

Análisis molecular del gen *GABRB3* en pacientes con autismo: Estudio exploratorio.

Ernesto Solís-Añez¹, Wilmer Delgado-Luengo¹, Lisbeth Borjas-Fuentes¹, William Zabala¹, Nailet Arráiz², Lennie Pineda¹, María Gabriela Portillo¹, Sandra González-Ferrer¹, José Antonio Chacín¹, Joaquín Peña³, Cecilia Montiel³, Alisandra Morales¹, Alicia Rojas de Atencio¹, Jenny Cañizales¹, Richard González¹, Luis Eduardo Miranda¹, Nivia Abreu¹ y Juana Delgado¹.

¹Unidad de Genética Médica, ²Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", ³Postgrado de Neuropediatría, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
Correo electrónico: wilmerdelgado16@gmail.com.

Palabras clave: Autismo, SNP, mutación, *GABRB3*.

Resumen. El autismo es un trastorno del desarrollo caracterizado por deterioro de la interacción social, la comunicación, y comportamiento estereotipado. Los estudios de familias y gemelos han demostrado predisposición genética al autismo. Existe evidencia (ligamiento y asociación genética, bioquímica, anatomopatológica, funcional y citogenética) de que el gen de la subunidad $\beta 3$ del receptor de GABA-A (*GABRB3*), en 15q11-q13, es un candidato de susceptibilidad al autismo. Con el objetivo de identificar nuevas variantes en este gen, se estudiaron 18 pacientes con autismo idiopático, utilizando un tamizaje de gen candidato. Se realizó el análisis molecular (SSCP/secuenciación) de los 10 exones con sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes. No se identificaron mutaciones no sinónimas en las regiones codificantes, pero se identificaron 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNP). El primer SNP representó una mutación silente p.P25P en el exon 1a, encontrada en 33,33% de los pacientes. El Segundo SNP: IVS3+13C > T (a 5 b de la secuencia consenso 5' del intrón) fue encontrado en 44,44% de los pacientes, mientras que fué identificado en 16,67% de los controles. El 33,33% de los pacientes presentaron simultáneamente ambas variantes, y aunque el 16,67% de los controles también poseían la misma combinación, el 66,66% de los pacientes con esos alelos tenían antecedentes familiares de autismo. El tercer y cuarto SNP: IVS5+40T > G e IVS7-70A > G fueron identificados en dos pacientes diferentes. Ninguno de los 3 últimos SNPs ha sido reportado en la base de datos de SNP (dbSNP). La cercanía del SNP: IVS3+13C > T con la secuencia consenso y de interacción con la nucleorribonucleoproteína U1, pu-

diera alterar la maduración normal del pre-ARNm, en concordancia con la evidencia de niveles bajos del receptor GABA-A en cerebros de pacientes con autismo, pudiendo entonces tratarse, de una variante común, que por sí sola no causaría un efecto fenotípico, pero que en conjunto con otras variantes en el mismo gen, en genes relacionados o, con cambios epigenéticos, pudieran explicar el fenotipo autista y su gran heterogeneidad.

**Molecular analysis of the *GABRB3* gene in Autistic patients:
An exploratory study.**

Invest Clín 2007; 48(2): 225 - 242

Key words: Autism, SNP, mutation, *GABRB3*

Abstract. Autism is a complex neurodevelopmental disorder characterized by impairment of social interaction, language, communication, and stereotyped, repetitive behavior. Genetic predisposition to Autism has been demonstrated in families and twin studies. There is evidence (linkage and genetic association, biochemical, neuropathological, functional and cytogenetic) that the gamma-amino-butyric acid receptor beta 3 subunit gene (*GABRB3*) at 15q11-q13 is a susceptibility candidate gene for Autism. The aim of this exploratory study was to identify new variants of this gene. We performed the molecular analysis (SSCP/Sequencing) of 10 exons and its intronic flanking regions of *GABRB3*, using a candidate gene screening approach in 18 idiopathic autistic patients. We did not find non-synonymous mutations at the encoding regions, but we identified four SNP (Single Nucleotide Polymorphism). The first one, represented a silent mutation p.P25P in exon 1a and was found in 33.33% of the patients. The second one: IVS3+13C > T (5b far from the intron 5' consensus sequence), was found in 44.44% of the patients, while it was also identified in 16.67% of the controls. Simultaneously, 33.33% of the patients had both variants, and although, 16.67% of the controls also had the same combination of variants, 66.66% of the patients with those alleles had a familiar history of Autism. The third and fourth SNP: IVS5+40T > G and IVS-70A > G were identified in two different patients. None of the last three SNPs have been reported at the SNP database (dbSNP). The proximity of SNP: IVS3+13C > T with the consensus and interaction sequence with U1 nucleoriboprotein, could disturb the normal splicing of mRNA. This is in agreement with the evidence of lower levels of GABA-A receptors in autistic brains; so, it could be a common variant, that by itself could not cause a phenotypic effect, but joined to other variants with the same gene, in different related genes or with epigenetic changes, could explain the autistic phenotype and its heterogeneity.

Recibido: 02-10-2006. Aceptado: 22-02-2007.

INTRODUCCIÓN

El autismo es un trastorno del desarrollo que afecta aproximadamente a uno de cada dos mil niños, con una relación por sexo masculino/femenino de 4:1, que se caracteriza por el deterioro de tres áreas: 1) interacción social, 2) comunicación y 3) comportamiento estereotipado, y que inicia en forma gradual antes de los 3 años de edad (1). Los estudios epidemiológicos indican un incremento en el número de casos de autismo en los últimos 15 años (2). En el municipio Maracaibo, estado Zulia, Venezuela, la prevalencia estimada es de 4/10.000 niños (3).

Estudios de familias y gemelos han hecho evidente la predisposición genética al autismo. En familias con probandos autistas la tasa de recurrencia entre hermanos es de un 5%, lo que es varias veces superior a la prevalencia general en la población. Se ha reportado una tasa de concordancia para gemelos monocigóticos (MZ) del 60% comparada con ninguna (0%) para gemelos dicigóticos (DZ) (4). La heredabilidad estimada del trastorno autista, calculada a partir de los datos de riesgos de recurrencia y de los datos de concordancia en gemelos monocigóticos (MZ) y dicigóticos (DZ), se ubica en más del 90% (4). Los estudios de ligamiento genético, las anormalidades citogenéticas en individuos autistas y los estudios de genes candidatos apoyan la observación de que el autismo es un trastorno de múltiples genes, con varios genes en diferentes cromosomas interactuando con efecto moderado (5). Basados en las asociaciones entre las funciones biológicas de los genes y el fenotipo autista, diferentes genes han sido estudiados en autistas y propuestos como genes candidatos de susceptibilidad.

Varios estudios exploratorios de amplias regiones del genoma han demostrado ligamiento en el cromosoma 15q11-q13 (6, 7). También se ha detectado ligamiento y desequilibrio de ligamiento para diferentes

marcadores en otros estudios independientes (8, 9). Los rearrreglos cromosómicos más comunes entre los individuos autistas son las duplicaciones de la región 15q11-q13 de origen materno (5). Por estas razones, los genes en el intervalo 15q11-q13 son considerados genes candidatos para el autismo.

