

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Studium retrotranspoziční hypotézy dysregulace exprese genů u poruch autistického spektra

**Leonard Walletzký
Jihomoravský Kraj**

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Studium retrotranspoziční hypotézy dysregulace
exprese genů u poruch autistického spektra**

**Exploring a retrotransposon regulatory hypothesis
in autism spectrum disorder**

Autoři: Leonard Wallezký

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 602 00, Brno

Kraj: Jihomoravský Kraj

Konzultant: MSc. Sabrina Leddy

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 15.2.2023Leonard Walletzký.....

Poděkování

V této části bych rád poděkoval MSc. Sabrině Leddy z Cornell University, za její neocenitelnou pomoc při vedení našeho výzkumu od začátku až do konce a za její významný přínos k projektu a samotnému článku. Skutečně byla mimořádnou mentorkou a klíčovou postavou při vytváření této studie.

In this section, I would like to thank Sabrina Leddy (Cornell University), to whom I am incredibly grateful as she has guided our research from start to finish and provided much-needed contributions to the project and the paper itself. She has truly been an extraordinary mentor and a cornerstone of this study's creation.

Anotace

Mobilní elementy (ME) jsou pohyblivé prvky, které tvoří přibližně 50 % lidského genomu. Většina těchto prvků však ztratila svou schopnost transpozice a převzala různé funkce v genomu, například regulaci exprese hostitelských genů, díky jejich hojnosti CpG ostrůvků, vazebných míst pro transkripční faktory a dalších regulačních sekvencí. U specifických rodin ME bylo zjištěno, že jsou hojnější a objevují se ve větším množství poblíž genů spojených s poruchami autistického spektra (PAS), což naznačuje genomickou a potenciálně regulační nestabilitu u jedinců s PAS. V této studii jsme použili veřejně dostupná data z hromadného sekvenování RNA (bulk RNA-seq) k objasnění určitých mechanismů souvisejících s kontrolou epigenetických modifikací ME a jejich účinky na exprese genů. Kromě toho jsme se pokusili identifikovat, pokud možno, rodiny transpozonů, které jsou hojně zastoupeny poblíž genů spojených s PAS. Nakonec jsme zkoumali funkční homogenitu genů s odlišnou expresí (Differentially expressed genes – DEGs) u pacientů s PAS pomocí analýzy ve statistickém programu Webgestalt.

Klíčová slova

poruchy autistického spektra; transpozony; retrotranspozony; Webgestalt; diferenciálně exprimované geny

Annotation

Transposable Elements (TEs) are mobile elements making up approximately 50 % of the human genome. Most of these elements however lost their transposition capacities and assumed different functions in the genome, such as host gene expression regulation, due to their abundant CpG and transcription factor binding sites, among other regulatory sequences. Specific TE families have been found to be more abundant and appear in larger quantities close to genes implicated in autism spectrum disorder (ASD), implying genomic and potentially regulatory instability in individuals with ASD. In this study, we used publicly available bulk RNA-seq data to elucidate certain mechanisms related to the control of epigenetic modifications of TEs and their effects on gene expression. Additionally, we aimed to identify which, if any, TE families are enriched near the ASD-implicated genes. Finally, we explored the functional homogeneity of the differentially expressed genes (DEGs) in ASD patients by employing gene ontology and pathway enrichment analysis.

Keywords

autism spectrum disorder; transposable elements; retrotransposons; Webgestalt; differentially expressed genes

