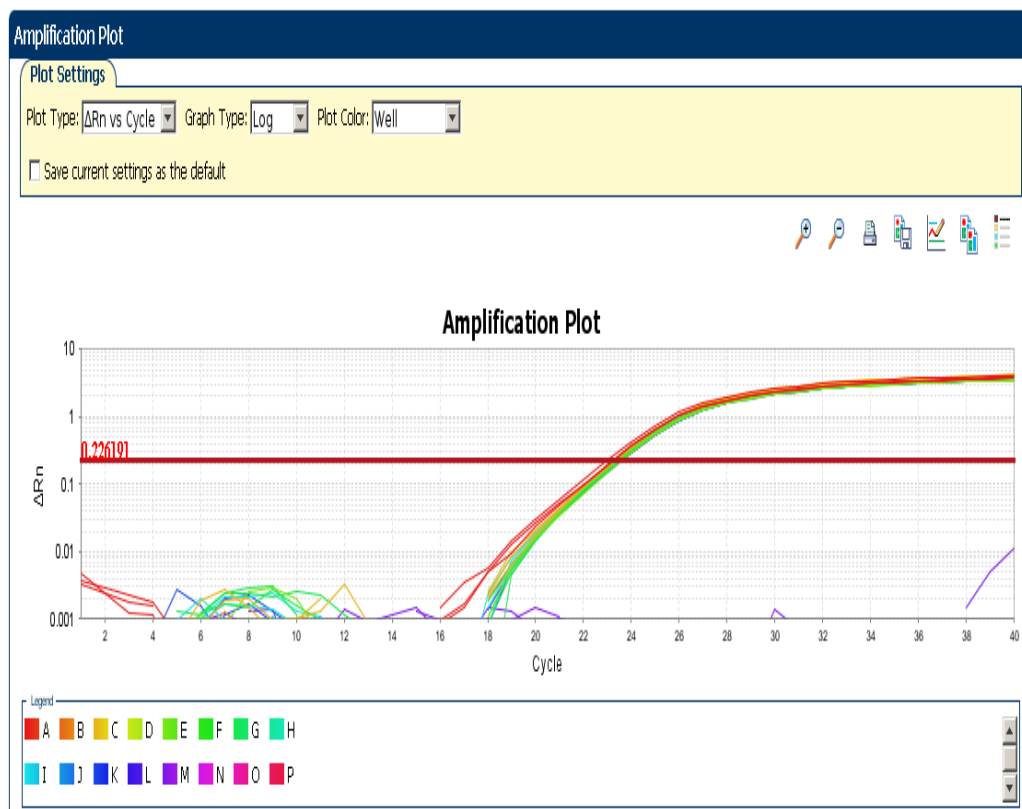
Patienten-ID	Chromosom	Gen	Gain/Loss
A50	7	<b>AUTS2</b>	Gain
A21	11	<b>DLG2</b>	Gain
A150	X	<b>ARX</b>	Gain
A161	21	<b>DIP2A</b>	Loss
A161	21	<b>C21orf29</b>	Loss
A161	21	<b>S100B</b>	Loss
A161	21	<b>CSTB</b>	Loss
A2	15	<b>CHRNA7</b>	Loss
A136	16	<b>SH2B1</b>	Loss
A62	2	<b>HPCAL1</b>	Loss
A38	22	<b>CLTCL1</b>	Loss
A217	1	<b>DNM3</b>	Gain
A182	14	<b>GPHN</b>	Loss
A194	1	<b>BTG2</b>	Gain
A210	7	<b>AUTS2</b>	Gain
A161	21	<b>DLG2</b>	Loss

## 4.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde für alle 16 Gene (siehe Tab. 13) mit zumindest 2 unterschiedlichen Primer-Paaren durchgeführt. Mit den Proben der Eltern (soweit vorhanden) folgte eine Real-Time PCR mit einem der Primer-Paare um zu prüfen, ob bei der Kopienanzahlvariation eine neu entstandene Veränderung im Genom des Patienten vorlag oder diese möglicherweise vererbt war und schon bei einem der Eltern auftrat. Als Kontroll-DNAs wurden 5 Kontrollen vom Molecular Neuropsychiatry and Development Laboratory aus Toronto zur Verfügung gestellt. Als interne Kontrollprimer dienten Primer des FOXP2 Gens.

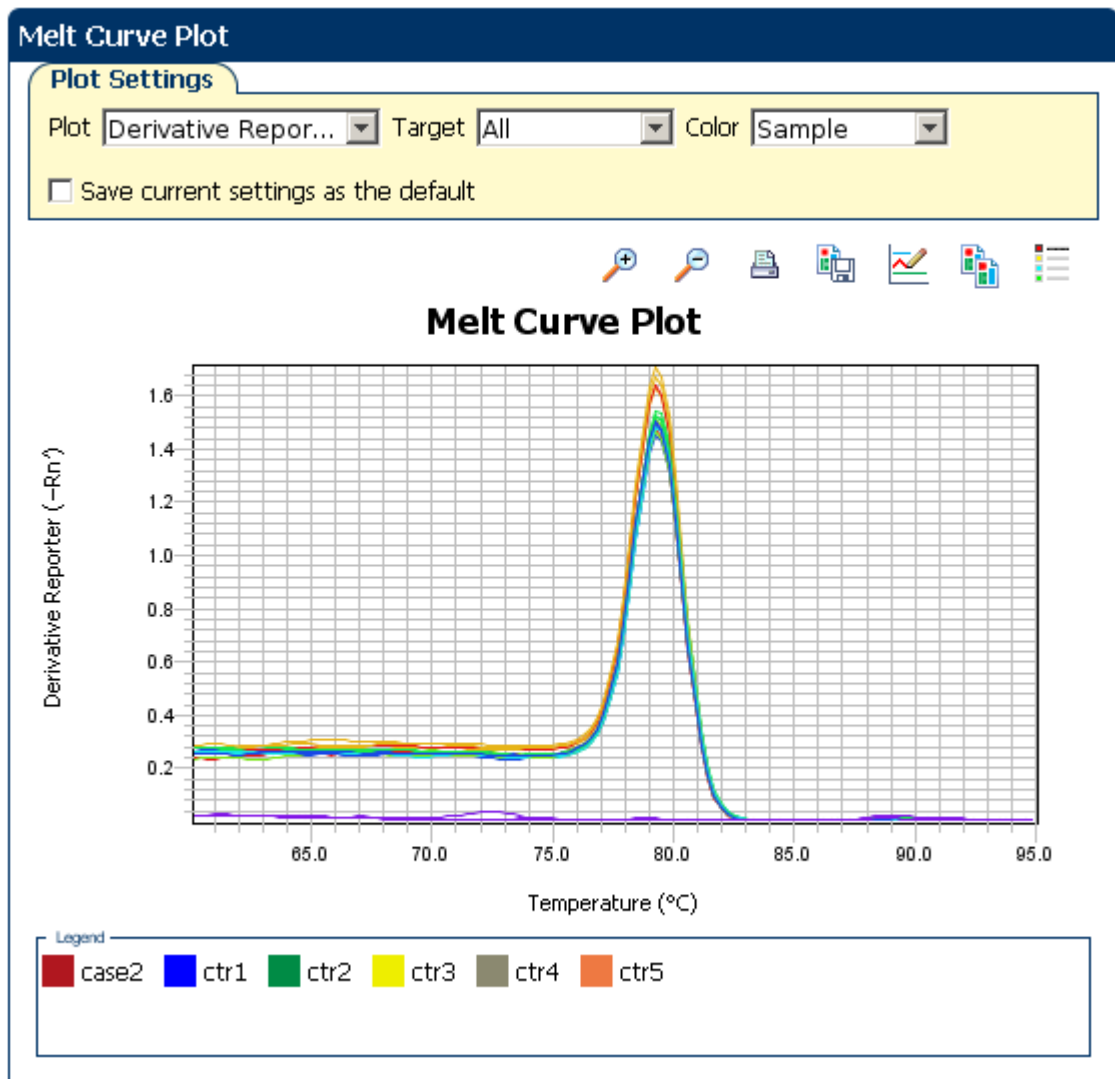
Die Quantifizierung der Zunahme an DNA bei der Real-Time PCR wurde mithilfe des SsoFast™ Evagreen Supermix with Low Rox von BIO-RAD und des ABI Softwareprogrammes von Applied Biosystems durchgeführt.

Das Programm detektiert die CT-Werte (Schwellenwert-Zyklus) und RQ-Werte (relative Menge), und stellt den Verlauf der qRT-PCR dabei graphisch in einem Amplification Plot dar (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Beispiel eines Amplification Plots; Patientenprobe(DLG2) und Kontrollen

Außerdem wird am Ende jedes PCR Zyklus eine Schmelzkurve erstellt, die als Kontrolle für einen positiven Verlauf Verwendung findet. Anhand der Schmelzkurve können die Fragmentlängen und somit die Spezifität abgelesen werden. Die Peakhöhe gibt Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Beispiel für eine Schmelzkurve; Patientenprobe (case2) und 5 Kontrollen (ctr1 – ctr5)

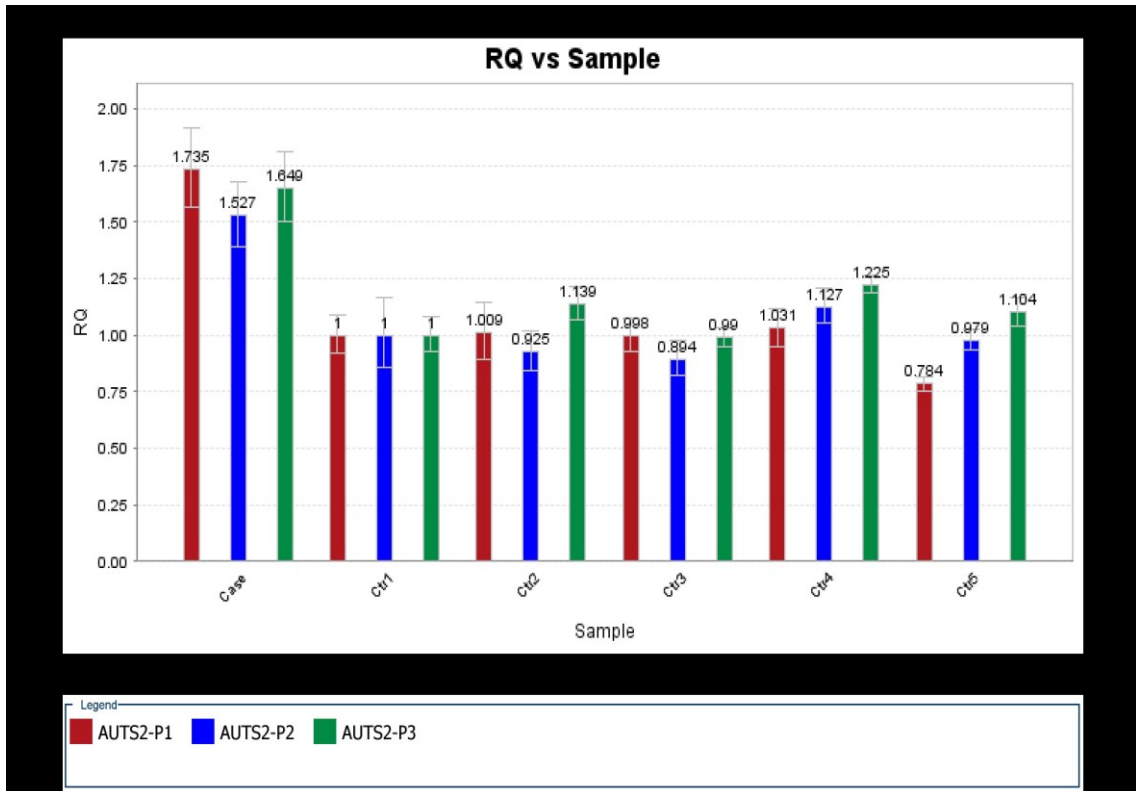
#### 4.4.1 Validierung der Array CGH-Ergebnisse mittels qRT-PCR

Die qRT-PCR-Validierung diente zur Bestätigung der durch die Array-CGH detektierten Duplikationen („gain“) und Deletionen („loss“). In der Legende der Abbildungen sind jeweils die verschiedenen Primerpaare mit dem Gennamen und 1, 2, 3 benannt. Case bezieht sich auf die PatientInnen-Probe; Father steht für die väterliche DNA-Probe, Mother steht für die DNA-Probe der Mutter und Brother für die des Bruders des Patienten/der Patientin. Ctr1-Ctr5 bezeichnen die verschiedenen Kontroll-DNAs (Abb. 10 – Abb. 36). Ein A mit einer Nummer von 1 bis 245 ist die Identifikationsnummer die den PatientInnen am Beginn der Studie zugeteilt wurde.

##### **Patient A50**

**AUTS2:** AUTS2 ist ein Gen am Chromosom 7 mit 19 Exons, das erstmals 2002 im Zuge einer Untersuchung von autistischen Zwillingen und einem Translokationsbruchpunkt genannt wurde (Sultana et al., 2002). Daraufhin wurde es in vielen weiteren Studien mit Autismus in Verbindung gebracht (Bakkaloglu et al., 2008; Bedogni et al., 2010; Schumann et al., 2011).

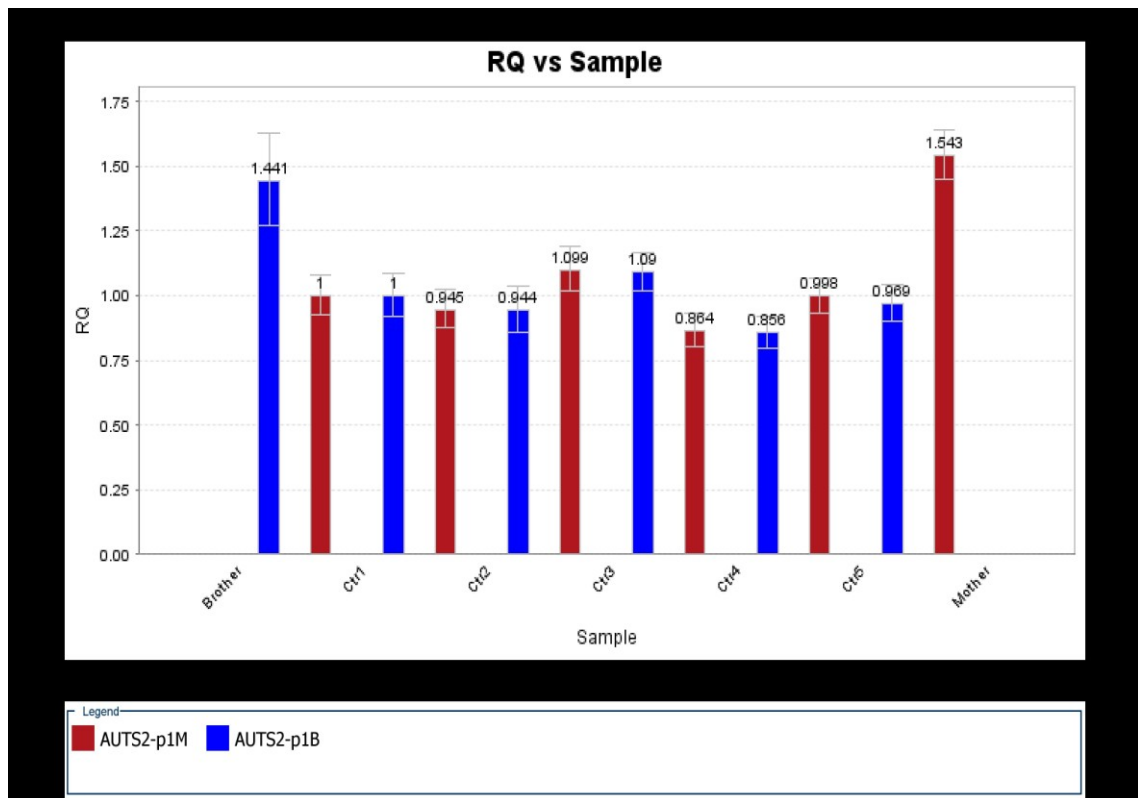
Der Zugewinn im AUTS2 Bereich wurde durch die qRT-PCR positiv bestätigt. Alle 3 verwendeten Primerpaare zeigen einen „Gain“ in der Patientenprobe. Bei den 5 Kontroll-DNAs sieht man ein normales doppeltes Vorkommen an Kopien des Gens (Abb. 9).



**Abbildung 9:** qRT-PCR Validierung der Duplikation am Chromosom 7 von Patient A50.

Da von den Eltern des Patienten A50 nur die Mutter verfügbar war, wurde zusätzlich die DNA-Probe des Bruders für die Validierung herangezogen. In Abbildung 10 kann man sowohl bei der Mutter als auch beim Bruder eine Duplikation im AUTS2-Genbereich erkennen (Abb. 10).

Aufgrund des durch die Real-Time PCR erhaltenen Zugewinns an DNA in den von den Primerpaaren begrenzten Bereichen bei der Mutter des Patienten, kann man davon ausgehen, dass die durch die Array-CGH detektierte Duplikation in der Patienten-DNA von der Mutter vererbt wurde und nicht *de novo* entstanden ist.