En la región 15q11-q13 se encuentra localizado un grupo de genes del receptor A del ácido- γ -amino-butírico (GABA-A), el cual contiene genes que codifican para las subunidades $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\gamma 3$, del receptor. Uno de los genes candidatos de susceptibilidad al autismo propuesto es el gen de la subunidad $\beta 3$ del receptor A del ácido- γ -amino-butírico (*GABRB3*). El receptor GABA-A constituye el principal canal iónico inhibitorio neuronal en el cerebro de los mamíferos. La mayoría de los receptores GABA-A se ensamblan de forma pentamérica: 2 subunidades α , 2 subunidades β , y una subunidad γ o δ . Cerca del 80% de todos los receptores GABA-A contienen el clásico sitio de unión de las benzodiazepinas, caracterizados principalmente por combinaciones $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta xy 2$ (10).

Existe evidencia bioquímica y anatomopatológica que apoya la hipótesis de la disfunción del GABA en el autismo. Estudios independientes (11-13) han descrito niveles elevados de GABA en plasma de niños autistas, apoyando de esta forma la hipótesis de disfunción GABAérgica. También se ha descrito una expresión cerebral disminuida de *GABRB3* en pacientes autistas comparados con controles (14). Previamente, ya se había demostrado una reducción significativa en la densidad de sitios de unión a benzodiazepinas y de los receptores GABA-A en el hipocampo de cerebros de autistas (10), región en la que se localiza comúnmente la subunidad $\beta 3$ en dichos receptores.

Varios autores están de acuerdo en que la hipótesis de disfunción del GABA

constituye una alternativa razonable para organizar muchos de los conocimientos claves, tanto embriológicos, clínicos, genéticos y bioquímicos que se tienen sobre el trastorno autista (13).

Sin embargo, muy pocas mutaciones han sido descritas en los genes que codifican las subunidades del receptor GABA-A (15, 16). Particularmente, en el gen *GABRB3* que codifica para la subunidad beta 3 del receptor del GABA-A, localizado en la región 15q11-q13, sólo se ha descrito una mutación puntual en el exón 6 (R192H) en un paciente con insomnio pero sin fenotipo autista (15).

Cook y col. (8) analizaron el gen *GABRB3* y demostraron desequilibrio de ligamiento entre el trastorno autista y el polimorfismo intrónico 155CA-2 (MTDT 28,63, $P = 0,0014$). Buxbaum y col. (17) confirmaron la asociación entre el marcador 155CA-2 y el trastorno autista. Sin embargo, otros grupos de investigadores no han encontrado evidencia de esta asociación (18, 19, 20), sin embargo, concluyeron que a pesar de sus resultados, esta región debía ser aún considerada de gran interés.

Aunque otros estudios (21, 22) no encontraron evidencia de ligamiento en la región 15q11-q13, la cual ha sido asociada con anormalidades citogenéticas en autismo; Barret y col. (7), encontraron un máximo MMLS/het (máximo LOD score multipunto de la heterogeneidad) de 0,51 en el marcador D15S975. Philippe y col. (6) obtuvieron resultados positivos para ligamiento en sus familias con el marcador D15S118 localizado a 20 cM del gen del *GABRB3*, con un máximo MLS de 1,10. Adicionalmente, un estudio de ligamiento llevado a cabo por Bass y col. (23) en un grupo independiente de 63 familias múltiples con autismo, encontraron evidencia de ligamiento en la región 15q11-q13 a nivel del marcador D15S217.

Martin y col. (9), estudiaron 4 marcadores en región 15q11-q13 (155CA-2, *GABRB3*, D15S97 y *GABRA5*), y no encontraron evidencia de ligamiento con el marcador 155CA-2, pero sí con el *GABRB3* ($P < 0,03$), y al excluir las 9 familias con genealogías expandidas, se obtuvo un valor de $P < 0,0045$ para este mismo marcador, apoyando así los hallazgos previos que indican que existen genes en esta región involucrados en el trastorno autista. Menold y col. (24), obtuvieron evidencia significativa de asociación entre dos SNPs (exon5_539T/C, $P = 0,02$ e intron5_687T/C, $P = 0,03$) localizados en el gen *GABRG3* y el autismo. En un estudio reciente de 470 familias caucásicas con autismo, se encontró también asociación significativa con tres haplotipos en *GABRG3*, aunque no se pudo demostrar la interacción significativa entre los genes *GABRB3*, *GABRG3* y *GABRA5* (25). Estos hallazgos sugieren que el rol de los genes de las subunidades del receptor del GABA-A en la susceptibilidad al autismo, deben ser analizados más detalladamente.

Shao y col. (26), estudiaron 8 marcadores localizados en 15q11-q13 en 221 pacientes con autismo y utilizaron un nuevo método estadístico: el análisis de subgrupos ordenados (OSA), y encontraron en un subgrupo de familias con altos puntajes en el renglón de Insistencia en la igualdad (IS) del ADI-R, (que evalúa la resistencia a los cambios mínimos del ambiente o la rutina, así como las compulsiones o rituales), un LOD score significativo a nivel del marcador *GABRB3* de 4,71. Nurmi y col. (27), encontraron en un subgrupo de pacientes autistas con alto puntaje en la habilidades "savant" (brillantes, geniales, por encima del promedio), un LOD score Heterogéneo multipunto (HLODs mutipoint) de 2,6 en el marcador D15S511 en el gen *GABRB3*. Estos datos son también consistentes con la contribución propuesta para el locus 15q

en la susceptibilidad al autismo. Sin embargo, Ma y col. (28) no pudieron replicar estos resultados en una muestra independiente. Estos resultados también apoyan la evidencia de ligamiento entre el autismo y el gen *GABRB3* del receptor GABA-A.

McCauley y col. (29) demostraron asociación significativa con 5 marcadores en 15q11-q13 con una $P < 0,05$, en tres localizaciones distintas a lo largo del gen *GABRB3*. El SNP 1 ($P = 0,02$) y SNP 3 ($P = 0,01$) están localizados hacia el extremo 3' del gen; El SNP 5 ($P = 0,04$), el SNP 6 ($P = 0,03$) y el SNP 11 ($P = 0,04$) están localizados en el intrón 3. Un marcador en el intrón 5 del gen *GABRA5* (SNP 23) también mostró evidencia de asociación ($P = 0,03$). La transmisión de dos bloques multi-locus, incluyendo SNPs que mostraron asociación individual, bloque SNP 1-2-3 ($P = 0,02$) localizado hacia el extremo 3' de *GABRB3* y bloque SNP 22-23-24 ($P = 0,01$) localizado en *GABRA5*, mostró resultados significativos. Estos resultados están positivamente correlacionados con la posición de ligamiento observada previamente. Concluyendo que ese estudio apoya la existencia de uno o más alelos de riesgo al autismo en el grupo de genes de subunidades del receptor GABA-A en 15q12.

Se ha reportado que las duplicaciones de la región 15q11-q13 en pacientes autistas son exclusivamente de origen materno, lo cual sugiere que las duplicaciones de origen materno incrementan el riesgo de los trastornos del desarrollo. En el subgrupo (IS) estudiado por Shao y col. (26), se encontró un incremento en los alelos maternos comunes que se compartían.