Obsah

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretický úvod.....	9
2.1	PAS.....	9
2.1.1	Klasifikace PAS dle DSM-5.....	9
2.1.2	Genetický podklad PAS.....	11
2.1.3	Imunologický podklad PAS.....	14
2.1.4	Terapie a diagnostika PAS.....	16
2.2	Mobilní Elementy.....	17
2.2.1	Regulační schopnosti mobilních elementů.....	19
2.2.2	Mechanismy epigenetických modifikací retroelementů.....	22
2.2.3	Regulace imunity prostřednictvím retrotranspozonů.....	23
2.2.4	Vztah mezi PAS a retroelementy.....	23
3	Cíle práce.....	25
4	Materiály a metody.....	26
4.1	Data.....	26
4.2	Analýza diferenciální genové exprese.....	26
4.3	Genome browser analýza.....	26
4.4	Analýza obohacení mobilních elementů.....	27
4.5	WebGestalt pathway a gene ontology analýza.....	28
4.6	Analýza obohacení KRAB Zinc-Finger proteinů.....	28
5	Výsledky.....	29
5.1	DEA.....	29
5.2	Genome browser a obohacení mobilních elementů.....	32
5.3	Analýza nadměrného zastoupení a obohacení sady genů.....	34
5.3.1	Analýza diferenciálně exprimovaných genů z DEA za pomoci ORA.....	34
5.3.2	Analýza diferenciálně exprimovaných genů z DEA za pomoci GSEA.....	34
5.3.3	Analýza datových sad genů s určitými ME v jejich blízkosti.....	36
6	Diskuze.....	40
6.1	LILR rodina.....	40
6.2	DOCK rodina.....	41
6.3	Webgestalt analýza.....	41

6.4	KZNF analýza.....	43
7	Závěr.....	44
8	Použitá Literatura.....	45
9	Internetové zdroje	55
10	Seznam obrázků a tabulek	56
11	Dodatečné materiály	57

Seznam použitých zkratk

PAS – Poruchy autistického spektra

DEG – Diferenciálně exprimované gen/y

ME – Mobilní Elementy

SNP – Jednonukleotidový polymorfismus

SNV – Jednonukleotidová varianta

CNV – Variabilita počtu kopií

CNVs – Varianty počtu kopií

TSS – Startovní místo transkripce

DSM-5 – Pátá revize diagnostického a statistického manuálu duševních poruch

ICD/MKN – Mezinárodní klasifikace nemocí

CNS – Centrální nervový systém

DEA – Analýza diferenciální genové exprese

ORA – Analýza nadměrného zastoupení

GSEA – Analýza obohacení sady genů

DAG – Directed acyclic graph

CpG – Cytosin-fosfát-Guanin

EWAS – Asociační studie na úrovni celého epigenomu

GWAS – Asociační studie na úrovni celého genomu

1 ÚVOD

Od první definice autismu Lea Kannerova v roce 1943 a popisu „autistické psychopatie dětství“ od Hanse Aspergera o rok později, se diagnóza a porozumění této záhadné a fascinující poruše výrazně změnilo. Z původní Kannerovy definice autismu, coby dětské psychózy, přes slavnou teorii „chladničky matky“ Bruna Bettelheima (která obviňovala chování matek k dětem z vývoje autismu) se postupem času stala současnou definicí autismu následující věta: etiologicky a klinicky heterogenní skupina neurobiologických a dědičných poruch klasifikovaných jakožto poruchy autistického spektra (PAS).

Podle Světové zdravotnické organizace se dnes 1 z 100 dětí potýká s poruchami autistického spektra a asi 11–33 % dospělých s PAS komunikuje pouze pomocí jednoduchých frází a vyžaduje podstatnou podporu (Lord *et al.*, 2018). Diagnostické a terapeutické opatření pro PAS jsou však omezené, přestože současná diagnóza je tvořena pokročilými technikami, coby screeningovými nástroji, technologickými nástroji a neurologickými technikami (Tanu a Kakkar, 2019). Některé studie navrhují postup celogenomového sekvenování a následného „genetické poradenství“ u pacientů s autismem, z důvodu silné dědičnosti, s mírou shody 70–90 %, jak ukázaly mnohé studie na dvojčatech (Rosenberg *et al.*, 2009; Wiśniowiecka-Kowalnik a Nowakowska, 2019). Hlavní komplikací tohoto postupu však je, že porozumění genetické podstaty autismu je stále z velké části nejasné (Jiang *et al.*, 2014).