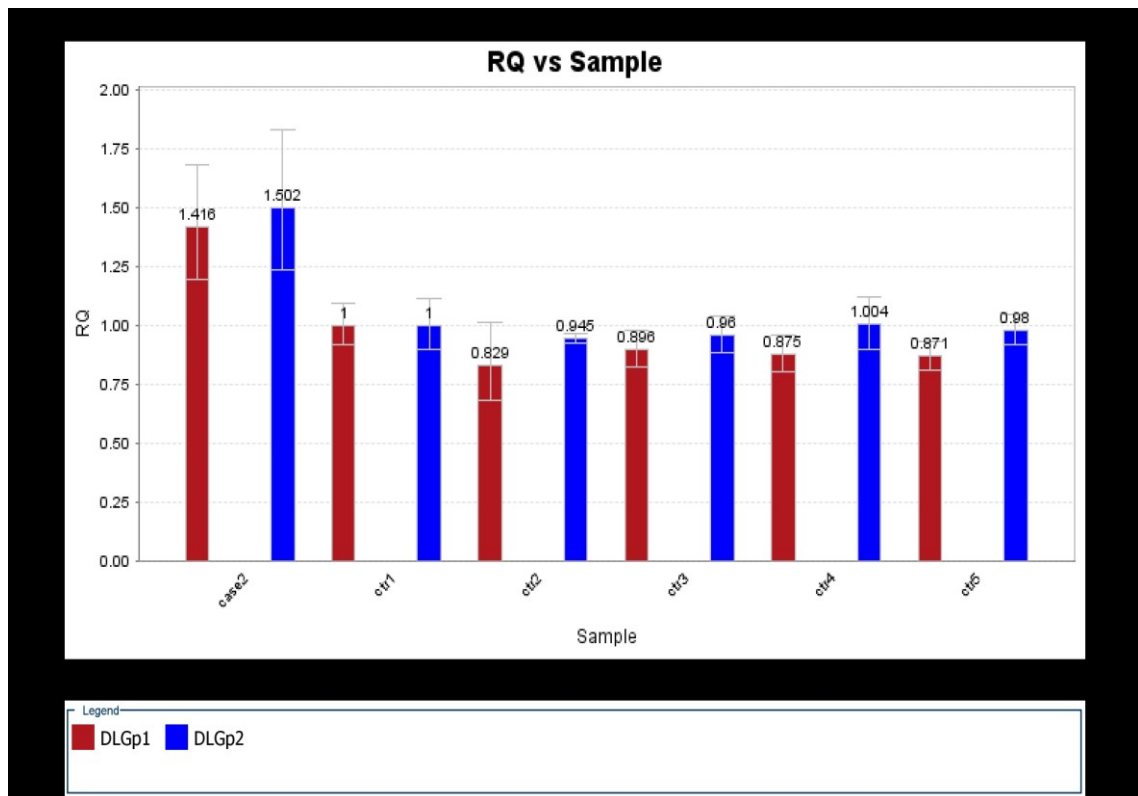
**Abbildung 10:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Bruders von Patient A50 im AUTS2 Gen.

### Patient A21:

**DLG2:** Das Gen kodiert für ein Protein das zur Membran-assoziierten Guanylat Kinase-Familie gehört. Eine Verbindung zu Ionenkanälen, Rezeptoren und Signalproteinen wurde in verschiedenen Publikationen bereits suspiert (Leonoudakis et al., 2004). Mehrere Isoformen des Gens sind bekannt.

Störungen im DLG2-Bereich als Mitverursacher von mentalen Erkrankungen wie Schizophrenie wurden veröffentlicht (MacLaren et al., 2011).

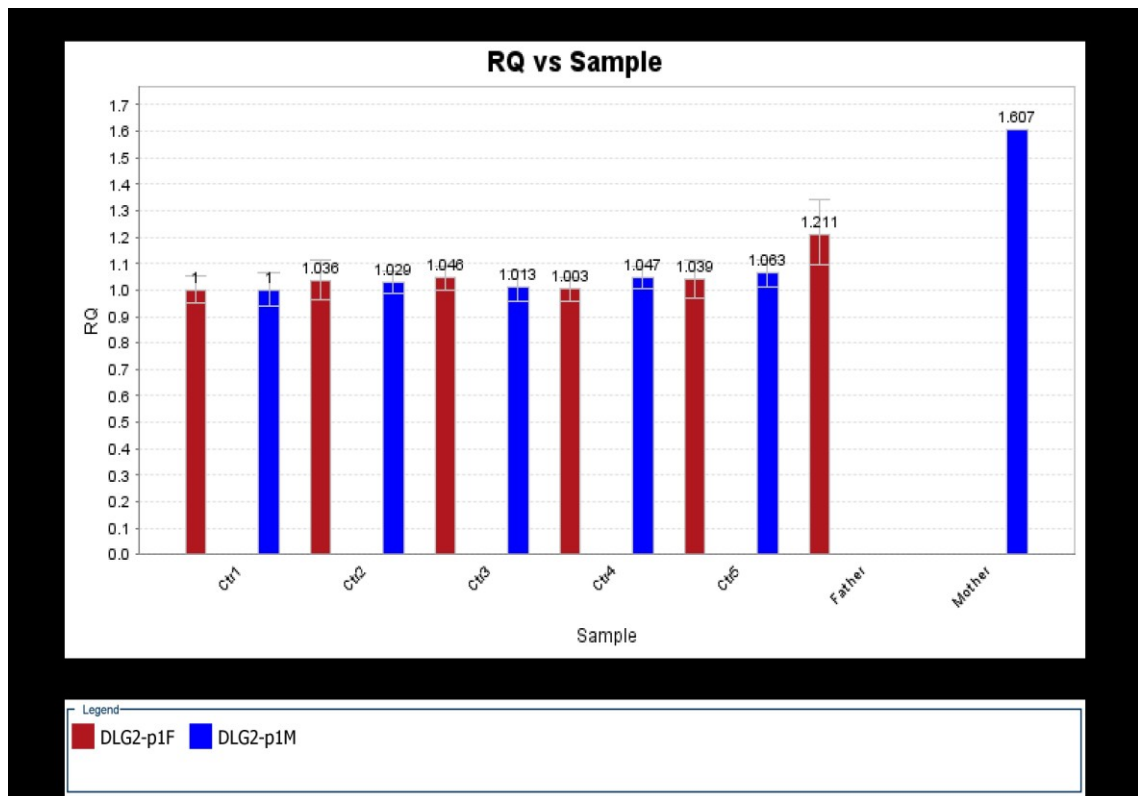
Eine zusätzliche Kopie im Bereich des DLG2-Gens konnte bei Patient A21 durch die Real-Time PCR bestätigt werden. Beide Graphen der Primerpaare zeigen einen Zugewinn des gewählten DNA-Abschnitts. Keine der Kontrollen weist eine Duplikation auf (Abb. 11).



**Abbildung 11:** : qRT-PCR Validierung der Duplikation am Chromosom 11 von Patient A21.

In Abbildung 12 ist eindeutig ein Zugewinn des durch den Primer eingegrenzten DNA-Abschnitts bei der Mutter des Patienten A21 zu erkennen, der beim Vater des Patienten und den Kontrollen nicht zu verzeichnen ist (Abb. 12).

Es ist davon auszugehen, dass die Veränderung der Kopienanzahl des DLG2-Gens von der Mutter vererbt und nicht während eines Rekombinationsvorganges neu entstanden ist.

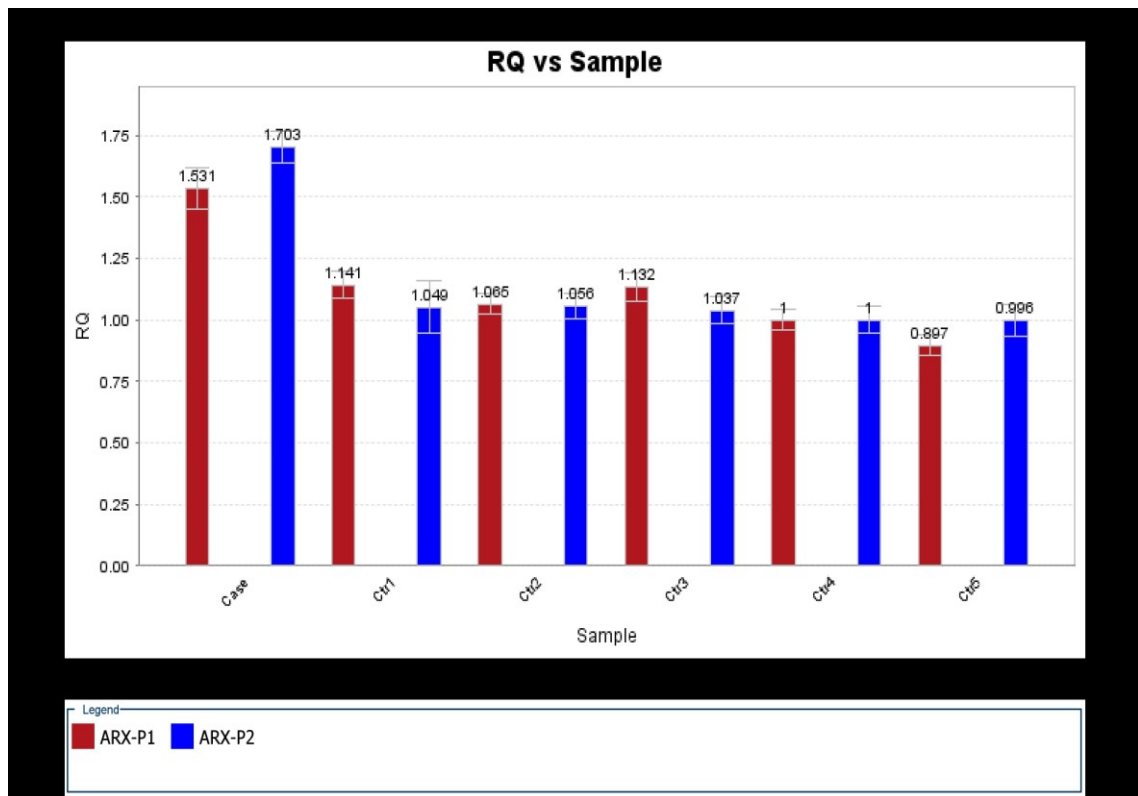


**Abbildung 12:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A21 im DLG2 Gen.

### Patient A150:

**ARX:** ARX ist ein am X-Chromosom befindliches Gen. Es ist ein Homeobox enthaltene Gen und wird während der Entwicklung exprimiert (Chaste et al., 2007). ARX wirkt als Transkriptionsfaktor, der für eine normale Gehirnentwicklung notwendig ist. Mutationen im ARX-Gen wurden mit intellektuellen Einschränkungen, Epilepsie, Ataxie und Autismus in Verbindung gebracht (Strømme et al., 2002).

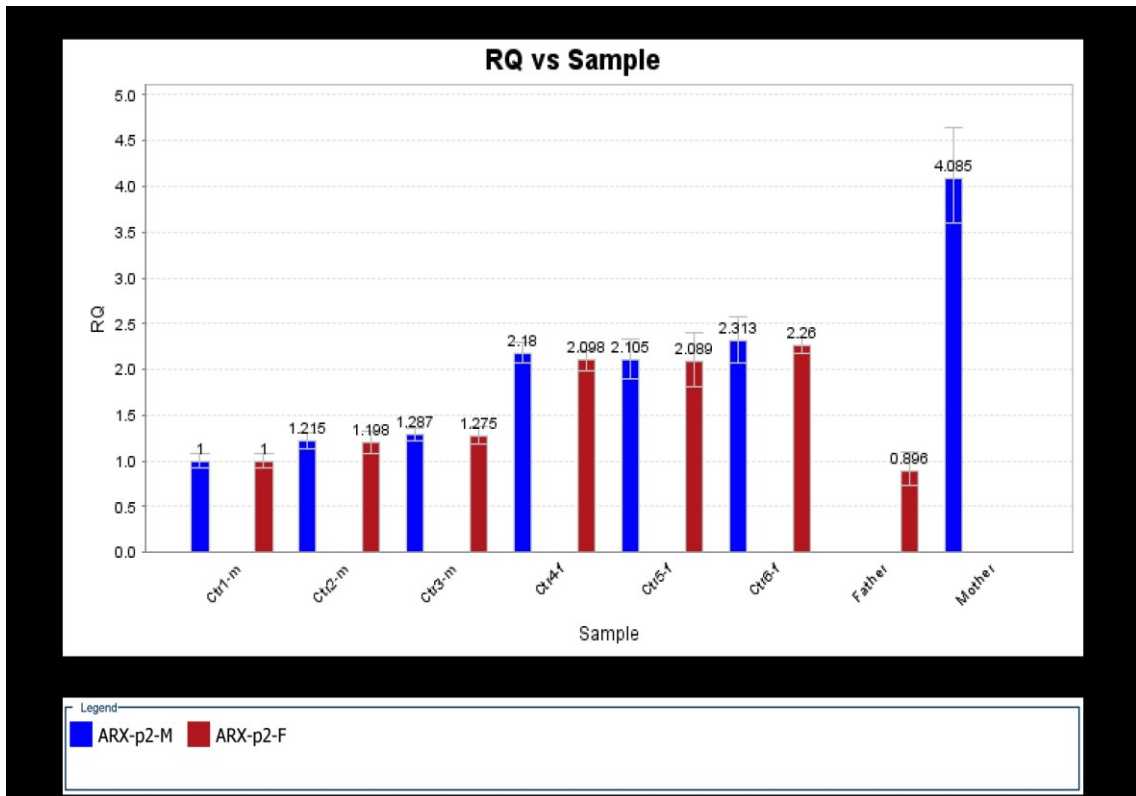
Das Real-Time PCR-Ergebnis von Patient A150 zeigt die Validität der durch die Array-CGH detektierten Duplikation. Keine der Kontroll-DNAs, die alle von männlichen Personen stammen, hat eine Duplikation in den durch die Primerpaare eingegrenzten DNA-Bereichen am X-Chromosom (Abb. 13).



**Abbildung 13:** qRT-PCR Validierung der Duplikation am Chromosom X von Patient A150.

In Abbildung 14 kann man gut erkennen, dass die 3 Kontroll-DNAs von männlichen Personen (Ctr1-m bis Ctr3-m) und der Vater des Patienten A150 einen „Loss“ im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen (Ctr4-f bis Ctr6-f) aufweisen. Dies ist auf das Vorhandensein von nur einem X-Chromosom beim Karyotyp des Mannes und 2 X-Chromosomen im Genom der Frau zurückzuführen. Eine Duplikation im direkten Vergleich zu den weiblichen DNA-Proben ist bei der Mutter des Patienten zu erkennen (Abb. 14).

Da die Mutter des Patienten auch einen Zugewinn im ARX-Bereich zeigt, kann man von einer Vererbung der genomischen Aberration ausgehen.

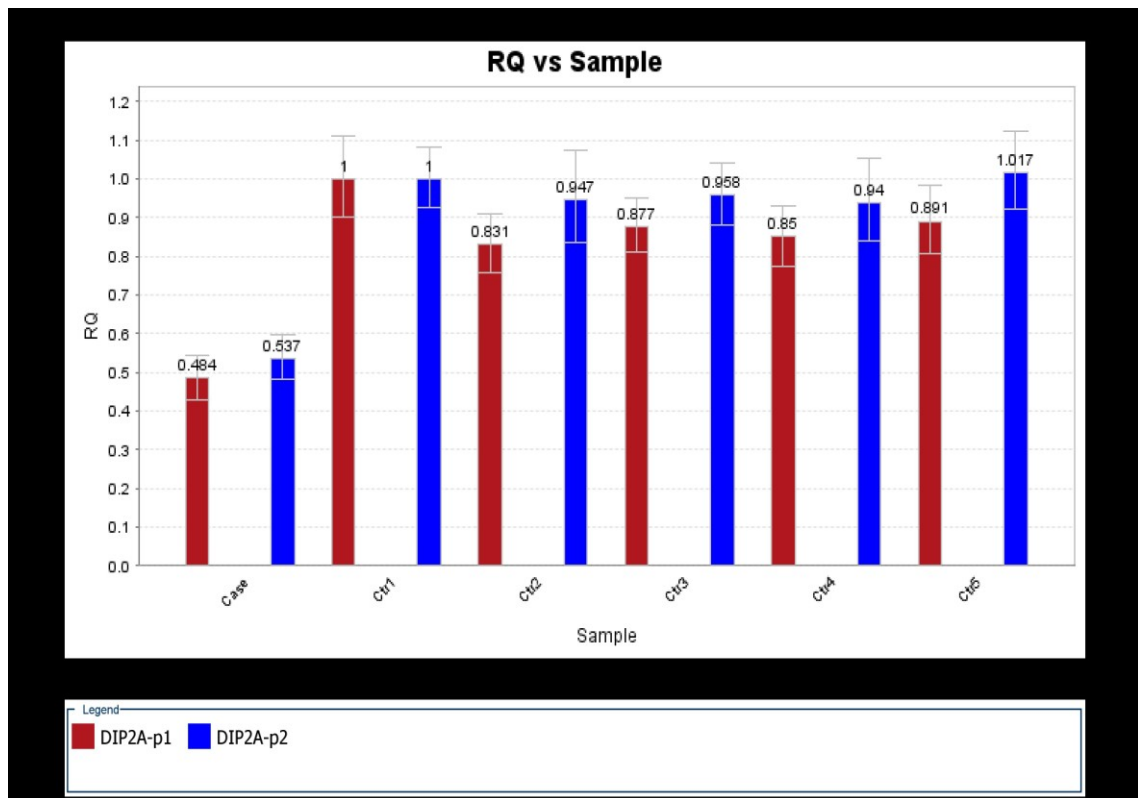


**Abbildung 14:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A150 im ARX Gen.

### Patient A161:

**DIP2A:** Das durch dieses Gen exprimierte Protein könnte Einfluss auf die Exonbildung und -strukturierung im Zentralnervensystem haben. DIP2A fungiert außerdem als Rezeptor für das extrazelluläre Glykoprotein FSTL1 (Ouchi et al., 2010). Verschiedene Isoformen hat man bereits gefunden. Ein Zusammenhang zwischen Legasthenie und Veränderungen in DIP2A ist bekannt (Poelmans et al., 2009).