Sobre la base de todas las investigaciones que apuntan a que, en la región 15q11-q13 pueda haber un gen candidato de susceptibilidad al autismo, particularmente entre los que codifican para las subunidades $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\gamma 3$ del receptor GABA-A, se realizó el análisis molecular de las regio-

nes codificantes del gen *GABRB3* y de las regiones intrónicas consenso, con el fin de identificar variantes nucleotídicas que pudieran estar asociadas al autismo.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio exploratorio, prospectivo, transversal y observacional descriptivo en pacientes con autismo idiopático, con un abordaje metodológico genético tipo tamizaje de gen candidato, enfocado en la detección directa de variantes de susceptibilidad. Se estudió una muestra intencional de 18 pacientes con diagnóstico de autismo (por ADOS según criterios de la DSM-IV), de uno u otro sexo, entre 4 y 7 años de edad, no verbales según escala de Vineland (< 36 meses), sin convulsiones ni otras alteraciones neurológicas asociadas. Se descartaron causas asociadas a autismo secundario como hipoxia perinatal, enfermedades infecciosas congénitas, exposición intrauterina a teratógenos, anomalías cromosómicas, y autismo de origen sindrómico (síndrome de X frágil, síndrome de Angelman), o neurocutáneos (esclerosis tuberosa), y errores innatos del metabolismo (fenilcetonuria, aminoacidurias).

El grupo control estuvo conformado por 30 individuos adultos voluntarios, sanos, de uno u otro sexo, sin antecedentes familiares de autismo u otro trastorno del desarrollo, insomnio, retardo mental, malformaciones congénitas y/o enfermedades hereditarias. Se obtuvo el consentimiento informado de cada participante en el estudio: de sus padres o representantes en el caso de los pacientes, y directamente en el caso de los controles.

A cada individuo se le tomaron 4 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA (500mM) para la extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) por las técnicas combinadas: fenol-sevag (30) y técnica inorgánica o Salting Out (31), estandarizadas

en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Genética Médica de La Universidad del Zulia. La concentración y calidad de las muestras de ADN utilizadas, fue de $246 \pm 92,4$ ng/ μ L y $1,4 \pm 0,20$, respectivamente.

Se amplificaron en forma individual cada uno de los 9 exones y el exón 1a (alternativo) del gen *GABRB3* en los 18 pacientes y controles sanos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el termociclador correspondiente (PTC-100, MJ Research, Inc). La PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, conteniendo: 100 nanogramos (ng) de ADN genómico (con excepción del exón 8 donde se utilizaron 50 ng) diluidos en agua ultrapura hasta un volumen de 5 μ L, 2,5 μ L de buffer Taq ADN polimerasa, 1,5 μ L $MgCl_2$ (1,5mM), 0,5 μ L dNTPs (0,2 mM), 0,5 μ L Taq polimerasa (2,5 unidades), 2 μ L de cada iniciador según el exón a amplificar (15 pmol) y Dimetil-Sulfóxido (DMSO). Los iniciadores utilizados así como la concentración de DMSO fueron las reportadas por Glatt y col. (16); los productos amplificados incluyen, además de los exones, también las secuencias intrónicas de las regiones consenso flanqueantes 5' y 3' correspondientes de cada exón, con tamaños que oscilan entre 155 pb (exón 3) y 531 pb (exón 9).

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron estandarizadas en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Genética Médica como se describe a continuación: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C (con excepción del exón 2 donde se aumentó a 5 min), luego 30 ciclos de 30 seg a 94°C (en el exon 1 se utilizaron 34 ciclos), 40 seg a temperatura de anillado variable de acuerdo a cada exón (16), extensión de 1 min a 72°C. En el exón 2 se utilizó una extensión final de 72°C por 10 min. Luego los productos de PCR fueron almacenados a 4°C.

Los productos amplificados fueron verificados en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% a 100 voltios por 35 min, con tinción de solución de bromuro de etidio (1:10.000).

Posteriormente los productos de PCR fueron analizados a través de la técnica del Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP, del inglés Single Strand Conformational polymorphism) combinada con análisis simultáneo de heterodúplex, de cada uno de los exones y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes del gen *GABRB3*, siguiendo el protocolo descrito por Lietchi-Gallati y col. (32), modificado en esta investigación para adaptarlo al sistema de SSCP utilizado: Preparación del gel de poliacrilamida al 12% (99% acrilamida, 1% piperazina diacrilamida (PDA) en condiciones no desnaturalizantes, siendo la mezcla para un gel de 200 $\times$ 200 $\times$ 0,75 mm de: 10.6 mL de una solución de acrilamida-PDA al 40%, 17 mL de buffer Tris-formato (0,75 M, pH 9,0), 6 mL de glicerol (41%), 800ul de agua destilada, 480 μ L de persulfato de amonio (10%) y 48 μ L de TEMED. Posteriormente, se mezclaron en tubos (Eppendorf) de 0,5 mL: 2 μ L del producto de PCR + 3 μ L del buffer de SSCP (95% formamida, 100 mM NaOH, 0,25% xilencianol, 0,25% azul de bromofenol). Se realizó una modificación a la concentración final del buffer de corrida Tris-Borato 2X propuesta en el protocolo inicial para adaptarse a los volúmenes exigidos por la cámara de SSCP utilizada (7Lts.), quedando el Tris-base a 0,104 M y el ácido bórico a su concentración original de 0,28 M.

Se desnaturalizaron las muestras por 10 min a 95°C, inmediatamente se colocaron en hielo. La electroforesis se realizó en la cámara de SSCP (DCode Universal Mutation Detection System, BIO-RAD), durante 5 horas a voltaje constante: 350 V, 100 mA y 25W, con una temperatura de 12-13°C durante toda la corrida.

Los patrones de bandeo de la SSCP y heterodúplex se visualizaron a través de tinción con nitrato de plata (33).

Los fragmentos obtenidos en la SSCP con patrón de migración diferente con respecto a los controles y/o formación de heterodúplex, fueron posteriormente amplificados nuevamente y purificados con el Kit Wizard PCR Prep. DNA Purificator (Promega).

Finalmente, los productos de PCR purificados fueron verificados nuevamente en agarosa al 2%, para posteriormente ser secuenciados por el método enzimático de Sanger (34) mediante Kit comercial de secuenciación (BigDye v3.0 ready reaction Applied/Biosystems) en secuenciador automatizado (ABI Prism 310 Genetic Analyzer/Applied Biosystems). Los datos crudos de la secuenciación se analizaron con los programas Sequencing Analysis y DNA para Windows (versión 2.2). Posteriormente, se procedió a la comparación de los fragmentos secuenciados con la secuencia nucleotídica normal del gen, utilizando para ello el software de alineamiento y comparación de secuencias: BLAST (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (35). Al no observarse una similitud del 100%, se confirmaría la existencia de una variación en la secuencia nucleotídica estudiada; si la misma estaba presente en menos del 1% de los controles normales, se consideraría como una mutación y no como un polimorfismo o variante alélica neutral en la población (36).

Después de identificada una variante en la región codificante y/o regiones intrónicas flanqueantes de cada exón del gen *GABRB3* en pacientes con autismo, se procedió a la comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína teóricamente codificada por los pacientes, con la secuencia de la proteína normal, utilizando la base de datos ENSEMBL (disponible en: <http://www.ensembl.org/>) (37), con el fin de determinar las consecuencias de la variante en la proteína codificada.

De igual forma, después de identificar variantes del tipo SNP en varias regiones intrónicas gen *GABRB3*, se procedió a la búsqueda en la base de datos de SNPs (dbSNP) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (NCBI) (Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) (38) para verificar su existencia en dicha base de datos.