PAS byl v minulosti studován na úrovni genomu, transkriptomu i metylomu, ale i přes všechny podobné studie, genetická podstata PAS zůstává převážně záhadou. Je tedy čas se podívat jiným směrem? Pokusit se ujmout PAS jinak? Současné studie se již dříve zaměřovaly na epigenetickou podstatu autismu, co však většina z nich přehlížela, byla potenciálně silná role mobilních elementů v dysregulaci transkripce genů u autistických pacientů.

Tuto studii jsme tedy strukturovali pro potenciální osvětlení patogeneze autismu z hlediska regulační funkce určitých mobilních elementů. Danou studii jsme postavili na dvou faktech ze dvou na sobě nezávislých studií:

- 1) Transpozony byly nalezeny ve větších množstvích poblíž genů spojených s poruchami autistického spektra (PAS) – Williams *et al.*, 2013
- 2) Expresi genů mohou transpozony ovlivňovat, pokud jsou umístěné maximálně 500 kb (kilobází) od promoterů – Pulver *et al.*, 2023

Faktory, které propojují PAS s mobilními elementy jsou mnohé (viz. Kapitoly 2.1 a 2.2), ale tyto dvě tvrzení jsou pro naši studii skutečně stěžejní.

Jsou tedy mobilní elementy alespoň částečně odpovědné za patogenezi PAS?

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 PAS

PAS (Poruchy Autistického Spektra) jsou klasifikovány jakožto relativně běžné a vysoce heterogenní vývojové poruchy, postihující jedince po celou dobu jeho života. Dnes se pro PAS (anglicky ASD – autism *spectrum disorder*) setkáváme s pojmy pervazivní vývojové poruchy (anglicky *pervasive developmental disorders*) či souhrnně autismus (anglicky *autism*); tyto pojmy se používají jako synonyma. Od původní kodifikace slova „autismus“, jak ho známe dnes, Leem Kannerem, se jeho diagnóza častokrát změnila. Velký význam na historii autismu měl tzv. psychoanalytický proud šedesátých let dvacátého století, který obviňoval chladné chování rodičů, zejména matek (z této doby pochází pojem „matka lednička“ Margaret Mahlerové), z patogeneze autismu. Psychoanalytický směr tudíž vytvořil sociální stigma, jehož vymýcení trvalo dlouhou dobu (Thorová, 2006).

Dnes na autismus pohlížíme spíše z pohledu spektra, kdy každý pacient může mít individuální specifitu symptomů. Podle Světové zdravotnické organizace se dnes 1 z 100 dětí potýká s poruchami autistického spektra, a jelikož autismus může přetrvávat do dospělosti, asi 11–33 % dospělých s PAS komunikuje pouze pomocí jednoduchých frází a vyžaduje podstatnou podporu (Lord et. al., 2018). Pro rodiče dětí s autismem a samotné pacienty představuje diagnóza autismu velkou zátěž, častokrát rezultující v přehodnocení hodnot a celkové reorganizaci života (Mejsnarová, 2016; Attfield & Morgan, 2007).

Níže jsou tedy popsány dnešní diagnostické a terapeutické procesy a možné přístupy k vysvětlení patogeneze autismu (Genetický a imunologický) společně se samotnou klasifikací PAS za pomoci diagnostického manuálu DSM-5 vydaného Americkou psychologickou společností (APA – American Psychological Association).