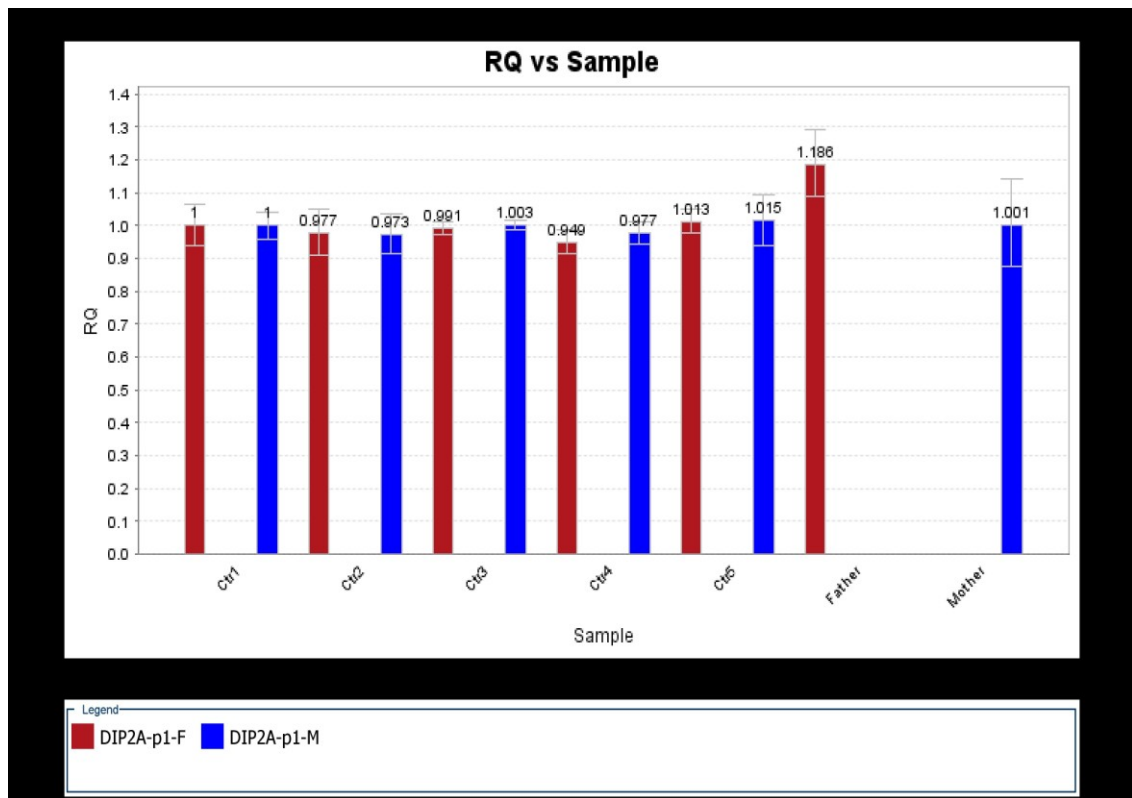
In Abbildung 15 sieht man, dass beide von den Primerpaaren eingegrenzten DNA-Bereiche am DIP2A Gen des Patienten einen „Loss“ aufweisen, der in den 5 Kontroll-DNAs nicht zu verzeichnen ist. Dies bestätigt das Ergebnis der Array-CGH (Abb. 15).



**Abbildung 15:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 21 von Patient A161.

Weder die Mutter noch der Vater des Patienten A161 weisen eine Deletion am Chromosom 21 auf, wie das Ergebnis der Real-Time PCR in Abbildung 16 zeigt (Abb. 16).

Das Nicht-Auftreten der Deletion im Genbereich der Eltern weist darauf hin, dass es sich im vorliegenden Fall um eine neu entstandene Veränderung im Genom des Patienten handelt, die wahrscheinlich beim ungleichen Crossing-over während eines Rekombinationsvorganges entstanden ist.

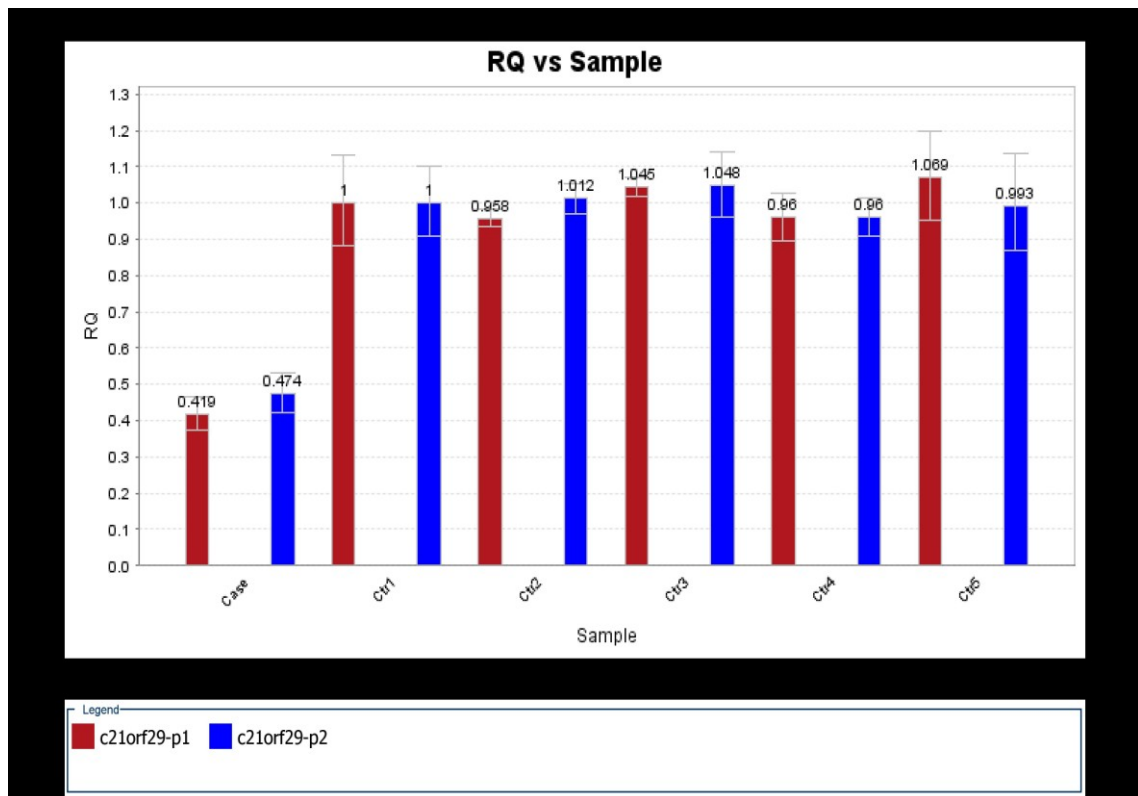


**Abbildung 16:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A161 DIP2A Gen.

**Patient A161:**

**C21orf29:** Chromosom 21 open reading frame 29 wurde assoziiert mit Bipolarer affektiver Störung. Das Protein wird im Gehirn exprimiert. Außerdem wurden Veränderungen im exprimierten Peptid mit Epilepsie bei Mäusen in Verbindung gebracht (McQuillin et al., 2006).

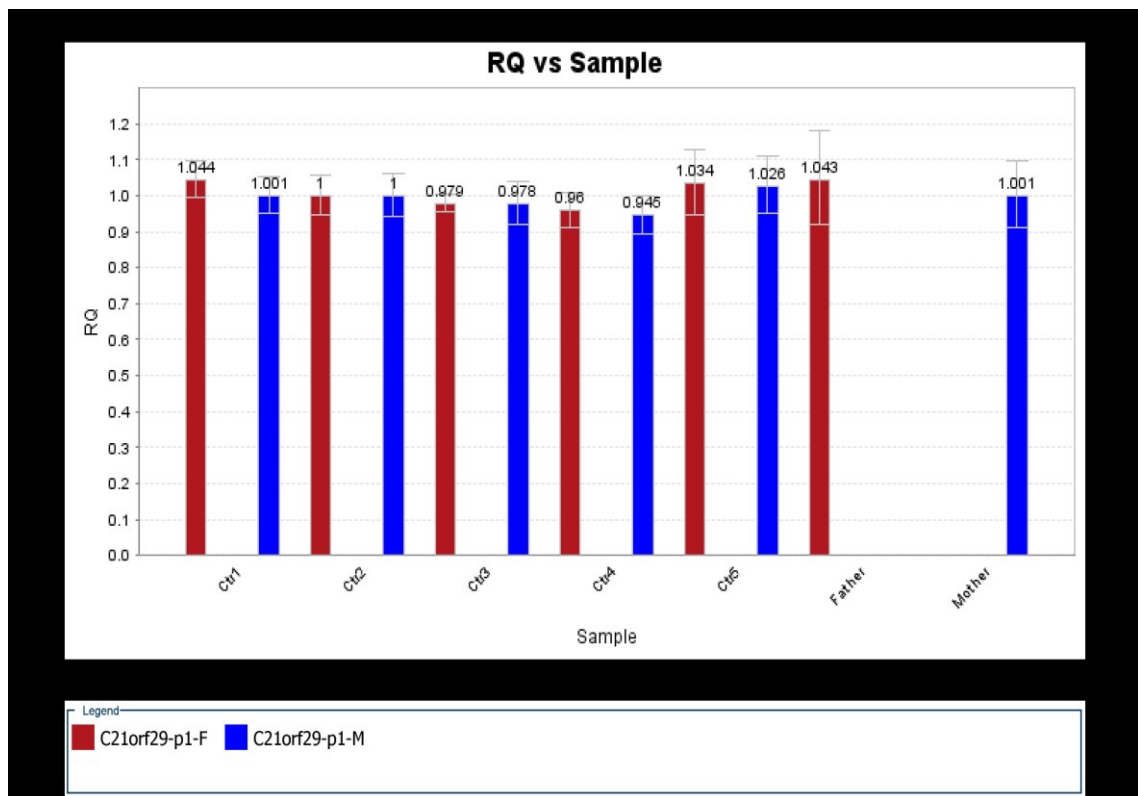
Die Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der qRT-PCR-Validierung von nur einer Kopie, also einer Deletion, im C21orf29-Bereich im Genom des Patienten A161. Das Array-CGH-Ergebnis ist bestätigt. Beide von Primern begrenzten Genomabschnitte zeigen einen „loss“, der in keiner der 5 Kontroll-DNAs zu sehen ist (Abb. 17).



**Abbildung 17:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 21 von Patient A161.

In keinem der Eltern des Patienten A161 scheint eine Deletion im c21orf29 Bereich am Chromosom 21 im Ergebnis der Real-Time PCR auf (Abb. 18).

Man kann davon ausgehen, dass es sich bei der Deletion am Chromosom 21 von Patient A161 um eine neu entstandene Veränderung im Genom des Patienten handelt, da diese nicht bei den Eltern auftritt.

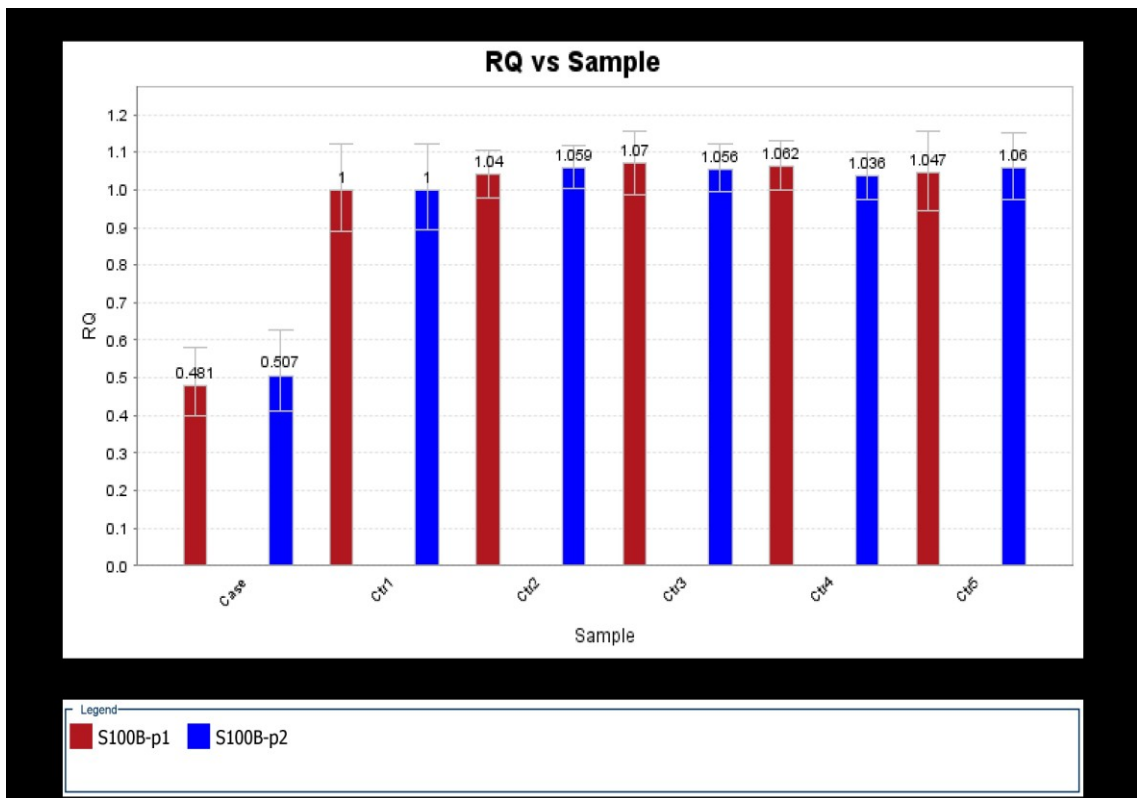


**Abbildung 18:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A161 am C21 open reading frame 29.

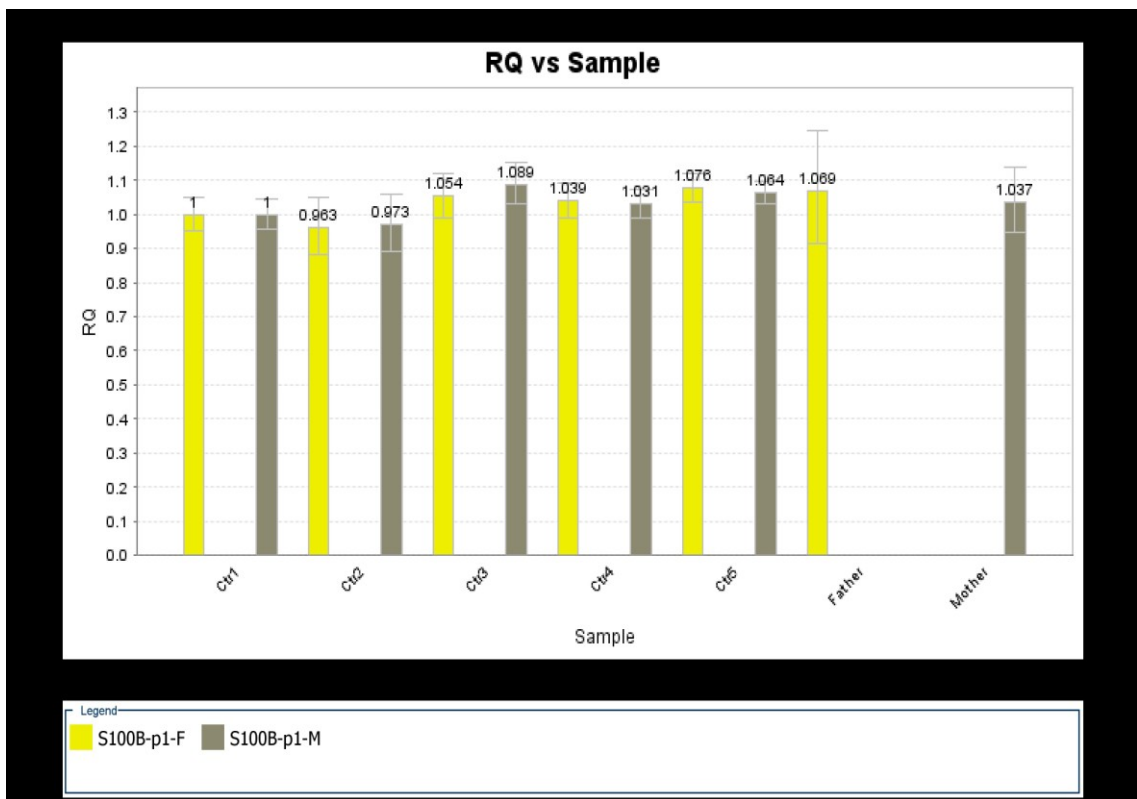
### Patient A161:

**S100B:** Das Protein des S100B Gens hat die Fähigkeit mit anderen Proteinen zu interagieren und wirkt so regulativ auf intrazelluläre Wachstums-, Differenzierungs- und Stoffwechselfvorgänge. Es hat neurotrophe Eigenschaften auf neuronale und astrozytäre Zellpopulationen in vitro gezeigt. Es wurde mit Alzheimer Demenz, Trisomie 21 und multipler Sklerose bereits in Verbindung gebracht (Quincozes-Santos et al., 2008; S. Schmidt, 1998).

Das Ergebnis der Real-Time PCR bestätigt eindeutig einen „Loss“ am Gen S100B des Chromosom 21 im Patienten A161. Keine der 5 Kontrollen zeigt einen Verlust an genetischem Material im gewählten Genbereich (Abb. 19).



**Abbildung 19:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 21 von Patient A161.



**Abbildung 20:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A161 am S100B Gen.

In Abbildung 20 kann man erkennen, dass weder Mutter noch Vater des Patienten einen Verlust im Bereich des S100B Gens aufweisen (Abb. 20).

Man kann davon ausgehen, dass die Veränderung im Genom durch ein ungleiches Crossing-over während eines Rekombinationsvorganges neu entstanden ist.