Los resultados se expresaron en porcentajes y promedios aritméticos con sus respectivas desviaciones estándar.

RESULTADOS

Se estudiaron 18 pacientes con diagnóstico de autismo (por ADOS), entre 4 y 7 años de edad, no verbales según escala de Vineland (<36 meses). El 77,8% (14/18) eran varones y 22,2% (4/18) eran hembras, con una relación masculino:femenino de 3,5:1. A través de la historia clínica genética, neuroimágenes, cariotipo de alta resolución, análisis molecular de los alelos *FRAXA* y *FRAXE*, prueba de histidina y cromatografía unidimensional de aminoácidos en orina de 24 horas, se descartaron causas conocidas de autismo secundario. En el 72,22% (13/18) se logró identificar algún antecedente genético de importancia como autismo, déficit de atención, síndrome de Down, esquizofrenia, convulsiones, retardo mental y/o malformaciones múltiples. En el 27,7% (5/18) de las familias se logró identificar algún otro afectado de autismo diferente al propósito.

Luego de realizada la amplificación de todos los exones y correspondientes regiones intrónicas flanqueantes del gen *GABRB3* y la SSCP, se detectaron para el exón 1a y sus regiones intrónicas flanqueantes, 6 pacientes con un patrón de migración anormal, pero similar entre ellos, codificados como AUTA: 8, 9, 1, 5, 6 y 14 (Fig. 1). Para el exón 3 y sus regiones intrónicas flanqueantes se detectaron 8 pacien-

tes en los 8 pacientes (1-5-6-8-9-13-14 y 23) (44,44%, 8/18) con migración anormal para dicha región, arrojó los siguientes resultados: el 100% de los mismos presentó una variante puntual tipo transición en el nucleótido +13 del intrón 3-4 en estado de heterocigosis, localizado a 5 b de la región consenso de empalme del extremo 5' donador del intrón, que sustituye citosina (C)

por timina (T) (IVS3+13C > T) (Fig. 4). Esta variante no ha sido reportada hasta ahora en la base de datos de SNP (dbSNP). Dado este hallazgo, se procedió a la secuenciación directa de esta región en los controles para investigar si se encontraba en más del 1% de la población o se trataba de una mutación exclusiva de los pacientes con autismo. La secuenciación de 30 controles de-

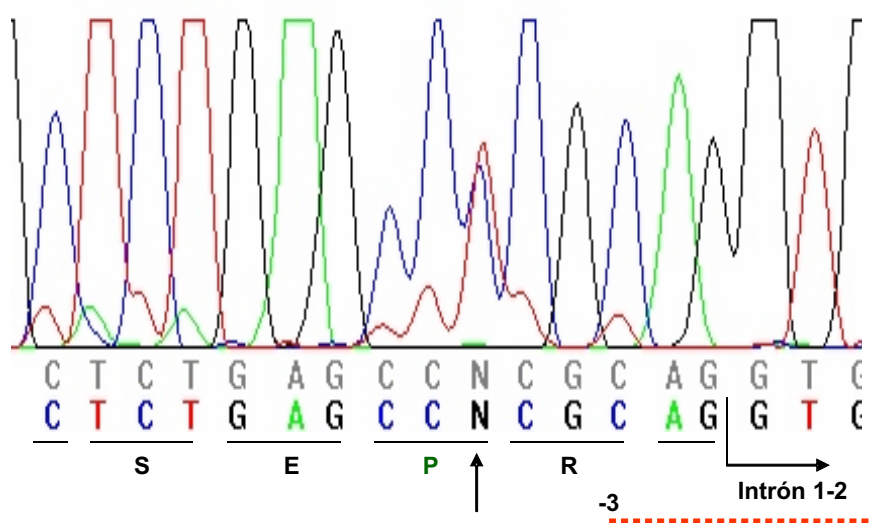


Fig 3. Variante p.P25P en el exón 1a gen GABRB3. La secuencia del exón 1a y de sus regiones intrónicas flanqueantes muestra que el paciente 8 es heterocigoto C/T en la tercera base del codón 25 del exón 1a (flecha). S = Serina, E = Ácido glutámico, P = Prolina, R = Arginina. Región de interacción con la ribonucleoproteína U1 del empalmesoma.

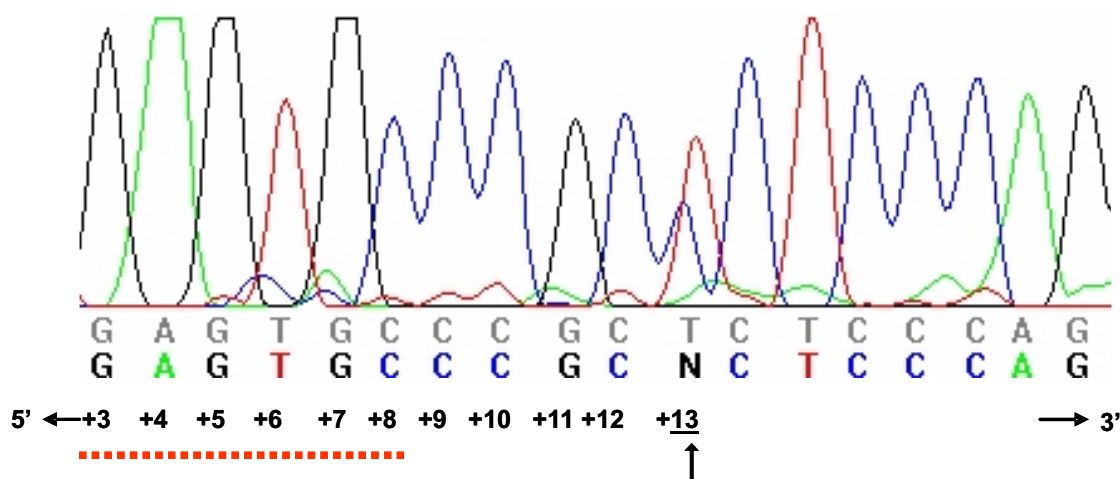


Fig.4. Variante IVS3+13C>T en el gen GABRB3. La secuencia del exón 3 y de sus regiones intrónicas flanqueantes muestran que el paciente 23 es heterocigoto C/T en la posición +13 del intrón 3-4 (flecha). Región de interacción con la ribonucleoproteína U1 del empalmesoma.

mostró el siguiente resultado: el 16,67% (5/30) de los mismos poseían el mismo polimorfismo tipo SNP en estado de heterocigosis C/T, siendo el restante 83,33% (25/30) homocigotos C/C, confirmándose que se encontraba en más del 1% de la población, por lo que se decidió no continuar con la secuenciación de más **controles** en esta región del intrón 3-4.

Dado que, de los 8 pacientes con la variante IVS3+13C>T, el 75% (6/8) presentaban también la variante silente p.P25P (pacientes 1-5-6-8-9 y 14), se decidió secuenciar los 5 controles que presentaron la variante IVS3+13C>T para investigar si también poseían la variante p.P25P o se trataba de una asociación preferencial de estas variantes en los autistas, obteniéndose que los 5 controles también poseían la variante: 1 de ellos en estado de homocigosidad (T/T para la variante) y los otros 4, heterocigotos C/T similares a los pacientes; estableciéndose la presencia de ambas variantes en el 16,7% de los controles comparado con el 33,33% de los pacientes. Sin embargo, es interesante resaltar que el 66,66% (4/6) de los pacientes con ambas variantes tenían antecedentes familiares de autismo, y en el

75% (3/4) de los mismos, eran por la línea parental paterna.