2.1.1 Klasifikace PAS dle DSM-5

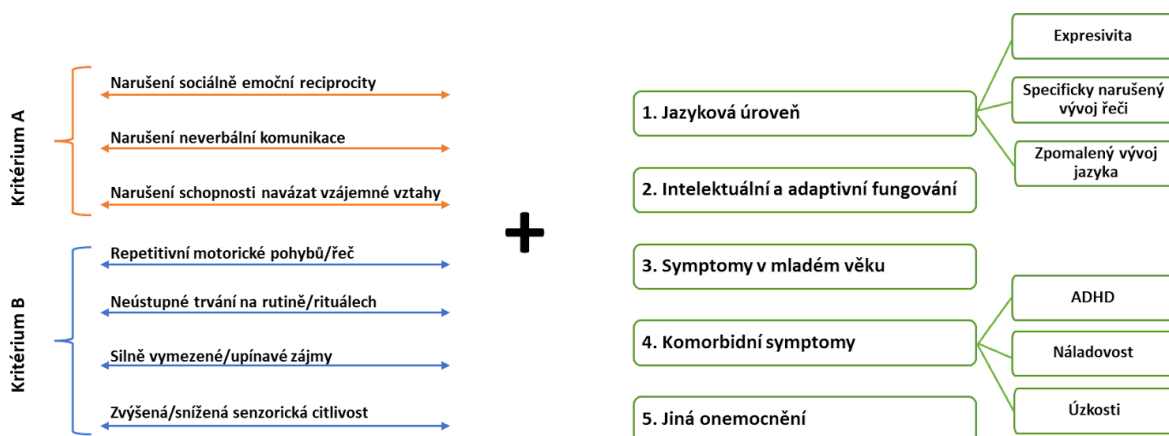
Klasifikace autismu se může lišit dle diagnostických manuálů používaných v jiných státech. Globálně dva nejpoužívanější diagnostické manuály jsou: ICD (International Classification of Diseases), neboli MKN (mezinárodní klasifikace nemocí) používané v České republice, a DSM (Diagnostic and statistical manual of mental disorders). Znamější a vhodnější klasifikace autismu pro účely naší studie je DSM. Pátá revize diagnostického a statistického manuálu (DSM-5), je nejnovější verze manuálu DSM publikované Americkou psychologickou společností, používaná zejména ve Spojených státech amerických (Mejsnarová, 2016).

Autismus je v DSM-5 zařazen do tzv. neurovývojových poruch a jeho řazení se dále nedělí na drobnější diagnózy, jako je například Aspergerův Syndrom či dětský autismus. DSM-5 se tedy explicitně zaměřuje na národu autismu, jakožto spektra (Lai et al., 2013). Jeho diagnóza je založena na dvou základních kritériích (*Obrázek 1*), a to konkrétně:

a) Narušení sociální interakce a komunikace

b) Repetitivní a silně vymezené chování v rámci zájmů a aktivit

Tato dvě základní kritéria jsou následně doplněny individuálními symptomy (*Obrázek 1*), mezi které může patřit specifická jazyková úroveň či jiné komorbidní syndromy, jako například ADHD.



Obrázek 1: Vytvořeno dle Grzadzinski *et al.* (2013). Ukazuje dvě hlavní kritéria a s nimi asociované rysy (nalevo) a individuální symptomy typické pro pacienty s PAS (napravo).

Na základě severity těchto kritérií se PAS řadí do tří úrovní závažnosti, které jsou v manuálu podrobně popsány.

Jedinec s prvním stupněm závažnosti: „vyžadující podporu“, má deficity v sociální komunikaci, které nemusí být nutně znatelné pro normálního pozorovatele. Dokáže se verbálně vyjadřovat, ale iniciace konverzace mu dělá znatelné potíže. Neverbální komunikace je zpravidla na primitivnější úrovni. Může být velice neflexibilní z hlediska změn aktivit a mít problémy s organizací a nezávislém plánování (Mejsnarová, 2016).

Jedinec s druhým stupněm závažnosti „vyžadující značnou podporu“, se vyznačuje znatelnými deficity v sociální komunikaci, jak verbální, tak neverbální. Verbální komunikace se zpravidla pohybuje ve formě jednoduchých vět. Jedinec je z hlediska adaptace osobnostně nepružný a jeho repetitivní chování je zjevné, i pro normálního pozorovatele (Mejsnarová, 2016).

Pod nejzávažnějším a třetím stupněm, „vyžadující značnou podporu“, rozumíme jedince se závažnými nedostatky ve verbální a neverbální komunikaci. Jedinec obvykle iniciuje sociální kontakt pouze za účelem naplnění svých potřeb. Jeho chování je zpravidla neměnné a změna činnosti pro něj představuje značné problémy (Mejsnarová, 2016).