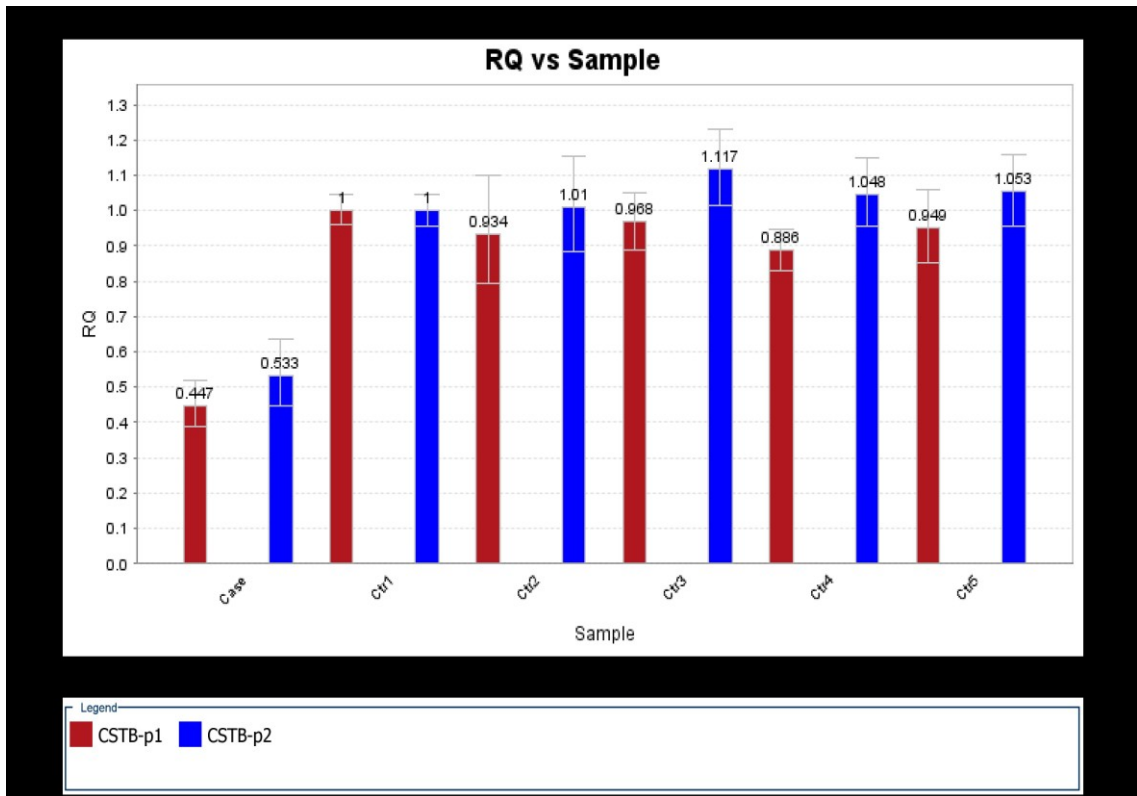
### **Patient A161:**

**CSTB:** Eine Veränderung im Gen, das für CystatinB codiert ist laut Literatur für die Unverricht-Lundborg-Erkrankung ursächlich. Mutationen im CSTB Gen sind zuständig für das Krankheitsbild der Epilepsie mit progredienten/progressiven Myoklonien Typ 1 (EPM1) (Koskenkorva et al., 2012; E. Pinto et al., 2011).

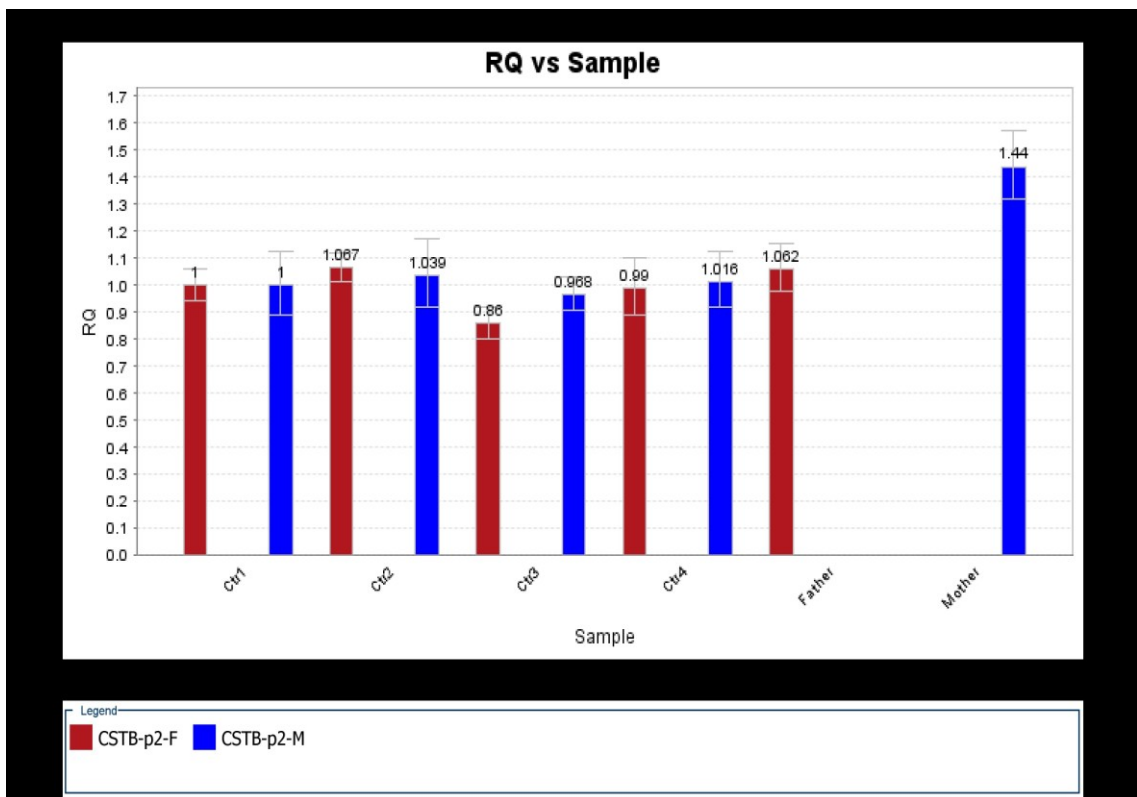
In den von den beiden Primerpaaren eingegrenzten Bereichen des Chromosom 21 ist durch die Real-Time PCR bestätigt, dass eine Deletion beim Patienten A161 vorliegt (Abb. 21).

Der Vater des Patienten A161 weist keine Veränderung im Bereich des CSTB Gens auf, bei der Mutter zeigt das Real-Time PCR Ergebnis eine Duplikation im genannten Bereich (Abb. 22).

Da der Patient A161 eine Deletion, der Vater keine Veränderung und die Mutter einen Zugewinn an DNA im CSTB-Gen aufweisen, kann man bei der vorliegenden Mutation von einer *de novo*, also neu entstandenen Veränderung ausgehen.



**Abbildung 21:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 21 von Patient A161.



**Abbildung 22:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A161 im Bereich des CSTB Gen.

## **Patient A2:**

**CHRNA7:** Neuronal acetylcholine rezeptor subunit alpha7, das Protein für das CHRNA7 codiert, hat Wirkung auf die Nikotinrezeptoren im Gehirn.

Duplikationen im Genbereich sind mit einem erhöhten Risiko für ADHD bekannt (N. Williams et al., 2011). Auch wurden Veränderungen am CHRNA7 Gen bereits mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Entwicklungsstörungen, intellektueller Einschränkung und Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert (Mikhail et al., 2011).

Die qRT-PCR hat den bei der Array-CGH berechneten Verlust an DNA in Patient A2, am Chromosom 15, im Bereich des CHRNA7 Gens bestätigt. Die Kontroll-Proben weisen die Veränderung nicht auf (Abb. 23).

Ein „Loss“ im gewählten DNA-Bereich ist nicht bei der Mutter, aber im Genom des Vaters von Patient A2 zu erkennen. Keine der Kontroll-DNAs zeigt einen Zugewinn oder Verlust in dem von den beiden Primerpaaren eingegrenzten Chromosomenbereich (Abb. 24).

Da auch der Vater des Patienten die Veränderung in der Kopienanzahl am Chromosom 15 aufweist, kann man davon ausgehen, dass es sich um eine vom Vater vererbte Mutation handelt.

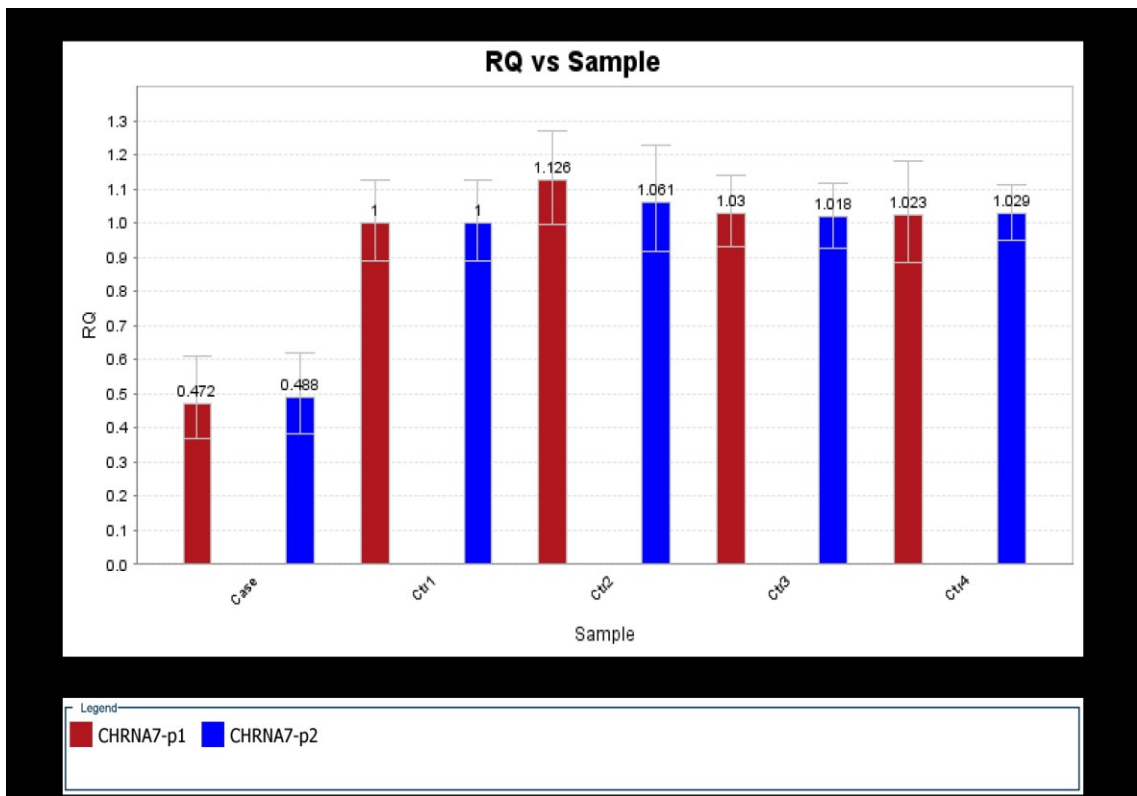


Abbildung 23: qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 15 von Patient A2.

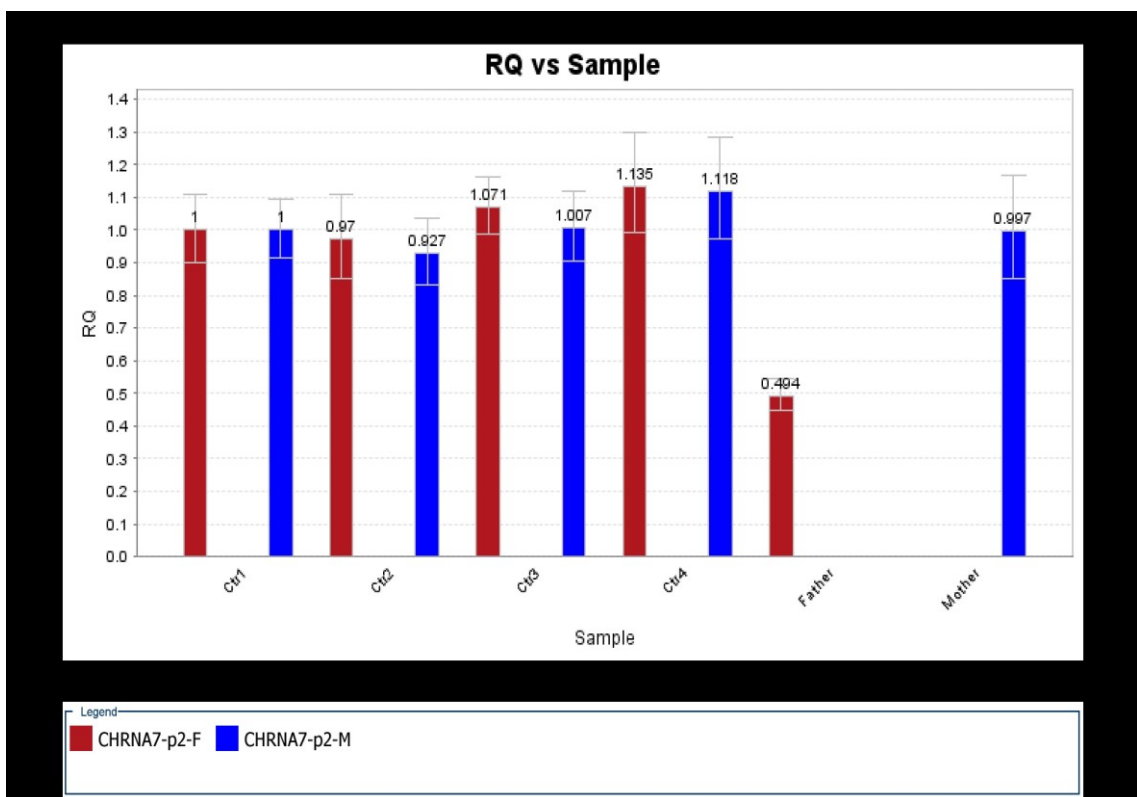


Abbildung 24: qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A2 im Bereich des CHRNA7 Gen.

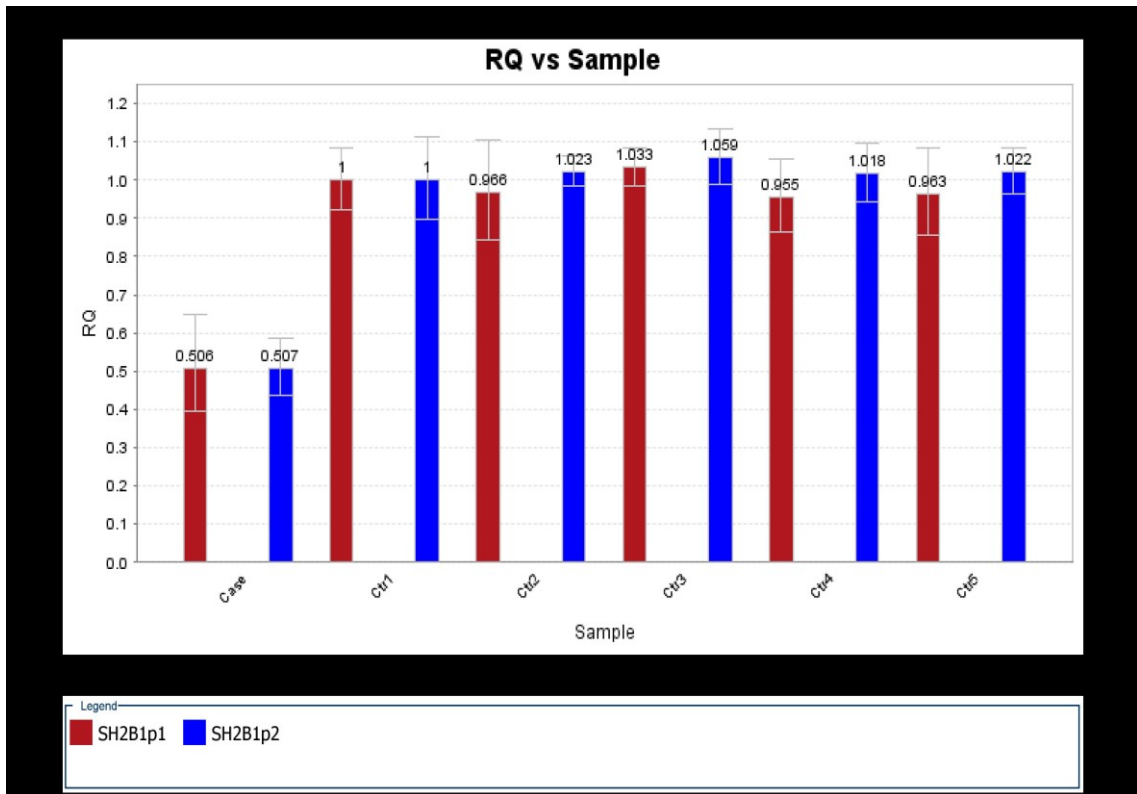
### **Patientin A136:**

**SH2B1:** SH2B1 codiert für ein Protein, das als Adapter für verschiedene Proteine der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren-Familie fungiert. Duplikationen und Deletionen am Gen des Chromosom 16 sind schon mit verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankung wie intellektueller Einschränkung, Autismus-Spektrum-Störungen aber auch mit Adipositas in Verbindung gebracht worden (Bochukova et al., 2011; Speliotes et al., 2011; Tabet et al., 2012).