Finalmente, la secuenciación del exón 5 y sus regiones intrónicas flanqueantes en el paciente AUTA3, mostró una variante tipo transversión, a +40 b en el intrón 5-6 en estado de heterocigosis, que sustituye timina (T) por guanina (G) (IVS5+40T>G) (Figura 5), mientras que la secuenciación del exón 8 y sus regiones intrónicas flanqueantes en el paciente 4, mostró una variante tipo transición a -70 b en el intrón 7-8 también en estado de heterocigosis, que sustituye adenina (A) por guanina (G) (IVS7-70A>G) (Figura 6). Por ser estas variantes únicas en nuestra muestra y además, estar localizadas en regiones intrónicas sin importancia aparente en los procesos de empalme y maduración del preARNm, no se secuenciaron controles para estas regiones.

Resumiendo, no se identificaron mutaciones no sinónimas en las regiones codificantes del gen *GABRB3* en pacientes con autismo, pero se identificaron 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNP). El primer SNP representó una variante silente p.P25P en el exon 1a, encontrada en 6 pacientes

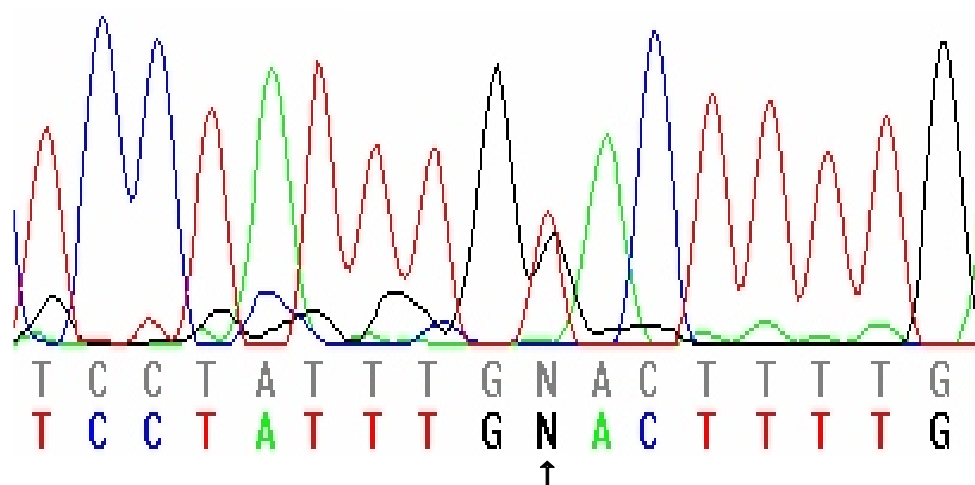


Fig. 5. Variante IVS5+40T>G en el gen *GABRB3*. La secuencia del exón 5 y de sus regiones intrónicas flanqueantes muestra que el paciente 3 es heterocigoto T/G en la posición +40 del intrón 5-6 (flecha).

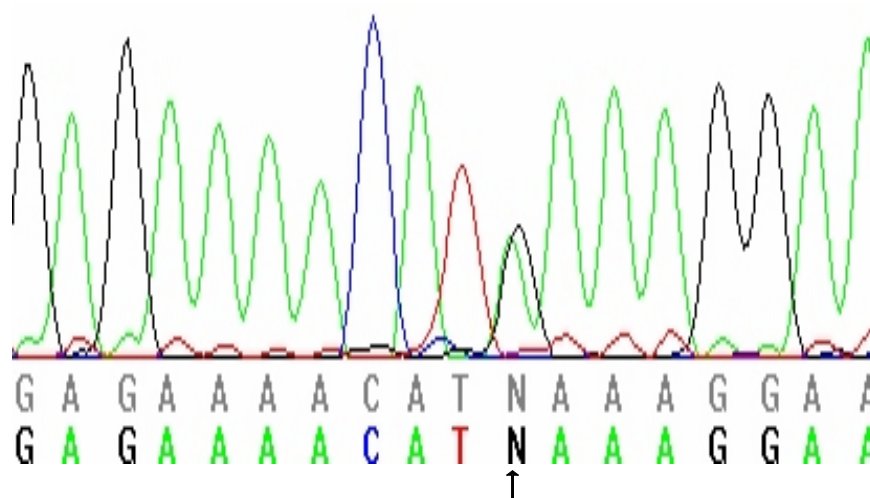


Fig. 6. Variante IVS7-70A>G en el gen GABRB3. La secuencia del exón 8 y de sus regiones intrónicas flanqueantes Muestran que el paciente 4 es heterocigoto A/G en la posición -70 del intrón 7-8 (flecha).

(33,33%). El Segundo SNP: IVS3+13C>T fue encontrado en 8 pacientes (44,44%) a 5 b de la secuencia consenso 5' e identificado en 16,67% de los controles. Los 6 pacientes con el SNP: p.P25P, también tenían el SNP: IVS3+13C>T (33,33%). Sin embargo, se evidenció que todos los controles con la variante IVS3+13C>T (16,67%), también tenían la variante p.P25P al igual que los pacientes con autismo. El tercer y cuarto SNP: IVS5+40T>G e IVS7-70A>G fueron identificados en dos pacientes diferentes. Ninguno de los 3 últimos SNPs ha sido reportado en la base de datos de SNP (dbSNP).

DISCUSIÓN

La variante tipo SNP IVS3+13C>T en el gen de la subunidad beta 3 del receptor GABA-A (*GABRB3*) encontrada en esta investigación no ha sido reportada previamente en la literatura y su cercanía (5 b) con la región donadora 5' del intrón 3 (Fig. 4), donde se encuentra la secuencia consenso y de interacción con la pequeña nucleorriboproteína U1 (snRNA U1) y con los otros componentes del empalmesoma en el in-

trón 3-4, pudiera estar implicada en cambios en la maduración normal del pre-ARNm, con la consiguiente posible alteración en la secuencia o tamaño del producto proteico (que de ser inestable sería degradado rápidamente) o en la interacción entre la subunidad $\beta 3$ codificada y las otras subunidades del receptor, así como, en la conformación pentamérica del mismo, todo lo cual, pudiera tener implicaciones en la respuesta de un subgrupo de neuronas al GABA.

Durante la primera etapa del proceso de empalme, snRNA U1 interactúa con el pre-ARNm en el sitio donador 5' del intrón, a través de un par de bases complementarias, con los dinucleótidos altamente conservados GU y con los nucleótidos flanqueantes no conservados (-3 a +8) (39). El complejo de nucleorriboproteínas del empalmesoma enfrenta un gran desafío: el reconocimiento de los sitios de empalme correctos antes de las reacciones de corte y empalme del pre-ARNm. Las secuencias consenso de empalme, sólo contienen la mitad de la información necesaria para el reconocimiento completo de los sitios de empalme normales, debido a que éstos deben

ser distinguidos de las secuencias de pseudo-sitios de empalme que se asemejan a los sitios clásicos, pero que nunca son utilizados. Existen elementos auxiliares en *cis*, que ayudan al reconocimiento de los exones llamados aumentadores exónicos e intrónicos del empalme (ESEs, ISEs) e inhibidores exónicos e intrónicos del empalme (ESSs, ISSs). Hoy en día, está claro que el reconocimiento de los exones es alcanzado a través de reconocimientos acumulados de múltiples señales débiles, dando como resultado una red de interacciones a lo largo de los exones y de los intrones (40).