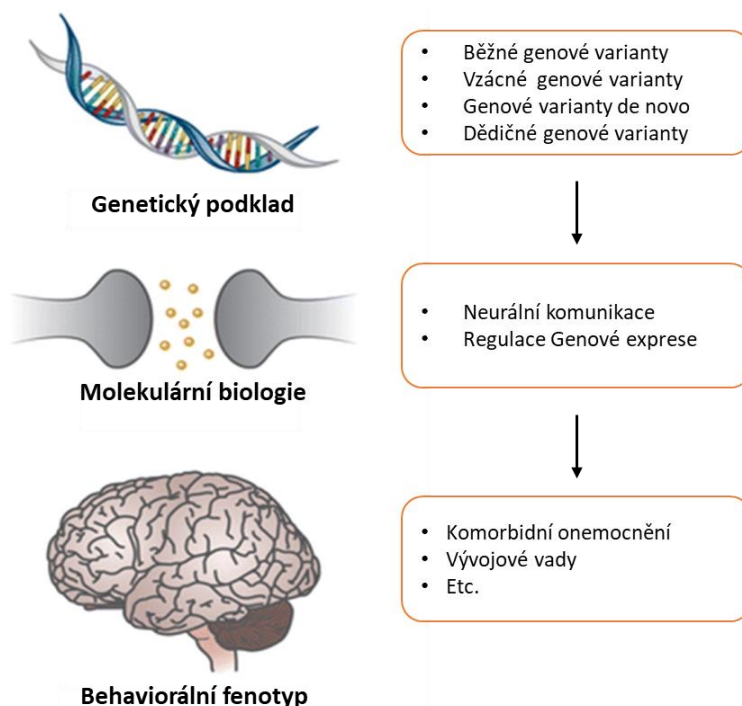
DSM-5 obecně zaštiťuje vnímání autismu jakožto spektra. Naše studie byla konstruována s pamětí právě na tuto vysokou variabilitu v chování a symptomů pacientů s PAS a pokusila se vysvětlit jejich patogenezi na základě tohoto faktoru.

2.1.2 Genetický podklad PAS

Dnešní pochopení patogeneze autismu je z velké části založené na jeho genetickém podkladu, z důvodu jeho silné dědičnosti, s mírou shody 70–90 %, jak ukázaly mnohé studie na dvojčatech (Rosenberg *et al.*, 2009; Wiśniowiecka-Kowalik & Nowakowska, 2019). Genetické pochopení autismu je z velké části založeno na studiích zaměřujících se na jednonukleotidové polymorfismy a varianty (SNP – single nucleotide polymorphism; SNV – single nucleotide variant), variability počtu kopií (CNV – copy number variation) a cytogenetické abnormality. S tímto přístupem byly již stovky genů spojeny s PAS, jak dokazuje databáze SFARI (SFARI Gene); veřejně dostupná databáze obsahující 1153 genů spojených s PAS, z nichž 288 bylo klasifikováno jako syndromické. V posledních letech došlo také k posunu výzkumu autismu směrem k epigenetickému přístupu, se studii zaměřující se především na úrovně metylace (Ziegler *et al.*, 2009; Nagarajan, 2006) a hydroxymethylace (Zhubi *et al.*, 2014) na dinukleotidech CpG: nukleotidových sekvencích cytosin-fosfát-guanin, kdy je metylací postihován téměř výhradně cytosin. Některé studie dokonce provádějí analýzy metylomu na úrovni celého genomu (Wong *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Typické genotypy pro pacienty s PAS

Změny v sekvenci DNA mohou být u pacientů s PAS velmi rozmanité. Do těchto změn typicky začleňujeme vše od jednonukleotidových (SNP a SNV) či změn v počtu opakování genů (CNV), až po de novo genových variant nebo alterací v počtu chromozomů. Samotná patogeneze autismu je silně multifaktoriální a všechny výše zmíněné změny mohou spolupracovat na vytvoření autistického fenotypu (Kereszturi, 2023) (Obrázek 2). Níže jsou tyto změny rozvedeny do větší hloubky společně s jejich propojením s PAS.