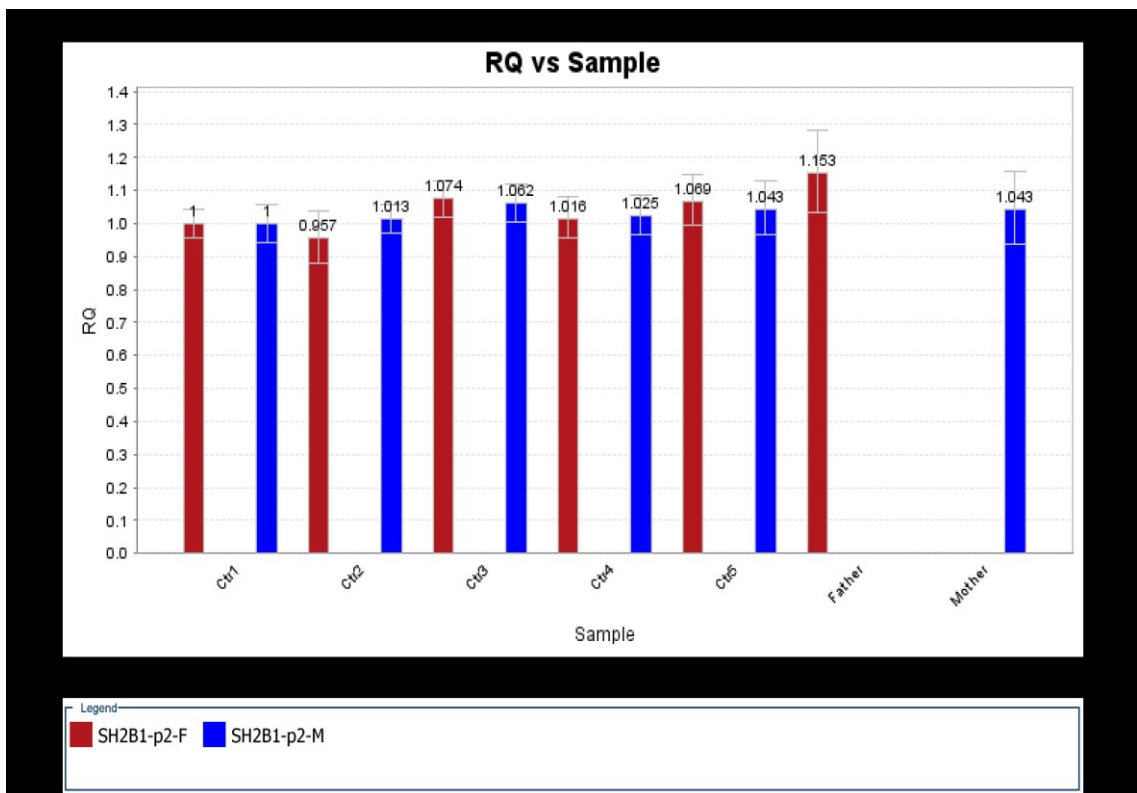
Abbildung 25 zeigt einen Verlust an genomischer DNA im Bereich des SH2B1 Gens am Chromosom 15. Nur die Patientin weist die Deletion auf. Keine der Kontrollen zeigen eine Veränderung der Kopienanzahl im Genbereich (Abb. 25).

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, zeigt weder die väterliche noch die mütterliche DNA einen Zugewinn oder Verlust an DNA im SH2B1 Bereich (Abb. 26).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich im vorliegenden Fall der Patientin A136 um eine *de novo* entstandene chromosomale Veränderung handelt die durch ein ungleiches Crossing-over während der Rekombination entstanden ist, da diese nicht bei den Eltern auftritt.



**Abbildung 25:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 16 von Patientin A136.



**Abbildung 26:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patientin A161 im Bereich des SH2B1 Gen.

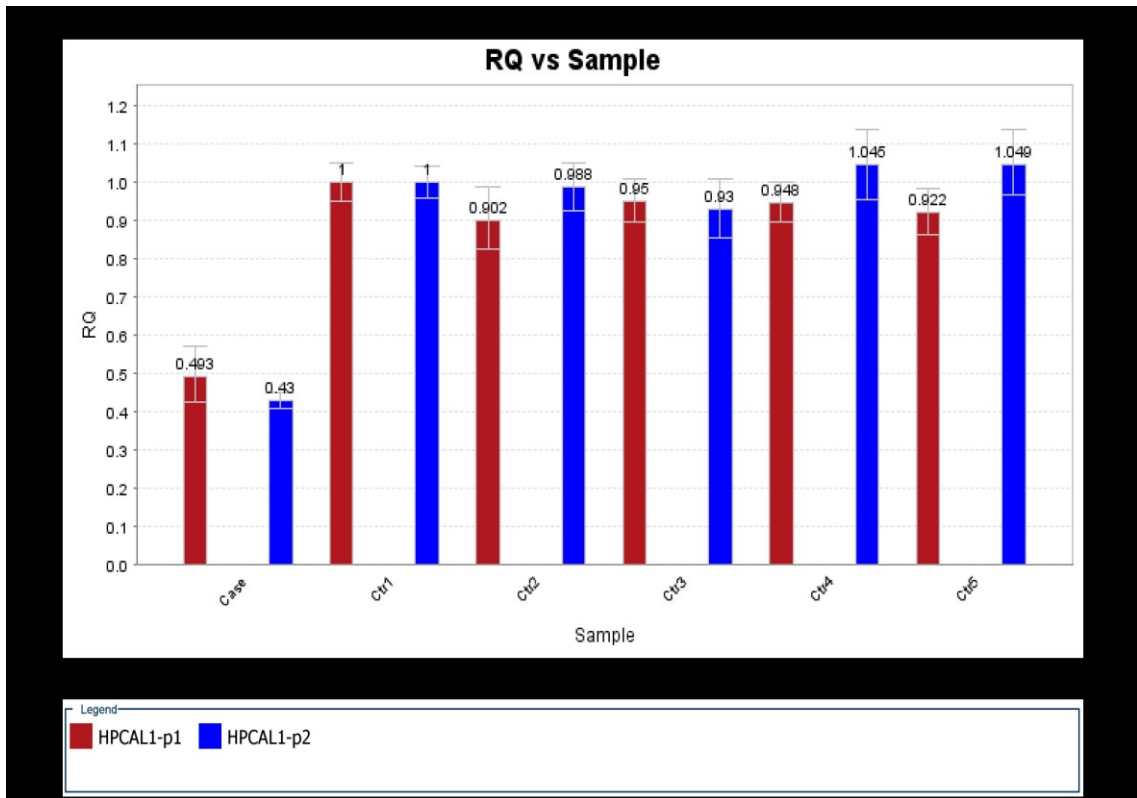
**Patient A62:**

**HPCAL1:** Das Protein wofür HPCAL1 codiert gehört zu den neurospezifisch-kalziumbindenden Proteinen und das Vorkommen ist im Gehirn und der Retina bekannt (Colombo et al., 2009). Papers über eine Assoziation mit Asthma (Imada et al., 2009) und CNVs im HPCAL1-Bereich von Neuroblastomzellen wurden in den vergangenen Jahren veröffentlicht (Beheshti et al., 2003).

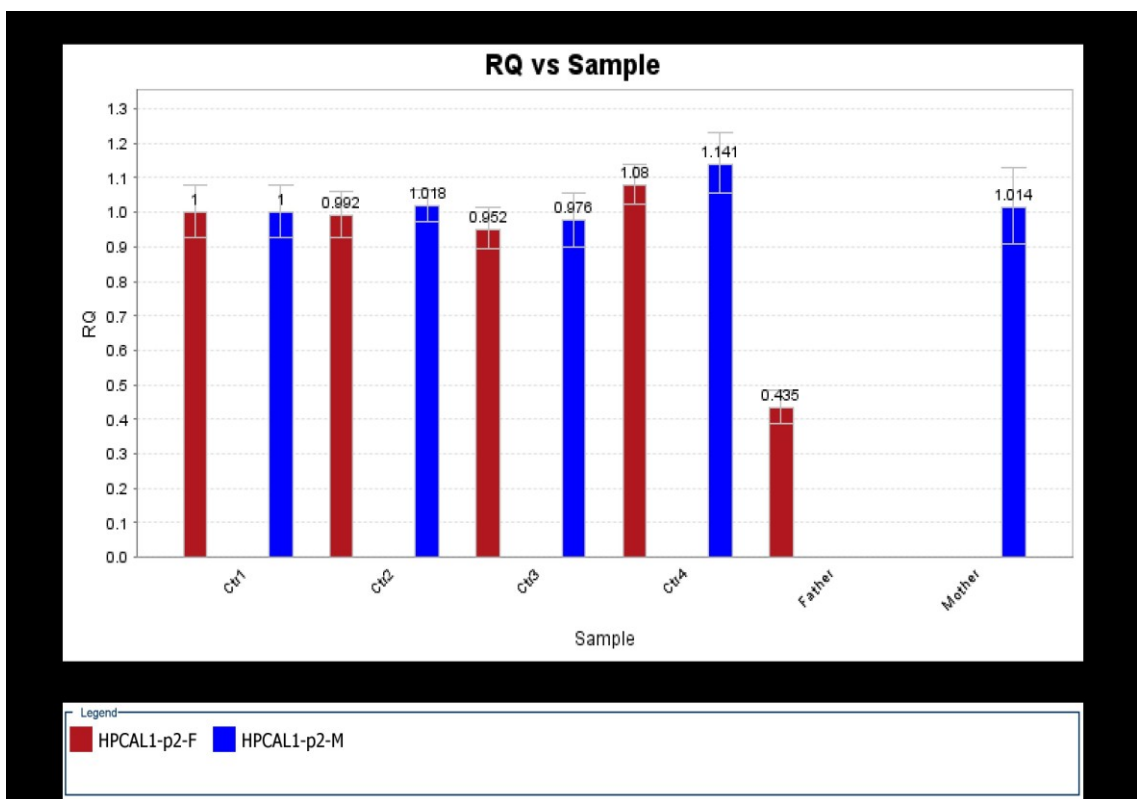
Die Validierung des durch die Array-CGH gefundenen Verlusts an DNA im Bereich des HPCAL1 Gens am Chromosom 2 bei Patient A62 brachte ein übereinstimmendes Ergebnis. Keine der Kontrollproben zeigte den Verlust am Chromosom 2 (Abb. 27).

Die Mutter zeigte im genannten Genbereich keine Veränderung der Kopienanzahl. Beim Vater konnte jedoch auch der Verlust einer Kopie im von den Primerpaaren begrenzten Genbereich festgestellt werden (Abb. 28).

Man kann davon ausgehen, dass die vorliegende genomische Aberration bei Patient A62 vom Vater vererbt wurde und nicht neu entstanden ist.



**Abbildung 27:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 2 von Patient A62.



**Abbildung 28:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patient A62 im Bereich des HPCAL1 Gen.

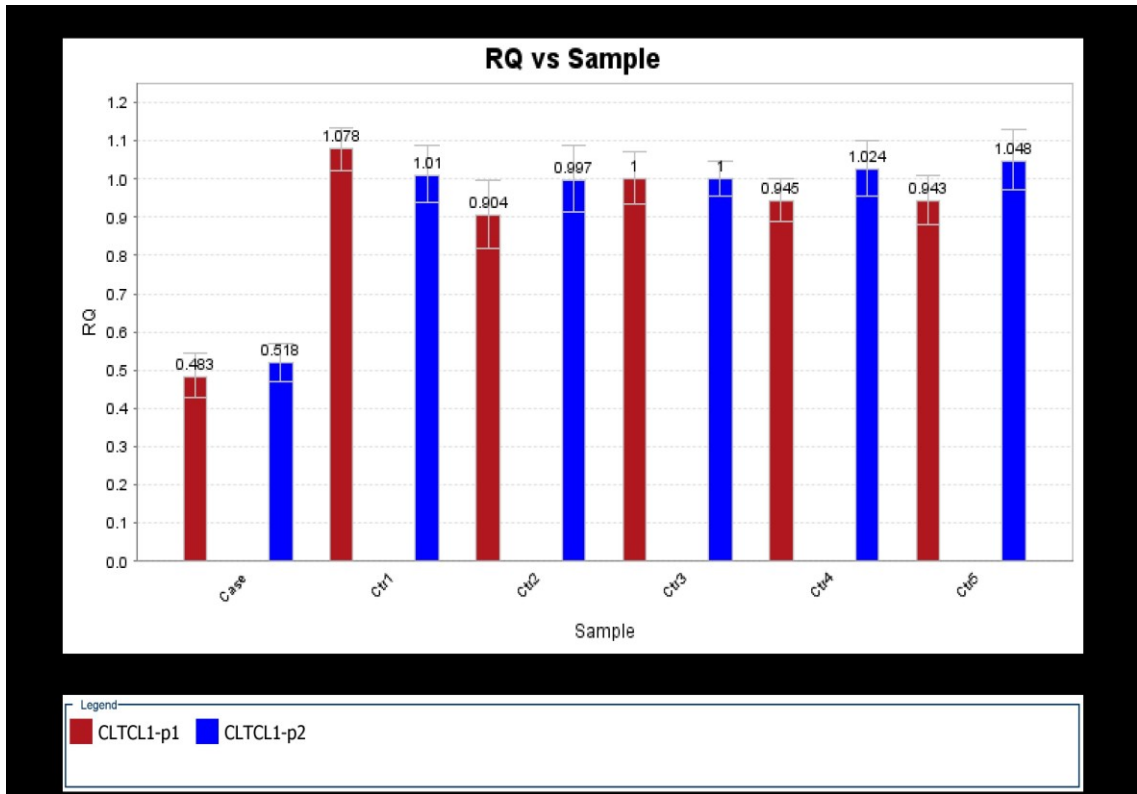
### **Patientin A38:**

**CLTCL1:** Dieses Gen gehört zur Clathrin-Heavy-Chain-Familie und codiert für ein wichtiges Protein, das für die polyedrische Ummantelung von umschlossenen Vesikeln notwendig ist. Aberrationen im Bereich dieses Gens wurden assoziiert mit Meningiomen, DiGeorge-Syndrom und Velo-Cardio-Facial-Syndrom (Long et al., 1996).

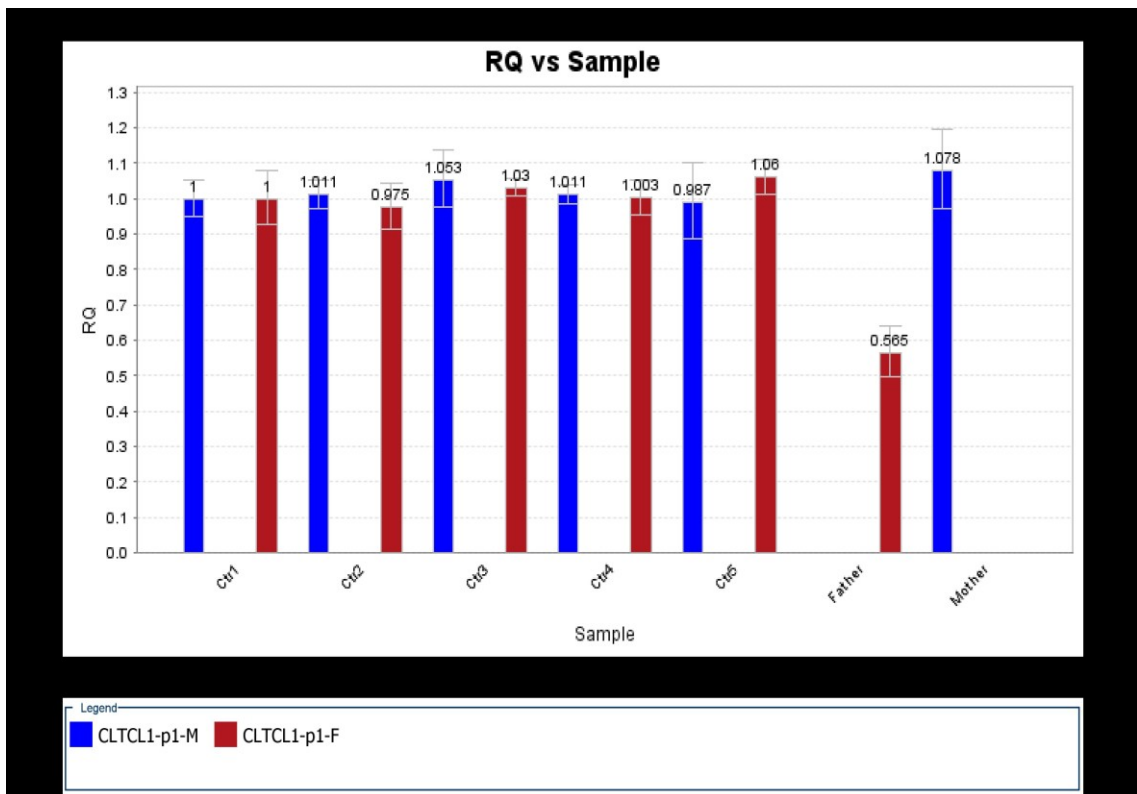
Im Bereich des CLTCL1 Gens am Chromosom 22 konnte eine Deletion in der Patienten-DNA A38 mittels Real-Time PCR bestätigt werden, die nicht in den Kontrollen aufscheint (Abb. 29).

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass keine der Kontrollproben und auch nicht die DNA-Probe der Mutter, einen „Loss“ aufweist. Allerdings ist beim Vater auch ein Verlust einer Kopie der DNA im Genbereich von CLTCL1 zu verzeichnen (Abb. 30).

Da auch der Vater eine Deletion im CLTCL1 Gen aufweist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich im vorliegenden Fall um eine vererbte Veränderung im genetischen Material der Patientin A38 handelt.