El hecho de que los nucleótidos flanqueantes (-3 a +8) de los sitios de empalme no estén conservados, implica, que mutaciones en estas posiciones pueden producir o no alteraciones en el empalme normal del preARNm (41). Se han descrito alteraciones en el empalme por mutaciones en esta región no conservada (41,42). Estos hallazgos resaltan la importancia de prestar más atención a los cambios nucleotídicos en los intrones, antes de descartarlos como polimorfismos benignos. Adicionalmente, se deben tener muy en cuenta los elementos aumentadores e inhibidores del empalme y las señales de procesamiento del extremo 3', debido a que cambios en estas secuencias también pudieran provocar alteraciones en el empalmado del preARNm y en la estabilidad del transcrito (40).

Aunque la variante IVS3+13C>T encontrada en esta investigación, se encuentra a 5 b corriente abajo de la región de interacción teórica de la snRNA U1, se desconoce si sería capaz de producir consecuencias en el empalme, similares a las reportadas en mutaciones en la región de interacción con snRNA U1, corriente abajo de los dinucleótidos conservados en el extremo donador del intrón, que puedan resultar en un sitio donador menos favorable que sitios crípticos de empalme o, en la falta total de reconocimiento del sitio de empalme, con

la correspondientes consecuencias en el producto proteico codificado. Por otra parte, la localización de esta variante en el intrón del gen *GABRB3* coincide con los resultados reportados por otros autores que apuntan a la existencia de un locus de susceptibilidad al autismo en o muy cercano a esta región. McCauley y col. (24), utilizando 59 SNPs a lo largo del intervalo de 1Mb que contiene los genes *GABRB3*, *GABRA5* y *GABRG3* en 15q12, demuestran asociación significativa con 6 marcadores individuales, (cinco de los cuales se encuentran en *GABRB3* y uno en *GABRA5*) y dos bloques de haplotipos que incluyen a estos marcadores. Tres de los SNPs en el gen *GABRB3* se encontraron en el intrón 3 de 150 Kb, los SNPs 5 y 6 en un solo bloque hacia el extremo centromérico de este intrón, y el SNP 11, hacia el extremo telomérico del intrón, a 80 Kb del marcador 155CA-2 (Fig. 7), que ha sido asociado al autismo por dos grupos de investigadores (8,17). En el estudio de Nurmi y col. (27), utilizando un subgrupo de Autistas, también se apuntó específicamente hacia esta región, obteniendo el pico de ligamiento hacia el extremo 5' del *GABRB3* en el marcador D15S11, a 40 Kb del marcador 155CA-2. Todo lo cual apoya la posible existencia de un alelo de susceptibilidad al autismo en la región cercana al marcador 155CA-2 en el intrón 3 del gen *GABRB3*.

Por otro lado, la presencia de la variante IVS3+13C>T en el 44,44% de los pacientes estudiados comparado con un 16,67% de los controles, puede ser el reflejo de una variante común en la población, que en conjunto con otras variantes en el mismo gen, en genes relacionados o, con cambios epigenéticos, pudiera explicar el fenotipo autista y su gran heterogeneidad; pero que por sí sola, no sería capaz de producir un efecto fenotípico resaltante, como se observó recientemente en un estudio, en el que ratones heterocigotos deficientes en *gabbrb3*

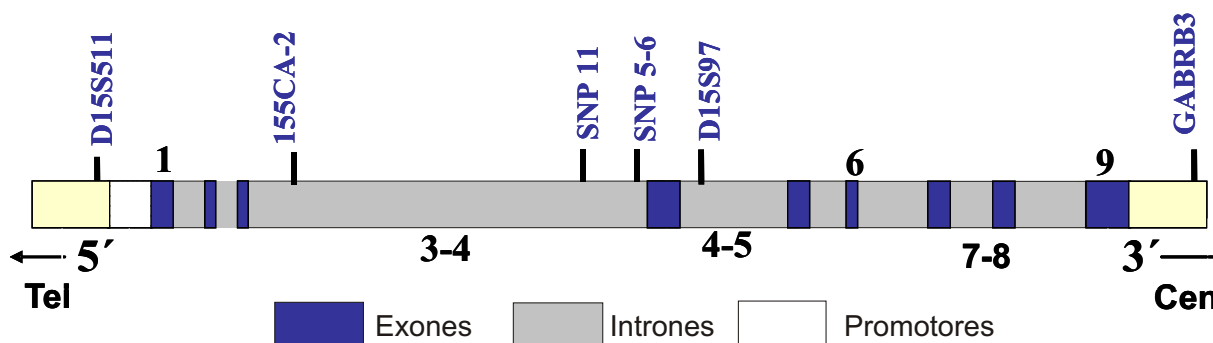


Fig. 7. Estructura del gen *GABRB3*. Polimorfismos STR: D15S97 (intrón 4), *GABRB3* (60 Kb, 3'), 155CA-2 (intrón 3), D15S511 (Intergénico).

($\beta 3$ +/-) mostraban un fenotipo normal comparados con los ratones homocigotos Knockout ($\beta 3$ -/-), aunque mostraban cambios sutiles en el comportamiento y en el electroencefalograma (43,44).

Una característica definida de los fenotipos complejos es que ningún locus contiene los alelos que son necesarios o suficientes para la susceptibilidad a la enfermedad (45). Un problema, es identificar si la variación genética es debida a un pequeño número de loci donde los alelos de susceptibilidad son comunes, o debido a un número mucho mayor de loci donde los alelos de susceptibilidad son muy raros (46). Si la variación alélica en un locus de una enfermedad compleja es extensa, con múltiples alelos de susceptibilidad de origen independiente, la demostración de asociación entre genotipos marcadores y el fenotipo de la enfermedad puede verse afectada en forma negativa (47).

El autismo es un trastorno con una etiología compleja, para el que se ha propuesto una herencia oligogénica de alelos, de un número desconocido de genes, que se ha estimado en hasta 20 genes que podrían contribuir en el riesgo total, con heterogeneidad de locus, resultando que diferentes familias tengan una combinación diferente de alelos de susceptibilidad (21, 48).

La hipótesis de que una variante podría causar cambios que pudieran alterar el

empalme del preARNm del gen *GABRB3*, está en concordancia con los numerosos hallazgos que apoyan el rol del sistema neurotransmisor GABA (ácido gamma amino butírico) en la susceptibilidad al autismo. Blatt y col. (10) demostraron una reducción significativa en la densidad de sitios de unión a benzodiazepinas y de los receptores GABA-A en el hipocampo de cerebros de autistas. Chugani y col. (49), utilizando Tomografía por Emisión de Positrones (PET) también evidenciaron disminución de receptores GABA-A en niños con autismo. De igual forma, se han observado niveles elevados de GABA en sangre y de su precursor inmediato glutamato en autistas (11, 13, 50).

La neurotransmisión gabaérgica es extensa y los defectos pueden estar localizados en ciertas áreas cerebrales con cambios compensatorios en otras áreas. Una posibilidad, entre muchas, es que los niveles plasmáticos elevados de GABA en Autistas, de confirmarse, reflejen un incremento compensatorio en la liberación presináptica de GABA en respuesta a una hiposensibilidad a un subgrupo de receptores GABA. Esto pudiera producir entonces un incremento en la activación postsináptica de otros subtipos normales de receptores GABA, resultando en alteraciones complejas de la función gabaérgica a lo largo del cerebro de los pacientes con autismo (13).