Obrázek 2: Upraveno dle Dias & Walsh (2020). Ukazuje, jak pochopení genového podkladu PAS, může objasnit biologické procesy implikované v jeho patogenezi. Vzhledem k různorodosti genetického podkladu, je tedy nutné jeho další podrobnější studie.

Jednonukleotidové varianty (SNV), jsou variace v jednom nukleotidu DNA, které, na rozdíl od jednonukleotidových polymorfismů (SNP), nejsou vázány na prevalenci v určité populaci (pro SNP, musí být prevalence změn v populaci vyšší než 1 %) (Havdahl *et al.*, 2021). Pokrok v oblasti genového sekvenování umožnil tvorbu nových studií, jako jsou celogenomové asociační studie (GWAS – Genome Wide Association Study), které výrazně zlepšily jejich identifikaci. Dnes je s autismem spojeno velké množství SNV, na základě, kterých byly vytvořeny četné internetové databáze různých SNV a genů asociovaných s autismem (Tabulka 1). Mnoho studií zabývajících se analýzou SNV v autismu konstatovalo značnou genovou heterogenitu, která dále potvrzuje multifaktoriální národu autismu (Guo *et al.*, 2019; Kereszturi, 2023).

Tabulka 1: Ukazuje příklady databází SNV asociovaných s autismem.

VariCarta	https://varicarta.msl.ubc.ca/index
SFARIgene	https://gene.sfari.org/
AutDB	http://autism.mindspec.org/autdb/Welcome.do
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

Variabilitu počtu kopií (CNV – Copy Number Variation) můžeme definovat jakožto jev, při kterém jsou sekvence genomu opakovány a jejichž počet opakování se liší mezi jedinci stejného druhu (Pös *et al.*, 2021). Mezi chromozomové aberace způsobující tento jev, můžeme zmínit zejména delece, duplikace a translokace, jejichž výsledné genotypy hromadně pojmenováváme Varianty v počtu kopií (CNVs – Copy Number Variations). Varianty v počtu kopií reprezentují asi 5-10 % genomu, z kterého 1 % jsou tzv „vzácné“ varianty. A právě tyto vzácné varianty mohou být klíčové k patogenezi mnohých neurovývojových poruch, včetně autismu (Thapar & Cooper, 2013). Mnoho „vzácných“ delecí a duplikací bylo již asociováno s autismem. Nedávné studie také poukazují na oblasti chromozomů s CNVs specifické pro PAS, jako například části dlouhého ramene na chromozomech 1, 7, 15 a 22 (Vicari *et al.*, 2019). Interpretace jejich přesných efektů v PAS, však zůstává převážně neznámou.

Chromozomové alterace spojené s autistickým chováním jsou mnohé. Například jedinec s trisomií 21 neboli Downovým syndromem, má 40x větší šanci vývinu autismu nežli normální jedinec (Oxelgren *et al.*, 2016). Autistické chování se může se zvýšenou prevalencí projevit také u lidí s Klinefelterovým syndromem (nadbytečná kopie chromozomu X) nebo Jacobsenovým syndromem (částečná delece dlouhého ramene na chromozomu 11) (Cordeiro *et al.*, 2012; Kereszturi, 2023). Chromozomové alterace mohou tedy být považovány za jedny z přispívajících faktorů patogeneze PAS.

Mezi výše zmíněnými genovými variantami dále rozlišujeme de novo mutace a dědičné varianty. Varianty de novo jsou zpravidla výsledkem mutace v gametách či v průběhu embryogeneze, zatímco dědičné varianty se nacházejí již v parentálních genomech. Obě dvě tyto varianty mají značný efekt na patogenezi autismu (Kereszturi, 2023).