**Abbildung 29:** qRT-PCR Validierung der Deletion am Chromosom 22 von Patientin A38.

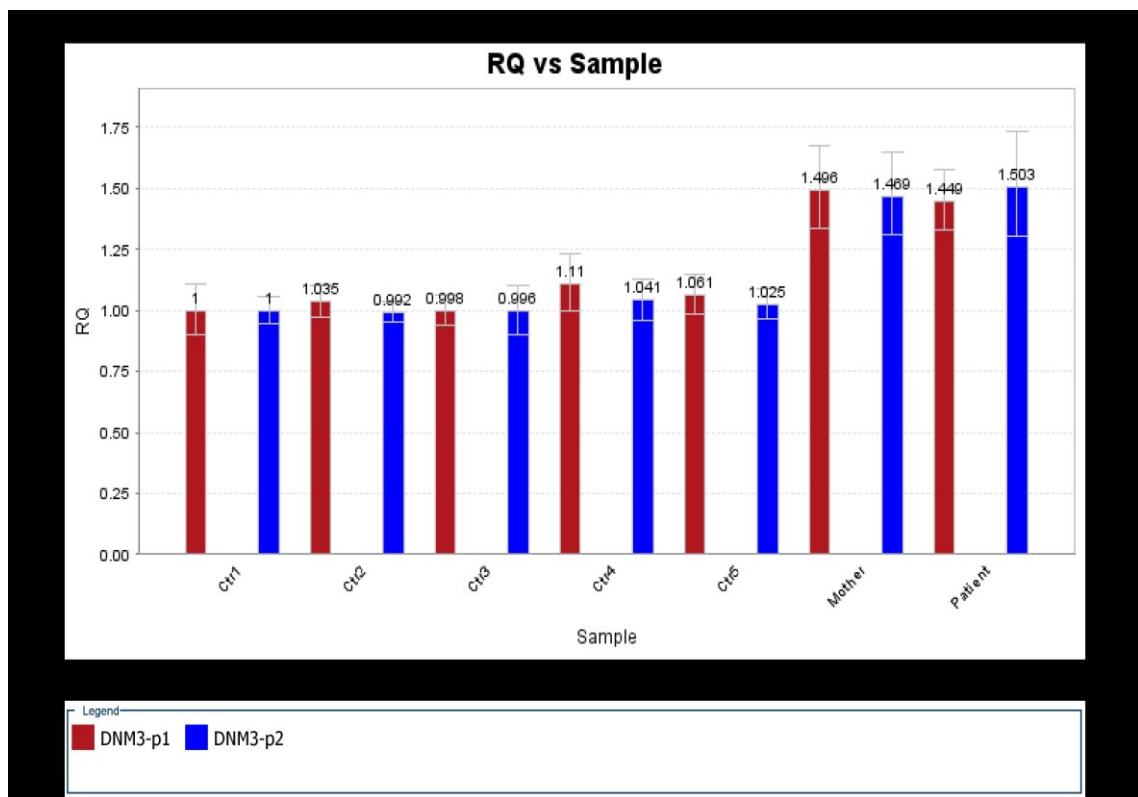


**Abbildung 30:** qRT-PCR Ergebnis der Mutter und des Vaters von Patientin A38 im Bereich des CLTCL1 Gen

## Patient A217:

**DNM3:** DNM3 gehört zur Dynamin-Familie. Diese besitzen mechano-chemische Eigenschaften und sind in Aktin-Membran Prozessen, vor allem in der Membranbildung involviert. Das zugehörige Protein findet sich im Gehirn, ist Teil des Shank-Homer-Komplexes und steigert die synaptische Wirkkraft. Mikrodeletionen im Genbereich wurden mit Wachstumsverzögerung, Mikrozephalie, kleinen Händen und schweren kognitiven Defiziten assoziiert (Burkardt et al., 2011; Heid et al., 2011).

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Real-Time PCR von Patient A217 und seiner Mutter. Sowohl Patient als auch Mutter weisen eine Duplikation im Bereich des DNM3 Gens am Chromosom 1 auf, die bei keiner der Kontrollen zu erkennen ist (Abb. 31). Die genomische Veränderung in der DNA des Patienten A217 ist also höchstwahrscheinlich von der Mutter auf den Patienten vererbt worden und nicht *de novo* entstanden.



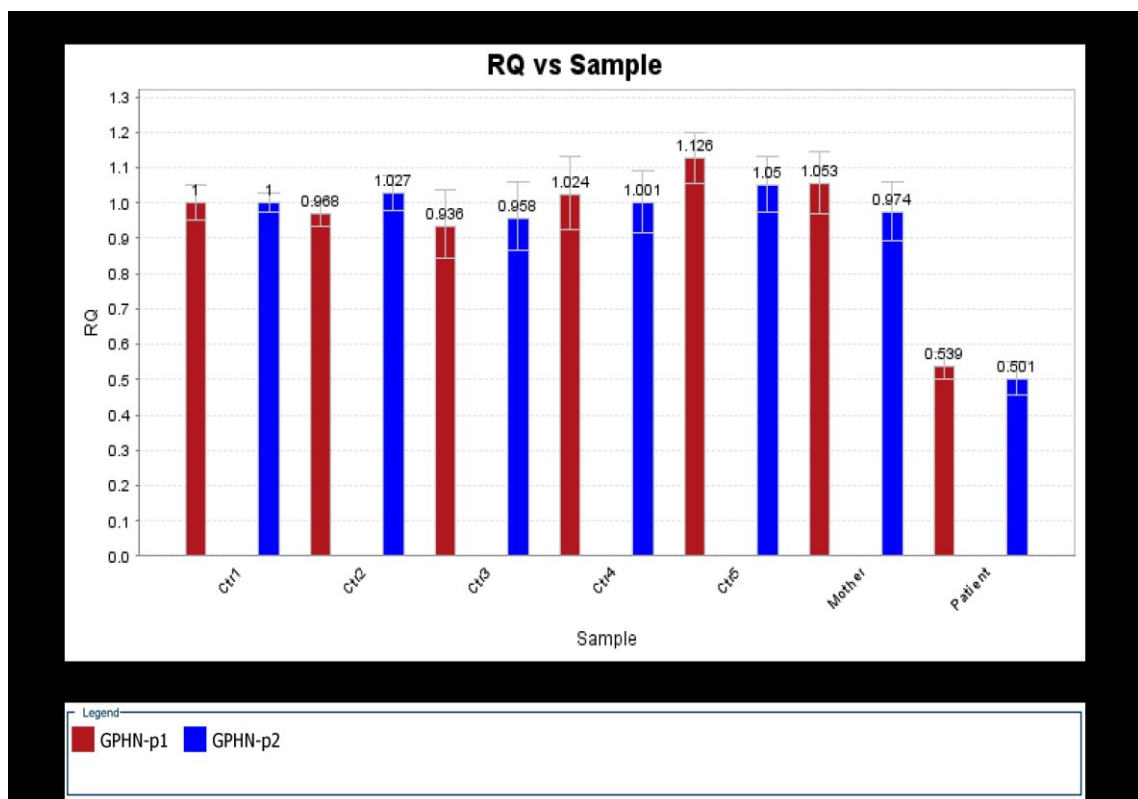
**Abbildung 31:** qRT-PCR Validierung der Duplikation am Chromosom 1 von Patient A217 und seiner Mutter.

## Patientin A182:

**GPHN:** Dieses Gen codiert für ein neuronales Protein das Rezeptoren für Neurotransmitter im postsynaptischen Zytoskelett verankert (David-Watine, 2001). In nichtneuronalem Gewebe ist das Protein auch notwendig für die Molybdän-Cofaktor-Biosynthese. Daher können Veränderung im Genbereich zu metabolischen Erkrankungen führen (Reiss et al., 2011).

Das Array-CGH Ergebnis, das einen Verlust an genomischer DNA am Chromosom 14 bei Patientin A182 aufwies konnte mithilfe der Real-Time PCR bestätigt werden. Weder Mutter noch eine der Kontrollen, zeigten die bei der Patientin vorliegende Deletion (Abb. 32).

Da wir im vorliegenden Fall nur die DNA-Probe der Patientin und ihrer Mutter zur Verfügung hatten, ist eine Bewertung hinsichtlich Vererbung oder *de novo* - Entstehung nicht möglich. Die väterliche DNA war leider nicht verfügbar.



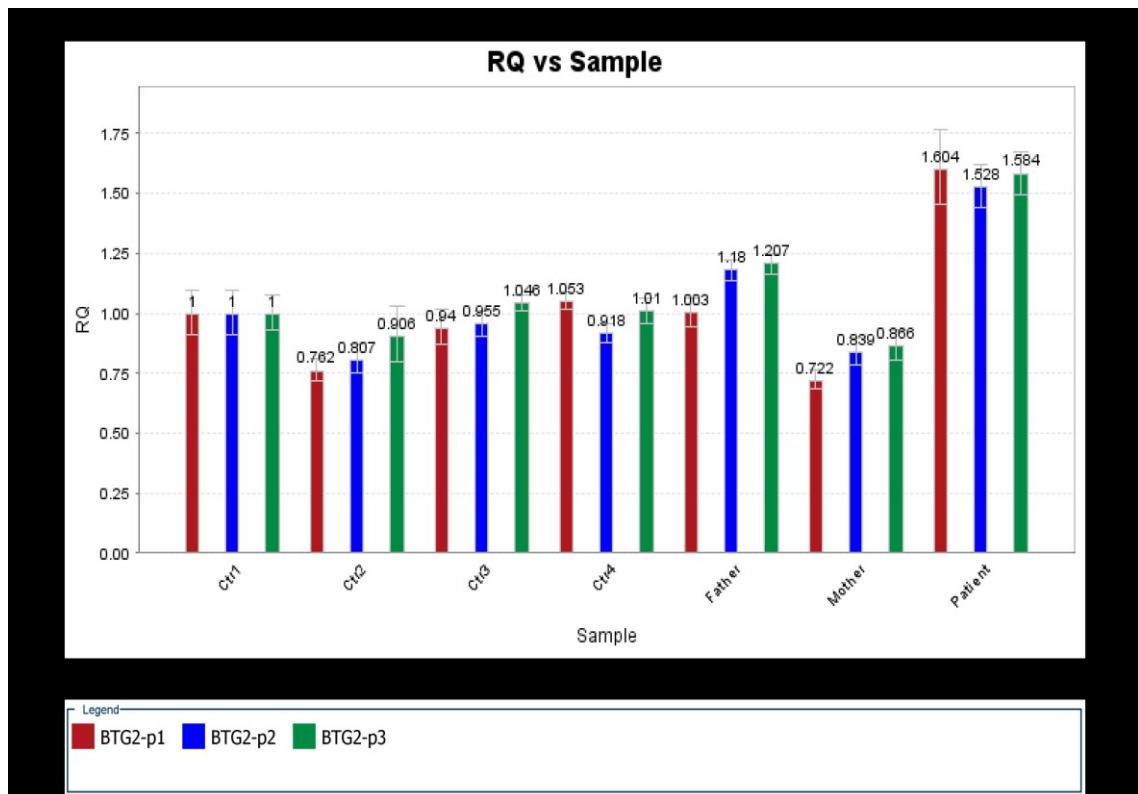
**Abbildung 32:** qRT-PCR Validierung der Deletion im Bereich des GPHN Gens am Chromosom 14 bei Patientin A182 und ihrer Mutter.

### Patient A194:

**BTG2:** BTG2 codiert für ein Protein, das bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt. Außerdem vermutet man, dass es bei Wachstum und der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen sowie beim Auswuchs von Neuriten involviert ist (Berthet et al., 2002; Miyata et al., 2008; El-Ghissassi et al., 2002).

Ein Zugewinn an genomischer DNA des BTG2 Gens konnte bei Patient A194 durch die Real-Time PCR bestätigt werden. Weder Vater oder Mutter, noch eine der Kontrollen zeigten dasselbe Ausmaß an Zugewinn des erwähnten DNA-Abschnitts (Abb. 33).

Dass es sich beim Zugewinn an genomischer DNA in Patient A194 um eine im Zuge eines Rekombinationsprozesses neu entstandene genomische Veränderung handelt, scheint naheliegend.



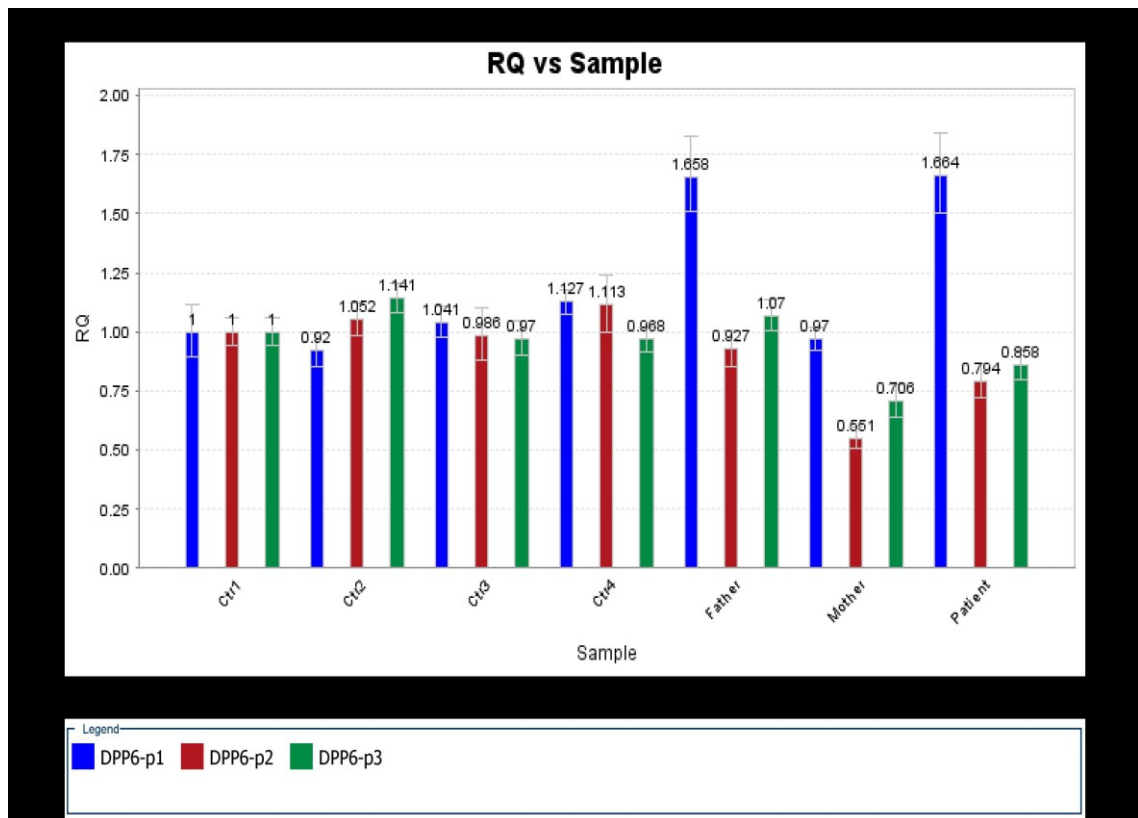
**Abbildung 33:** qRT-PCR Validierung der Duplikation im Bereich des BTG2 Gens am Chromosom 1 bei Patient A194 und dessen Eltern.

### **Patient A210:**

**DPP6:** Dieses Gen codiert für ein Single-Pass-TypII-Membranprotein. Es spielt wahrscheinlich eine Rolle bei den physiologischen Prozessen im Gehirn (Du et al., 2011). Es kann die Zelloberflächenexpression und die Aktivität von Kaliumkanälen modulieren (Sun et al., 2011). Veränderungen im genannten Genbereich wurden bereits mit Autismus-Spektrum-Störungen und intellektueller Einschränkung beim Menschen assoziiert (Christian R Marshall et al., 2008; Noor et al., 2010).

Auf Abbildung 34 ist die Real-Time PCR Validierung eines „Gain“, der durch die Array-CGH im Bereich des DPP6 Gens detektiert wurde, zu sehen. Nur in einem der 3 Primerpaarbereiche zeigt die Real-Time PCR einen Zugewinn. Dieser Zugewinn ist bei keiner der Kontrollen und auch nicht bei der Mutter erkennbar. Der Patient und dessen Vater zeigen den Zugewinn nur im Primerbereich 1 (DPP6-p1) (Abb. 34).

Man kann von einer Vererbung der gezeigten Duplikation vom Vater des Patienten A210 ausgehen, die sich aber nicht über die gesamte Länge des DPP6-Gens erstreckt.



**Abbildung 34:** qRT-PCR Validierung der Duplikation im Bereich des DPP6 Gens am Chromosom 7 bei Patient A210 und dessen Eltern.

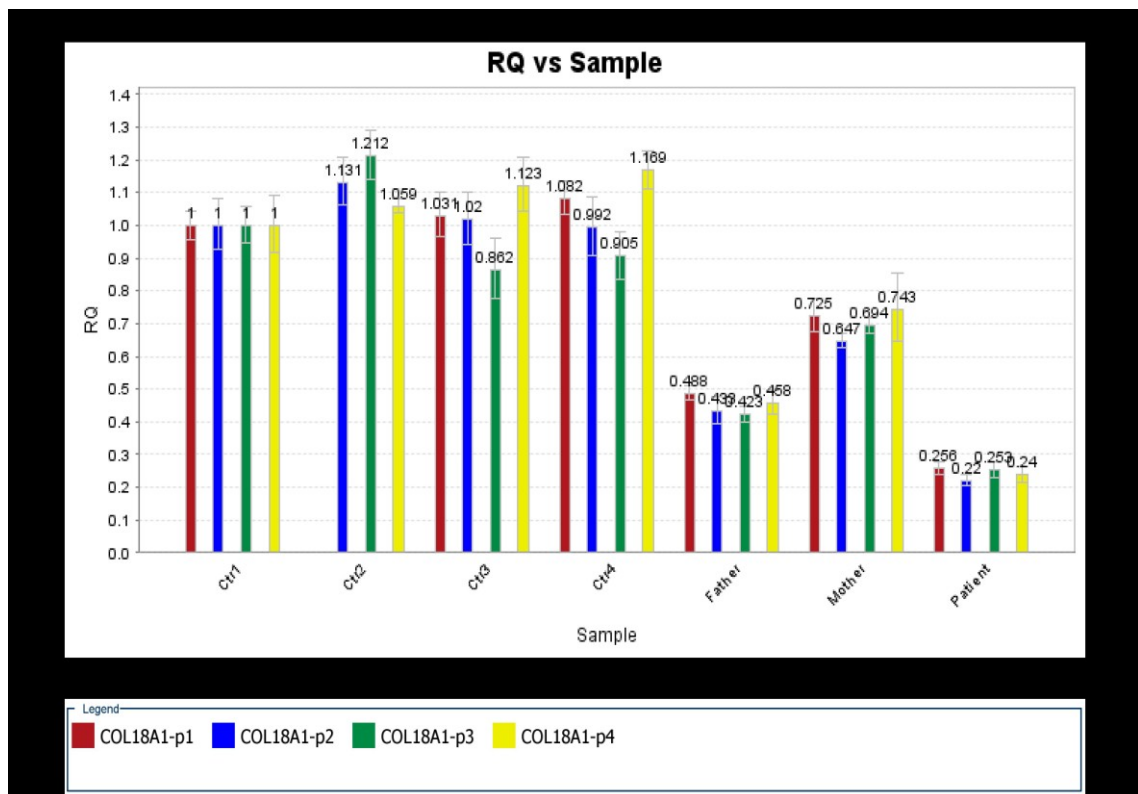
**Patient A161:**

**COL18A1:** COL18A1 codiert für die Alpha-Kette des Typ18-Kollagen (Rehn et al., 1996). Wahrscheinlich beeinflusst das Protein die Bildung der Retinastruktur wie auch den Abschluss des Neuralrohres (Al Ahmad et al., 2010). Mutationen im Gen wurden schon in Zusammenhang mit Knobloch's Syndrom (Enzephalozele, Myopie) gebracht (Najmabadi et al., 2011).