Toda esta evidencia refuerza la probable existencia de un locus de susceptibilidad al autismo en o muy cercano al intrón 3 del *GABRB3*, lo cual apoya la hipótesis de que la variante IVS3+13C>T encontrada en este estudio exploratorio, podría ser en sí misma un alelo de riesgo para el autismo en los pacientes estudiados.

Esta investigación constituye el primer estudio publicado dedicado a la búsqueda de variaciones nucleotídicas en las regiones codificantes y sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes del gen *GABRB3* en pacientes con autismo. De las restantes 3 variantes encontradas, la variante p.P25P en el exón 1a, encontrada en 6 pacientes (33,33%), constituye una variante silente reportada previamente en dbSNP (38) en pacientes autistas coincidentalmente de una población china, no disponiéndose en la base de datos de SNP de ninguna información referente a su frecuencia alélica. Sin embargo, a pesar de ser un polimorfismo silente, se encuentra en el nucleótido -6, muy cercano de la región consenso 3' del exón 1a, por lo que su papel en la interacción con la nucleorriboproteína U1 no debe ser desestimado. También es interesante resaltar, que este grupo de pacientes, que representaba el 33,33% de los casos, también presentaba la variante IVS3+13C>T, ambas muy cercanas a sitios de interacción con la nucleorribonucleoproteína U1 del empalmesoma, y que el 66,66% de los mismos, tenía un antecedente familiar de autismo.

A pesar de que la coexistencia de las dos variantes fue evidenciada en 16,67% de los controles, se hace interesante la realización de un estudio de asociación amplio con SNPs individuales y haplotipos que incluyan estas dos variantes. También resulta interesante resaltar que el 66,66% (4/6) de los pacientes con ambas variantes tenían antecedentes familiares de autismo, lo que sugiere fuertemente en esas familias, la he-

rencia de un alelo de susceptibilidad al autismo; mientras que por otra parte, en el 75% (3/4) de estas mismas familias el antecedente era por la línea parental paterna, lo que podría tener implicaciones en los mecanismos epigenéticos que pudieran influir en la expresión del fenotipo autista como la impronta genómica, en concordancia con lo sugerido previamente por Shao y col. (26).

El tercer y cuarto SNP: IVS5+40T>G e IVS7-70A>G fueron identificados en dos pacientes diferentes y se encuentran localizados en regiones intrónicas alejadas de los sitios claves para el empalme del ARNm. Ninguno de éstos ha sido reportado en la base de datos de SNP (dbSNP) (38); y, aunque sólo se evidenciaron en pacientes en forma individual, constituyen nuevas variantes presentes en nuestra población que merecen ser estudiadas más extensamente para determinar sus frecuencias alélicas y su posible inclusión en un haplotipo asociado con el autismo.

Aunque no se encontraron mutaciones no sinónimas en las regiones codificantes del gen *GABRB3* en nuestros pacientes, no es posible excluir del todo la posibilidad de que en una muestra mayor o en poblaciones diferentes a la nuestra, puedan existir éstas y estar asociadas como alelos de susceptibilidad a subgrupos específicos de pacientes con autismo; sin embargo, se puede afirmar que en los pacientes estudiados, de existir una disfunción cualitativa o cuantitativa en la subunidad $\beta 3$ del receptor del GABA-A, ésta no se debe a mutaciones puntuales que produzcan una sustitución directa de un aminoácido por otro diferente en la proteína.

Esta investigación ha sido pionera en el análisis molecular de genes candidatos de susceptibilidad al autismo en Venezuela, y cumplió el objetivo de identificar variantes en el gen *GABRB3*, algunas de las cuales podrían ser candidatas para la realización de estudios funcionales y de expresión

génica. Dado que se trató de un estudio exploratorio, se hace necesaria la corroboración de los hallazgos obtenidos en una muestra mayor que permita la realización del análisis de asociación correspondiente.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el CONDES (Proyectos N° CC-0549-02 y CC-0317-01) y por el FONACIT (Proyecto G-99000035).

REFERENCIAS

1. **Bespalova I, Buxbaum JD.** Disease susceptibility genes for autism. *Ann Med* 2003; 35:274-281.
2. **Lord C, Cook E, Leventhal B, Amaral D.** Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 2000; 28(2):355-363.
3. **Villalobos A, Borregales L.** Características epidemiológicas del autismo en la población infantil residente en el Municipio Maracaibo. Estudio Preliminar. (Resumen). Memorias del I Simposio Internacional de autismo en el Zulia: Construyendo redes de colaboración, 2005. Maracaibo, Venezuela. p 4.
4. **Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M.** Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995; 25:63-78.
5. **Lamb J, Moore J, Bailey A, Monaco A.** Autism: recent molecular genetic advances. *Hum Mol Genet* 2000; 9 (6):861-868.
6. **Philippe A, Martínez M, Guilloud-Bataille M, Gillberg C, Rastam M, Sponheim E, Coleman M, Zapella M, Aschauer H, Van Maldergem L, Penet C, Feingold J, Brice A, Leboyer M, and The Paris Research Sibpair Study.** Genome wide-scan for autism. *Hum Mol Genet* 1999; 8:805-812.
7. **Barrett S, Beck JC, Bernier R, Bisson E, Braun TA, Casavant TL, Childress D, Folstein SE, Garcia M, Gardiner MB, Gilman S, Haines JL, Hopkins K, Landa R, Meyer NH, Mullane JA, Nishimura DY, Palmer P, Piven J, Purdy J, Santangelo SL, Searby C, Sheffield V, Singleton J, Slager S (CLSA, Collaborative Linkage Study of Autism).** An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism. *Am J Med Genet* 1999; 88:609-615.
8. **Cook EH Jr, Courchesne RY, Cox NJ, Lord C, Gonen D, Guter SJ, Lincoln A, Nix K, Haas R, Leventhal BL, Courchesne E.** Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11-13 markers. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1077-1083.
9. **Martin ER, Menold MM, Wolpert CM, Bass MP, Donnelly SL, Ravan SA, Zimmerman A, Gilbert JR, Vance JM, Maddox LO, Wright HH, Abramson RK, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA.** Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *Am J Med Genet* 2000; 96:43-48.
10. **Blatt GJ, Fitzgerald CM, Guptill JT, Booker AB, Kemper TL, Bauman ML.** Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: An autoradiographic study. *J Autism Dev Disord* 2001; 31(6):537-543.
11. **Moreno-Fuenmayor H, Borjas L, Arrieta A, Valera V, Socorro-Candanoza L.** Plasma excitatory amino acids in autism. *Invest Clin* 1996; 37(2):113-128.
12. **Cohen B.** Elevated levels of plasma and urine gamma-amino-butyric acid: a case study of an autistic child (letter). *Autism* 1999; 3:437-440.
13. **Dhossche D, Applegate H, Abraham A, Maertens P, Bland L, Benesath A, Martínez J.** Elevated plasma gamma-amino-butyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Med Sci Monit* 2002; 8(8):1-6.
14. **Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM.** Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 2005; 14(4):483-492.
15. **Buhr A, Bianchi M, Baur R, Courtet P, Pignay V, Boulenger J, Gallati S, Hinkle DJ, Sigel ME.** Functional characterization