Das Ergebnis der Validierung mittels Real-Time PCR im Bereich des COL18A1 Gens am Chromosom 21 sieht man in Abbildung 36. Weder Patient noch einer der Eltern lieferten brauchbare Ergebnisse für die Validierung des Array-CGH Ergebnis (Abb. 35).

Die Kontrollen bewegten sich alle im Bereich von 2 Kopien, in dem durch die Primer eingegrenzten DNA-Abschnitt. Beim Patienten hingegen war nur ein

25% Vorkommen an genetischem Material, beim Vater ein Auftreten von ca. 50% und bei der Mutter ein 75%-Vorkommen der DNA innerhalb der Primerbegrenzungen, welche mit 4 unterschiedlichen Primerpaaren im COL18A1-Gen durchgeführt wurde, aus der Real-Time PCR Validierung abzulesen (Abb. 35).



**Abbildung 35:** qRT-PCR Validierung der Deletion im Bereich des COL18A1 Gens am Chromosom 21 bei Patient A161 und dessen Eltern.

## 5. Diskussion

Bei den Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) handelt es sich um eine neuropsychiatrische Störung, die sowohl im Phänotyp, als auch im Genotyp als äußerst heterogen einzustufen ist und daher als komplexe Erkrankung bezeichnet werden kann. Die Identifikation der kausalen molekularen Zusammenhänge von komplexen Erkrankungen befindet sich im derzeitigen Zentrum des Interesses der modernen Genomforschung. Nach der bereits erfolgten Identifikation der am häufigsten vorkommenden monogenen Erkrankungen, musste in den letzten Jahren erkannt werden, dass die Methoden, die bei monogenen Erkrankungen zum Erfolg führten, für polygene bzw. multifaktorielle Erkrankungen nur bedingt anwendbar sind. Daher konnten trotz beträchtlicher finanzieller Mittel, die aufgrund des häufigen Auftretens in der Weltbevölkerung (z.B. kardiovaskulären Erkrankungen), in die Erforschung dieser Krankheitsbilder investiert wurden, noch keine komplexe Erkrankung im Zusammenhang mit ihrer genetischen Abhängigkeit vollständig geklärt werden. Ein möglicher Ansatz liegt im gesamt-genomischen Vergleich von MerkmalsträgerInnen mit einer Kontrollgruppe, der durch die Industrialisierung der naturwissenschaftlich-medizinischen Forschung möglich gemacht wurde. Erschwerend kommt hinzu, dass ein zusätzliches Zusammenspiel von Umweltfaktoren wie Erziehung, Ernährung, und der Einfluss von Umweltgiften auf die Mutter während der Schwangerschaft ebenfalls unumstritten ist (Eapen, 2011).

Das bedeutet jedoch für die genetische Erforschung eines Krankheitsbildes, dass es in vielen Fällen nicht möglich sein wird, eine genetische Veränderung in einem DNA-Bereich zu detektieren und damit den vollständigen Schlüssel zum Phänotyp der Erkrankung zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht einen weiteren Mosaikstein zur vollständigen genetischen Entschlüsselung der ASD zu legen.

Es wurden über unterschiedliche Rekrutierungsschienen 245 Personen aus dem Einzugsgebiet der Steiermark rekrutiert, eine ASD-Einstufung erfolgte

mittels ADOS und ADI-R und die genomische DNA wurde aus Vollblut isoliert. Daraufhin wurde eine Affymetrix Genome-Wide Human Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) 6.0 Microarray-CGH durchgeführt um Zugewinne und Verluste an genomischen Segmenten der PatientInnen zu detektieren. Spezielle Kandidatengene die den Einschlusskriterien entsprachen, wurden mittels qRT-PCR auf ihre Validität geprüft und deren Segregation innerhalb der Familie dargestellt.

Wie in Tabelle 1 (Sutcliffe, 2008) zu erkennen ist, wurden bereits im Verlauf der letzten Jahre einige Gene mit ASD assoziiert. Die Tatsache, dass es sich bei ASD um den Einfluss mehrerer unterschiedlicher genetischer Veränderungen in verschiedenen Bereichen des Genoms eines Menschen handelt und der kombinatorische Schweregrad wahrscheinlich davon abhängt, welche von den mit Autismus assoziierten Genen Veränderungen aufweisen, macht die Autismusforschung zu einem der weltweit größten und komplexesten genetischen Forschungsgebiete im neuropsychiatrischen Bereich. Durch Co-Morbiditäten mit anderen Erkrankungen des neuropsychiatrischen Formenkreises wie Schizophrenie, Epilepsie, ADHD und intellektueller Einschränkung (Guilmatre et al., 2009) lässt sich zudem eine klare klinische Einstufung in homogene Subgruppen nur schwer erzielen.

Der Umstand einer komplexen Erkrankung macht daher andere diagnostische Strategien als bei der Identifikation von monogenen Erkrankungen, deren genetischer Hintergrund meist durch Linkage-Analysen zu entschlüsseln ist, notwendig. Die Erforschung des genetischen Hintergrunds einer komplexen Erkrankung setzt ein großes und klinisch gut identifiziertes Patientenkollektiv für den Einschluss aller unterschiedlichen möglichen Genotypen voraus. Eine internationale Vernetzung verschiedener Forschungseinrichtungen, die an derselben Erkrankung arbeiten ist notwendig, um einen möglichst großen Patientenpool und in weiterer Folge große verwertbare Datenmengen zu erhalten. Natürlich ist in diesem Zusammenhang auch zu erwähnen, dass bei diesen Studien populationsspezifische Besonderheiten zu berücksichtigen sind und daher primär eine gut definierte Population bevorzugt werden sollte. Da

unsere PatientInnen bereits über viele Jahre bei den beteiligten PsychologInnen in Behandlung sind, konnten wir die oben angeführten Kriterien erfüllen.

Der Fokus dieser Arbeit bezieht sich auf die Analyse von CNVs in IndexpatientInnen, die klinisch das Krankheitsbild der ASD zeigen, sowie der Analyse derer Eltern bzw. Geschwister.

Ein erhöhtes Auftreten von CNVs in PatientInnen mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wurde bereits publiziert (Morrow, 2011), jedoch gestaltet sich die Interpretation von CNV-Ergebnissen auch bei Kontrollgruppen ohne phänotypische Merkmale sehr schwierig.

Mit dem Bewusstsein, dass in jedem menschlichen Individuum DNA-Abschnitte vorkommen, die anstatt der üblichen 2 Kopien entweder 3, mehr oder nur eine Kopie aufweisen, wurde auf CNVs gescreent die

1. bereits in der Literatur mit Autismus assoziierte Gene enthielten um so die These auf einen möglichen Einfluss auf den Phänotyp zu stützen
2. Gensequenzen enthielten deren exprimierte Proteine in neurologischen Bereichen wie Gehirn, Rückenmark, Synapsen, Transmitter etc. ihre Funktion erfüllen.

16 Gene, die die oben erwähnten Kriterien erfüllten, konnten im Bereich der CNVs unserer PatientInnen-Proben detektiert werden, und so als möglicherweise zum Krankheitsbild der ASD beitragend, gewertet werden.

Eine Frage, die in Bezug auf CNVs häufig diskutiert wird, ist der mögliche Unterschied in der Gewichtung von Zugewinnen, sogenannten „Gains“ und Verlusten, sogenannten „Losses“ des Genoms, am Einfluss auf ein Krankheitsbild. Bei einem Verlust von genetischem Material scheint der Schluss klarer, dass aufgrund der möglicherweise quantitativ geringeren Menge exprimierten Proteins eine Störung in den jeweiligen physiologischen Prozessen die Folge ist.

Bei einem Zugewinn von einer oder mehrerer Kopien und der möglichen Wahrscheinlichkeit, dass mehr des durch das Gen kodierten Proteins produziert wird, stellt sich die Frage, inwieweit es einen negativen Einfluss durch ein „Zuviel“ an Protein geben kann.

Bei den in diesem Projekt detektierten Genen handelt es sich bei AUTS2, DLG2, ARX, DNM3, BTG2 und DPP6 um einen Zugewinn an Kopien.

Ein Verlust war bei den Genen DIP2A, C21orf29, S100B, CSTB, CHRNA7, SH2B1, HPCAL1, CLTCL1, GPHN und COL18A1 zu erkennen.

Eine größere Menge an Protein kann möglicherweise auch blockierend auf Rezeptoren und Regelsysteme wirken. Auch besteht die Möglichkeit, dass durch den Positionseffekt ein vollständiger Verlust der Genexpression auf diesem Allel stattfinden könnte.

Nicht zu vergessen ist die Möglichkeit, dass nicht der Gen-Dosiseffekt den Einfluss auf den Phänotyp der ASD ausmacht, sondern die Gene möglicherweise an Bruchpunkten der CNVs liegen und es dadurch zu einer Störung oder Verhinderung der Expression kommt. Auch kann es sein, dass Gene nahe aber nicht innerhalb einer CNV-Region liegen und es dadurch zu einem Verlust von regulatorischen Elementen und in weiterer Folge zu einer gestörten Expression ihrer Proteine kommt.

Bei Verdacht auf eine dieser beiden Möglichkeiten sind Kontrollen mit anderen Methoden wie zum Beispiel dem Sanger-Sequencing (wenn der Untersuchungsbereich klein ist) oder neueren Methoden wie dem Next-Generation-Sequencing indiziert.

Weiters stellt sich die Frage inwieweit es eine Rolle spielt, ob die genetische Veränderung *de novo* (neu) entstanden ist oder *inherited* (vererbt) wurde.

In der Hälfte der von uns durch die qRT-PCR bestätigten Array-CGH Ergebnisse ist eine Vererbung von einem Elternteil wahrscheinlich (AUTS2, DLG2, ARX, CHRNA7, HPCAL1, CLTCL1, DNM3, DPP6).

Die Eltern zeigten in keinem Fall Symptome, die mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierbar wären. Da es sich, wie oben bereits erwähnt, um eine komplexe Erkrankung handelt, besteht jedoch die Möglichkeit, dass obwohl

einer der Elternteile oder auch andere Personen denselben Zugewinn oder Verlust im Genom zeigen, diese deshalb aber nicht den Phänotyp der ASD aufweisen müssen. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob ein gewisser Schwellenwert an „Gendefekten“ erreicht werden muss, um das Erscheinungsbild der ASD auszulösen oder ob ein exponentieller Anstieg in Autismus auslösenden Genen den Schweregrad der ASD zur Folge hat. Es ist auch nicht unwahrscheinlich, dass abhängig von den genetischen Hauptfaktoren, jeweils eine der beiden Theorien in unterschiedlichen ASD-Familien zum Tragen kommt. Es gilt als bewiesen, dass nicht jeder Patient dieselben Veränderungen im Genom aufweist, sondern sich diese nur teilweise mit denen anderer PatientInnen decken und die verschiedenen anderen genomischen Veränderungen für den Schweregrad und die Form des Autismus determinieren.

Die Aussagekraft über „*inherited*“ oder „*de novo*“ könnte also gering sein, wenn man versucht sie so auszulegen, dass bei einer Feststellung von vererbter Veränderung, der Beitrag zum Krankheitsbild klein oder nicht vorhanden sein muss, da einer oder gar beide der Eltern dieselbe Veränderung aufweisen, aber keiner Symptome der ASD zeigt.

Die Array-CGH fungierte in der vorliegenden Arbeit als Prescreen-Methode, deren Validität im Anschluss durch die Real-Time PCR bestätigt wurde. Sie konnte bei allen Proben, mit Ausnahme von A179 (siehe oben) erfolgreich durchgeführt werden. Da nur Ergebnisse weiterverwendet wurden, die durch 2 der 3 Algorithmen, Birsduite (BS), iPattern (IPN) und Genotyping Console (GTC) erkannt wurden und die Validierung mittels qRT-PCR immer erfolgreich verlief, ist eine Verzerrung der Ergebnisse unwahrscheinlich.

Die zumindest 2 Primerpaare für die Real-Time PCR in den spezifischen Genbereichen wurden so gewählt, dass ein Paar am Beginn des Gens in einem Exonbereich gesetzt wurde und das zweite eher am Ende. Damit konnten wir sicherstellen, dass sich die genomische Veränderung über die gesamte Länge des Gens erstreckt.

Die Real-Time PCR basiert wie jede PCR auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion und ermöglicht dabei die Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen. Der Unterschied zur Standard-PCR liegt in einer Quantifizierung des Zugewinns an DNA mittels Fluoreszenzmessung.

Die qRT-PCR brachte für alle Proben auswertbare Ergebnisse. Wenn aus dem Graphen der Real-Time PCR kein eindeutiges Ergebnis heraus lesbar war, wurden ein oder zwei weitere Primerpaare im Genbereich designt und die Real-Time PCR mit den zwei Primerpaaren vom Erstdurchlauf und den Neubestellten Primerpaaren gemeinsam durchgeführt.

Bei A182 und der Validierung des GPHN-Gens waren leider nur Patientin und Mutter für unsere Untersuchung verfügbar. Da Kollegen am Centre for Applied Genomics in Toronto 2 weitere PatientInnen mit Neuropsychiatrischen Erkrankungen und einer Veränderung im Gephyrin-Locus detektierten, ist die vorliegende Deletion von besonderem Interesse. Eine Assoziation mit einer neuropsychiatrischen Erkrankung ist bis jetzt in der Literatur jedoch nicht zu finden. Die Deletion in der Patientinnenprobe war bei der Probe der Mutter nicht feststellbar. Man kann also festhalten, dass die durch die Array-CGH erkannte Deletion valide ist und nicht von der Mutter vererbt wurde. Man kann aber keinen allgemeinen Schluss über eine mögliche Vererbung fassen (Abb. 32). Eine Möglichkeit zur Feststellung, ob der gegebene DNA-Abschnitt von der Mutter oder dem Vater vererbt wurde, könnte eine SNP-Analyse geben. Dabei werden Single-Nukleotid-Polymorphismen im vorliegende Genbereich von Patientin und Mutter verglichen und im Anschluss durch die mögliche Übereinstimmung der Basen in den SNP-Bereichen bestimmt, ob der Abschnitt der DNA von der Mutter vererbt wurde. Eine SNP-Analyse von A182 und deren Mutter im Genbereich ist geplant.

Veränderungen am DPP6 Gen wurden in der Vergangenheit schon mit ASD in Verbindung gebracht (Christian R Marshall et al., 2008; Noor et al., 2010).

Im vorliegenden Fall des Patienten A210 (Abb. 34) wurden 3 Primerpaare zur Validierung verwendet. 2 der Primerpaare (DPP6-p2, DPP6-p3) zeigten nicht den durch die Array-CGH detektierten Zugewinn an genetischem Material. Am Ergebnis des ersten Primerpaars (DPP6-p1) kann man den „Gain“ jedoch sowohl bei Patient als auch Vater erkennen.

Da bei der Array-CGH das Screening auf Zugewinn und Verlust jeweils von Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) zu SNP berechnet wird, besteht die Möglichkeit, dass im SNP Bereich am Beginn oder vor dem DPP6 Gen ein Zugewinn auftritt und auch einer am Ende kurz außerhalb den Zugewinn zeigt. Das muss aber nicht unbedingt bedeuten, dass sich der Zugewinn über das gesamte Gen erstreckt.

Eine qRT-PCR-Analyse mit mehreren Primerpaaren, wovon das erste kurz außerhalb des DPP6 und das letzte kurz außerhalb des Endes von DPP6 bindet, könnte genauere Auskunft darüber geben, ob der „Gain“ nur einen Teil des untersuchten Gens inkludiert.

Das Ergebnis der Real-Time PCR am COL18A1 Gen des Patienten A21 wurde anfangs mit 2 Primerpaaren durchgeführt. Da die Graphen aber keine Aussage über valide und „*inherited*“ oder *de novo* zuließen, wurden 2 weitere Primerpaare in anderen Bereichen des Gens bestellt und neuerlich eine qRT-PCR durchgeführt. Leider mit demselben Outcome.

Die 4 Kontroll-DNAs präsentieren brauchbare Ergebnisse, aber der Patient zeigt ein Vorkommen des DNA-Bereichs von 25%, der Vater eines von 50% und die Mutter von ca. 75%. Das heißt, eine Deletion könnte in allen 3 DNA-Proben angenommen werden, aber in einem unterschiedlichen, nicht erklärbaren Umfang.

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann vermutet werden, dass es entweder zu einer postzygotischen Veränderung der Kopienzahl gekommen ist oder eine teilweise Denaturierung der Proben des Patienten A161 und seiner Eltern als Ursachen in Frage kommen. Zweiteres ist nicht auszuschließen, da die Proben öfters aufgetaut und längere Zeit bei Temperaturen um 4 Grad Celsius aufbewahrt wurden.

Sämtliche durch uns erhobene Daten wurden und werden mit unseren Partnern in Toronto geteilt und verglichen. John B. Vincent, PhD und Steve Scherer, PhD sind international führende Wissenschaftler auf dem Gebiet der Autismusforschung (SW Scherer & Dawson, 2011). Datenbanken wie die CANAGEN (Canadian Autism Genetics) wurden wie bereits oben erwähnt verwendet, um einen Abgleich und Vergleich mit den in dieser Arbeit gefundenen CNVs zu vollziehen. Außerdem wurden alle gefundenen CNVs bereits bei der bioinformatischen Analyse nach der Array-CGH auf ihre Frequenz in Kontroll-DNAs der AGRE Familien (Autism Genetic Resource Exchange) verglichen.

Erst die Identifizierung aller an den Autismus-Spektrum-Störungen beteiligten Gene und Formen der Aberrationen kann die vollständige genetische Entschlüsselung des Krankheitsbildes liefern.

Viele Wissenschaftler weltweit, egal ob in der Molekularbiologie, Genetik oder einer psychologischen Disziplin tätig, haben ihre Forschung dem Finden und Erkennen der Ursache der ASD gewidmet. Es ist klar, dass jeder einzelne Beitrag immer nur ein Teil der gesamten Entschlüsselung sein wird.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit, in der 245 Personen gescreent wurden und die über internationale Kooperationen in die ASD-Forschungsgesellschaft einfließen, sind nur ein kleiner jedoch nicht minder wichtiger Puzzleteil auf dem Weg zur vollständigen Identifikation des komplexen Krankheitsbildes der Autismus-Spektrum-Störungen. Der Rückfluss von Informationen, der durch diese Zusammenarbeit entsteht, wird in naher Zukunft für die PatientInnen und deren Familien unserer Region die Möglichkeit eröffnen, sehr früh aus den internationalen Forschungsergebnissen zu profitieren.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
ASD	Autism Spectrum Disorders
Array-CGH	Array comparative genomic hybridization
CNV	Copy Number Variation
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
WHO	World Health Organization
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
ADOS	Beobachtungsskala für autistische Störungen
ADI-R	diagnostisches Interview – revidiert
<i>de novo</i>	neu entstanden (nicht vererbt)
<i>inherited</i>	vererbt
rpm	revolutions per minute
ETHO	Ethanol
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TE-Puffer	Tris-HCL EDTA Puffer
SE-Puffer	Saline EDTA-Puffer
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
loss	Verlust an DNA
gain	Zugewinn an DNA

## 7. Literaturverzeichnis

- Al Ahmad, A., Lee, B., Stack, J., Parham, C., Campbell, J., Clarke, D., Fertala, A., et al. (2010). Endostatin binds nerve growth factor and thereby inhibits neurite outgrowth and neuronal migration in-vitro. *Brain research*, 1360, 28-39.
- Ashley-Koch, a, Wolpert, C. M., Menold, M. M., Zaeem, L., Basu, S., Donnelly, S. L., Ravan, S. a, et al. (1999). Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics*, 61(3), 227-36.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*, 25(1), 63-77.
- Bakkaloglu, B., Roak, B. J. O., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., et al. (2008). Molecular Cytogenetic Analysis and Resequencing of Contactin Associated Protein-Like 2 in Autism Spectrum Disorders. *Journal of Human Genetics*, (January), 165-173.
- Bedogni, F., Hodge, R. D., Nelson, B. R., Frederick, E. a, Shiba, N., Daza, R. a, & Hevner, R. F. (2010). Autism susceptibility candidate 2 (Aut2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene expression patterns: GEP*, 10(1), 9-15.
- Beheshti, B., Braude, I., Marrano, P., Thorner, P., Zielenska, M., & Squire, J. a. (2003). Chromosomal localization of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarray comparative genomic hybridization. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 5(1), 53-62.
- Berthet, C., Guéhenneux, F., Revol, V., Samarut, C., Lukaszewicz, A., Dehay, C., Dumontet, C., et al. (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(1), 29-39.
- Bochukova, E. G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., & Purmann, C. (2011). UKPMC Funders Group Large, rare chromosomal deletions associated with severe early- onset obesity. *Nature*, 463(7281), 666-670.
- Borg, I., Squire, M., Menzel, C., Stout, K., Morgan, D., Willatt, L., Brien, P. C. M. O., et al. (2002). A cryptic deletion of 2q35 including part of the. *Human Molecular Genetics*, 391-399.
- Bradford, Y., Haines, J., Hutcheson, H., Gardiner, M., Braun, T., Shef, V., Cassavant, T., et al. (2001). Incorporating language phenotypes strengthens evidence of linkage to autism. *American journal of medical genetics*, 105(8), 539-47.

- Bryson, S. E., Zwaigenbaum, L., McDermott, C., Rombough, V., & Brian, J. (2008). The Autism Observation Scale for Infants: scale development and reliability data. *Journal of autism and developmental disorders*, 38(4), 731-8.
- Burkardt, D. D., Rosenfeld, J. a, Helgeson, M. L., Angle, B., Banks, V., Smith, W. E., Gripp, K. W., et al. (2011). Distinctive phenotype in 9 patients with deletion of chromosome 1q24-q25. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(6), 1336-51.
- Bölte, P. (2005). Psychodiagnostische Verfahren zur Erfassung autistischer Störungen. *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie*, 33(1), 5-14.
- Chaste, P., Nygren, G., Anckarsäter, H., Råstam, M., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C., et al. (2007). Mutation screening of the ARX gene in patients with autism. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 144B(2), 228-30.
- Chiocchetti, A., & Klauck, S. M. (2011). [Genetic analyses for identifying molecular mechanisms in autism spectrum disorders]. *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie*, 39(2), 101-11.
- Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P., Nayir, A., et al. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19096-101.
- Colombo, G., Rusconi, F., Rubino, T., Cattaneo, A., Martegani, E., Parolaro, D., Bachi, A., et al. (2009). Transcriptomic and proteomic analyses of mouse cerebellum reveals alterations in RasGRF1 expression following in vivo chronic treatment with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 37(2), 111-22.
- Cook, E. H., & Scherer, S. W. (2008). Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, 455(October), 919-923.
- David-Watine, B. (2001). The human gephyrin (GPHN) gene: structure, chromosome localization and expression in non-neuronal cells. *Gene*, 271(2), 239-45.
- Du, J., Fan, Z., Ma, X., Gao, Y., Wu, Y., Liu, S., Shen, Y., et al. (2011). Expression of Dpp6 in mouse embryonic craniofacial development. *Acta histochemica*, 113(6), 636-9.
- Eapen, V. (2011). Genetic basis of autism: is there a way forward? *Neuropsychiatry. Current Opinion in Psychiatry*, 24, 226-236.

- Fernandez, T. V., Sanders, S. J., Yurkiewicz, I. R., Ercan-Sencicek, a G., Kim, Y.-S., Fishman, D. O., Raubeson, M. J., et al. (2011). Rare Copy Number Variants in Tourette Syndrome Disrupt Genes in Histaminergic Pathways and Overlap with Autism. *Biological psychiatry*, 71, 392-402.
- Freitag, C. M., Staal, W., Klauck, S. M., Duketis, E., & Waltes, R. (2010). Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European child & adolescent psychiatry*, 19(3), 169-78.
- Geier, D. a, Kern, J. K., & Geier, M. R. (2010). The biological basis of autism spectrum disorders: Understanding causation and treatment by clinical geneticists. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 70(2), 209-26.
- Geschwind, D. H. (2011). Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(9), 409-416.
- Gillis, R. F., & Rouleau, G. a. (2011). The ongoing dissection of the genetic architecture of autistic spectrum disorder. *Molecular autism*, 2(1), 12.
- Guilmatre, A. (2009). Recurrent Rearrangements in Synaptic and Neurodevelopmental Genes and Shared Biologic Pathways in Schizophrenia, Autism, and Mental Retardation. *Arch Gen Psychiatry*, 66(9), 947-56.
- Heid, I. M., Jackson, A. U., Randall, J. C., Winkler, T. W., Qi, L., Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., et al. (2011). UKPMC Funders Group ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nature*, 42(11), 949-960.
- Hennig, W. (2002). *Genetik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, Auflage: 3., ISBN: 3-540-42958-1, 69-90.
- Holt, Richard; Monaco, A. P. (2011). Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. *Molecular Medicine*, 438-450.
- Imada, Y., Fujimoto, M., Hirata, K., Hirota, T., Suzuki, Y., Saito, H., Matsumoto, K., et al. (2009). Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC research notes*, 2, 54.
- Jacquemont, M.-I, Sanlaville, D., Redon, R., Raoul, O., Lyonnet, S., Amiel, J., Merrer, M. L., et al. (2006). Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *Journal of Medical Genetics*, 43, 843-849.
- Koskenkorva, P., Niskanen, E., Hyppo, J., Soininen, H., & Ka, R. (2012). Atrophy in Unverricht-Lundborg Disease Mapped. *Ajnr. American Journal Of Neuroradiology*, 13-15.

- Kroisel, P. M., Windpassinger, C., Wagner, K., Petek, E., Vincent, J. B., Scherer, S. W., Spiel, G., et al. (2004). De novo translocation t(5;18)(q33.1;q12.1) associated with autistic disorder. *American journal of medical genetics. Part A*, 129A(1), 98-100.
- Le Couteur, A., Bailey, A., Goode, S., Pickles, A., Robertson, S., Gottesman, I., & Rutter, M. (1996). A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 37(7), 785-801.
- Leo Kanner. (1943). Autistic Disturbances of Affective Contact (1943). *Nervous Child*, 2, 217-50.
- Leonoudakis, D., Conti, L. R., Anderson, S., Radeke, C. M., McGuire, L. M. M., Adams, M. E., Froehner, S. C., et al. (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(21), 22331-46.
- Lionel, a. C., Crosbie, J., Barbosa, N., Goodale, T., Thiruvahindrapuram, B., Rickaby, J., Gazzellone, M., et al. (2011). Rare Copy Number Variation Discovery and Cross-Disorder Comparisons Identify Risk Genes for ADHD. *Science Translational Medicine*, 3(95), 95ra75-95ra75.
- Long, K. R., Trofatter, J. a, Ramesh, V., McCormick, M. K., & Buckler, a J. (1996). Cloning and characterization of a novel human clathrin heavy chain gene (CLTCL). *Genomics*, 35(3), 466-72.
- Lord, C. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 24(5), 659-85.
- Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, E. H., Leventhal, B. L., Dilavore, P. C., Pickles, A., et al. (2000). The Autism Diagnostic Observation Schedule – Generic: A Standard Measure of Social and Communication Deficits Associated with the Spectrum of Autism. *Autism*, 30(3).
- Maclaren, E. J., Charlesworth, P., Coba, M. P., & Grant, S. G. N. (2011). Molecular and Cellular Neurosciences. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 47(2), 93-99.
- Marshall, Christian R, Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., et al. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Human Genetics*, (February), 477-488.
- McQuillin, a, Bass, N. J., Kalsi, G., Lawrence, J., Puri, V., Choudhury, K., Detera-Wadleigh, S. D., et al. (2006). Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region

- containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3. *Molecular psychiatry*, 11(2), 134-42.
- Mikhail, F. M., Lose, E. J., Robin, N. H., Descartes, M. D., Rutledge, K. D., Rutledge, S. L., Korf, B. R., et al. (2011). Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *American journal of medical genetics. Part A*, (August), 2386-2396.
- Miyata, S., Mori, Y., & Tohyama, M. (2008). PRMT1 and Btg2 regulates neurite outgrowth of Neuro2a cells. *Neuroscience letters*, 445(2), 162-5.
- Morrow, E. (2011). NIH Public Access. *Journal of the American Academy of CHILD and ADOLESCENT Psychiatry*. 49(11), 1091-1104.
- Moss, J., & Howlin, P. (2009). Autism spectrum disorders in genetic syndromes: implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population. *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 53(10), 852-73.
- Murken, J., Grimm, T., & Holinski-Feder, E. (2006). *Humangenetik*. Thieme, Stuttgart, Auflage: 7., ISBN: 3-13-139297-5, 151-96.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S. S., Chen, W., Hosseini, M., et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*, 478, 57-63.
- Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Abigail, W., Lee, C., Shaffer, T., et al. (2010). NIH Public Access. *Nature*, 461(7261), 272-276.
- Noor, A., Whibley, A., Marshall, C. R., Gianakopoulos, P. J., Carson, A. R., Orlic-milacic, M., Lionel, A., et al. (2010). disorder and intellectual disability. *Science Translation Medicine*, 2(49), 1-16.
- Ouchi, N., Asaumi, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., & Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), 7127-34.
- Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466(7304), 368-72.
- Pinto, E., Freitas, J., Duarte, A. J., Ribeiro, I., Ribeiro, D., Lima, J. L., Chaves, J., et al. (2011). Unverricht-Lundborg disease: Homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene. *Epilepsy research*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.eplesyres.2011.11.004

- Poelmans, G., Engelen, J. J. M., Van Lent-Albrechts, J., Smeets, H. J., Schoenmakers, E., Franke, B., Buitelaar, J. K., et al. (2009). Identification of novel dyslexia candidate genes through the analysis of a chromosomal deletion. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 150B(1), 140-7.
- Poustka, F., Bölte, S., Schmötzer, G., Feineis-Matthews, S. (2004). *Ratgeber Autistische Störungen*. Hogrefe Verlag GmbH & Co, Göttingen, ISBN: 978-3-8017-2258-6.
- Quincozes-Santos, A., Abib, R. T., Leite, M. C., Bobermin, D., Bambini-Junior, V., Gonçalves, C.-A., Riesgo, R., et al. (2008). Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 314(1-2), 59-63.
- Redon, Richard, Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., Fiegler, H., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444-54.
- Rehn, M., Hintikka, E., & Pihlajaniemi, T. (1996). Characterization of the mouse gene for the alpha 1 chain of type XVIII collagen (Col18a1) reveals that the three variant N-terminal polypeptide forms are transcribed from two widely separated promoters. *Genomics*, 32(3), 436-46.
- Reiss, J., Lenz, U., Aquaviva-Bourdain, C., Joriot-Chekaf, S., Mention-Mulliez, K., & Holder-Espinasse, M. (2011). A GPHN point mutation leading to molybdenum cofactor deficiency. *Clinical genetics*, 80(6), 598-9.
- Remschmidt, H., Schmidt, M. H., & (Hrsg.), F. P. (2008). *Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO. Mit einem synoptischen Vergleich von ICD-10 und DSM-IV*. Huber, Bern, ISBN: 978-3456835167.
- Ronald, A., Larsson, H., Anckarsäter, H., & Lichtenstein, P. (2010). A twin study of autism symptoms in Sweden. *Molecular psychiatry*, 16(10), 1039-47.
- Scherer, Stephen W, & Dawson, G. (2011). Risk factors for autism: translating genomic discoveries into diagnostics. *Human Genetics*, 130, 123-148.
- Schmidt, S. (1998). S100B: Pathogenetische und pathophysiologische Bedeutung in der Neurologie. *Der Nervenarzt*, 69(8), 639-646.
- Schumann, G., Coin, L. J., Lourdasamy, A., Charoen, P., Berger, K. H., Stacey, D., Desrivieres, S., et al. (2011). Genome-wide association and genetic functional studies identify autism susceptibility candidate 2 gene (AUTS2) in the regulation of alcohol consumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7119-24.

- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-, C., Walsh, T., Yamrom, B., et al. (2010). NIH Public Access. *Science*, 316(5823), 445-449.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Allen, H. L., et al. (2011). loci associated with body mass index. *Nature Genetics*, 42(11), 937-948.
- Steiner, C. E., Acosta, A. X., Guerreiro, M. M., & Marques-de-Faria, A. P. (2007). Genotype and natural history in unrelated individual with phenylketonuria and autistic behavior. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 65(2A), 202-205.
- Strømme, P., Mangelsdorf, M. E., Scheffer, I. E., & Gécz, J. (2002). Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in *Aristaless* related homeobox gene, *ARX*. *Brain & development*, 24(5), 266-8.
- Sultana, R., Yu, C.-E., Yu, J., Munson, J., Chen, D., Hua, W., Estes, A., et al. (2002). Identification of a Novel Gene on Chromosome 7q11.2 Interrupted by a Translocation Breakpoint in a Pair of Autistic Twins. *Genomics*, 80(2), 129-134.
- Sun, W., Maffie, J. K., Lin, L., Petralia, R. S., Rudy, B., & Hoffman, D. A. (2011). DPP6 Establishes the A-Type K<sup>+</sup> Current Gradient Critical for the Regulation of Dendritic Excitability in CA1 Hippocampal Neurons. *Neuron*, 71(6), 1102-1115.
- Sutcliffe, J. S. (2008). Genetics. Insights into the pathogenesis of autism. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5886), 208-9.
- Tabet, A.-C., Pilorge, M., Delorme, R., Amsellem, F., Pinard, J.-M., Leboyer, M., Verloes, A., et al. (2012). Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. *European journal of human genetics: EJHG*, (November 2011), 1-7.
- Whiteley, P. (2010). Gender Ratios in Autism , Asperger syndrome and Autism spectrum Disorder. *Autism Insights*, 17-24.
- Williams, N., Franke, B., Ph, D., Mick, E., Sc, D., Anney, R. J. L., Freitag, C. M., et al. (2011). Article. *American Journal of Psychiatry*, 1-10.
- Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychological medicine*, 11(1), 115-29.
- Xu, S., Han, J. C., Morales, A., Menzie, C. M., Williams, K., & Fan, Y. (2008). Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes. *Cytogenetic and Genome Research*, 187, 181-187.

el-Ghissassi, F., Valsesia-Wittmann, S., Falette, N., Duriez, C., Walden, P. D., & Puisieux, A. (2002). BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells. *Oncogene*, 21(44), 6772-78.