- of the new human GABA-A receptor mutation $\beta 3(R192H)$. *Hum Genet* 2002; 111: 154-160.
16. Glatt K, Glatt H, Lalande M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics* 1997; 41:63-69.
 17. Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Greenberg DA, Kilifarski M, Reichert J, Cook EH Jr, Fang Y, Song CY, Vitale R. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol Psychiatry* 2002; 7:311-316.
 18. Maestrini E, Lai C, Marlow A, Matthews N, Wallace S, Bailey A, Cook EH, Weeks DE, Monaco AP. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Am J Med Genet* 1999; 88:492-496.
 19. Salmon B, Hallmayer J, Rogers T, Kalaydjieva L, Petersen PB, Nicholas P, Pingree C, McMahon W, Spiker D, Lotspeich L, Kraemer H, McCague P, Dimiceli S, Nouri N, Pitts T, Yang J, Hinds D, Myers RM, Risch N. Absence of linkage and linkage disequilibrium to chromosome 15q11-q13 markers in 139 multiplex families with autism. *Am J Med Genet* 1999; 88:551-556.
 20. Nurmi EL, Bradford Y, Chen Y, Hall J, Arnone B, Gardiner MB, Hutcheson HB, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Copeland-Yates SA, Michaelis RC, Wassink TH, Santangelo SL, Sheffield VC, Piven J, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe JS. Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families. *Genomics* 2001; 77:105-113.
 21. Rish N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Brent PP, Pingree C, McMahon W, Wong D, Cavalli-Sforza LL, Kraemer H, Myers R. A Genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Genet* 1999; 65: 493-507.
 22. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium: A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. *Hum Molec Genet* 1998; 7:571-578
 23. Bass MP, Menold MM, Wolpert CM, Donnelly SL, Ravan SA, Hauster ER. Genetic studies in autistic disorder and chromosome 15. *Neurogenetics* 2000; 2:219-226.
 24. Menold MM, Shao Y, Wolpert CM, Donnelly SL, Raiford KL, Martin ER, Ravan SA, Abramson RK, Wright HH, DeLong GR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Gilbert JR. Association analysis of chromosome 15 gabraa receptor subunit genes in autistic disorder. *J Neurogenet* 2001; 15:245-259
 25. Ashley-Koch AE, Mei H, Jaworski J, Ma DQ, Ritchie MD, Menold MM, DeLong GR, Abramson RK, Wright HH, Hussman JP, Cuccaro ML, Gilbert JR, Martin ER, Pericak-Vance MA. An analysis paradigm for investigating multi-locus effects in complex disease: examination of three GABA receptor subunit genes on 15q11-q13 as risk factors for autistic disorder. *Ann Hum Genet* 2006 May; 70(Pt 3):281-292.
 26. Shao Y, Cuccaro ML, Hauser ER, Raiford KL, Menold MM, Wolpert CM, Ravan SA, Elston L, Decena K, Donnelly SL, Abramson RK, Wright HH, DeLong GR, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Fine mapping of autistic disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. *Am J Hum Genet* 2003; 72:539-548.
 27. Nurmi E, Down M, Tadevosyan-Leyfer MA, Haines J, Folstein S, Sutcliffe J. Exploratory Subsetting of Autism Families Based on Savant Skills Improves evidence of genetic Linkage to 15q11-q13. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2003; 42 (7):856-863.
 28. Ma DQ, Jaworski J, Menold MM, Donnelly S, Abramson RK, Wright HH, DeLong GR, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML. Ordered-subset analysis of savant skills in autism for 15q11-q13. *Am J Med Genet B* 2005; 135(1):38-41.

29. **McCauley JL, Olson LM, Delahanty R, Amin T, Nurmi E, Organ EL, Jacobs M, Folstein SE, Haines JL, Sutcliffe J.** A linkage Disequilibrium Map of the 1-Mb 15q12 GABA-A receptor subunit cluster and association to Autism. *Am J Med Genet* 2004; 131B:51-59.
30. **Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K.** Preparation of genomic DNA. Phenol extraction and concentration of DNA from aqueous solutions. In: *Short protocols in Molecular Biology. Current protocols in Molecular Biology*. Ed. Greene Publishing associates and Wiley-Interscience. 1989. Vol I. pp.1.14.1-1.15.4.
31. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16(3):1215.
32. **Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D, Kraemer R.** Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human disease. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:590-598
33. **Santos F, Peña SD, Epplen JT.** Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genet* 1993; 90:655-656.
34. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with Chain-terminators inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74:5463-5467
35. **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Blast [online]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>.
36. **Scriver CR, Nowacki P, Levaslaiho H.** Guidelines and Recommendations for Content, Structure and Deployment of Mutation Databases. *Hum Mutat* 1999; 13:344-350.
37. **The European Bioinformatics Institute and Genome Research Limited, and others.** ENSEMBL [online]. Available from: URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/
38. **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) [online]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
39. **Thanaraj TA and Clark F.** Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(12):2581-2593.
40. **Faustino NA, Cooper T.** Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003; 17:419-437.
41. **Wan J, Carr JR, Baloh RW, Jen JC.** Nonconsensus intronic mutations cause episodic ataxia. *Ann Neurol* 2005; 57(1): 131-135
42. **Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, Craig J, Newbury-Ecob R, Bennet Ch, Vize CJ, Desai SP, Black GC, Patel N, Teimory M, Markham AF, Inglehearn CF, Churchill AJ.** Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1369-1378.
43. **DeLorey T, Handforth A, Anagnostaras S, Homanics G, Minassian B, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW.** Mice lacking the $\beta 3$ Subunit of the GABA-A receptor have the epilepsy phenotype and many behavioral characteristics of Angelman Syndrome. *J Neurosci* 1998; 18(20):8505-8514.
44. **Liljelund P, Handfoth A, Homanics G, Olsen RW.** GABA-A receptor $\beta 3$ subunit gene-deficient heterozygous mice show parent-of-origin gender-related differences in $\beta 3$ subunit levels, EEG, and behavior. *Develop Brain Res* 2005; 157(2):150-161
45. **Bonora E, Lamb JA, Barnby G, Sykes N, Moberly T, Beyer KS, Klauck SM, Poustka F, Bacchelli E, Blasi F, Maestrini E, Battaglia A, Haracopos D, Pedersen L, Isager T, Eriksen G, Viskum B, Sorensen EU, Brondum-Nielsen K, Cotterill R, Engeland H, Jonge M, Kemner C, Steggehuis K, Scherpenisse M, Rutter M, Bolton PF, Parr JR, Poustka A, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC).** Mutation screening and association analysis of six candidate genes for autism on chromosome 7q. *Eur J Hum Genet* 2004; 13(2):198-207

-
46. **Pritchard JK.** Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?. *Am J Hum Genet* 2001; 69:124-137
 47. **Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, Richter DJ, Lander ES, Altshuler D.** Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 2002; 32:135-142.
 48. **Pickles A, Bolton P, Medonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim C.** Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history of autism. *Am J Hum Genet* 1995; 57:717-726
 49. **Chugani DC, Muzik O, Juhasz C, Janisse JJ, Ager J, Chugani HT.** Postnatal maturation of human GABA-A receptors measured with positron emission tomography. *Ann Neurol* 2001; 49(5):618-626.
 50. **Aldred S, Moore KM, Fitzgerald M, Waring RH.** Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *J Autism Dev Disord* 2003; 33(1):93-97.