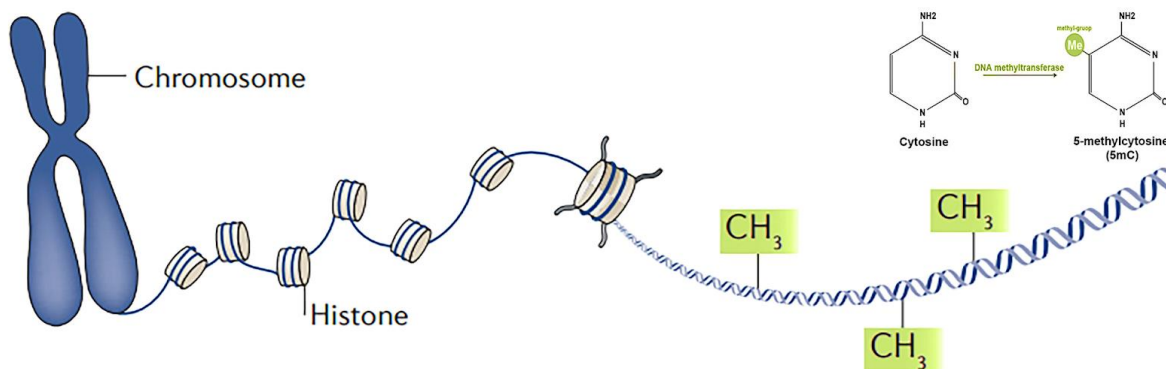
2.1.2.2 Epigenetické a transkriptomické studie PAS

Genová exprese hraje mnohdy klíčovou roli v dekódování funkčních konsekvencí genů, které

následně vedou k patogenezi určitého onemocnění, v našem případě PAS. Díky vývoji sekvenačních technologií, se pochopení PAS na úrovni transkriptomu výrazně zlepšilo. Mnohé studie se v minulosti zabývaly analýzou diferenciálně exprimovaných genů (DEG), tzn. genů s lišící se expresí mezi pacienty s PAS a zdravými jedinci, ve vzorcích krve a ve vzorcích mozkové tkáně, získané post-mortem (Havdahl *et al.*, 2021). Pozorované rozdíly v expresi, mohou být zapříčiněné dysfunkcí určitých epigenetických mechanismů, které ji regulují (Schiele & Domschke, 2016). Epigenetika a transkriptomika mohou tudíž být v patogenezi PAS blíže spojené disciplíny.

Transkriptomické studie zabývající se vzorky krve odhalily velké množství DEG, u kterých ale není možné s naprostou jistotou určit kauzalitu s patogenezi PAS, jelikož tyto výsledky nejsou přímo reprezentativní transkripčních mechanismů v mozku. Z tohoto důvodu byl rozvoj použití technologií pro sekvenaci RNA (bulk RNA-seq, single cell RNA-seq) pro analýzu vzorků z autistických mozkových tkání klíčový pro dekodování těchto mechanismů. Studie využívající RNA-seq našly, kromě velkého množství dysregulovaných drah související s mozkovou činností, asociaci s dysregulací enhancerové RNA, jež dále podporuje možnou roli epigenetických modifikací v patogenezi autismu (Havdahl *et al.*, 2021).

Epigenetické modifikace jsou silně asociované s patogenezi autismu. Například, studie od Duffney *et al.* (2018), porovnála různé databáze genů asociovaných s PAS a konstatovala, že ze zkoumaných 215 genů implikovaných v PAS, bylo 42 přímo zapojených do epigenetických modifikací upravujících genovou expresi. Nejvíce studovanou epigenetickou modifikací ve spojení s autismem je metylace: zavedení methylové (-CH₃) ke konkrétní aminokyselině či bázi nukleotidu (obvykle cytosinu – formace 5-methylcytosinu) v DNA. Metylace, společně s ostatními epigenetickými mechanismy, umožňuje environmentálním faktorům modulovat výsledný fenotyp jedince alterací genové exprese, jiných regulačních elementů či struktury chromatinu. V souvislosti s PAS, byla metylace v mozkové tkáni studována pomocí asociačních studií na úrovni celého epigenomu (Epigenome Wide Association Study – EWAS), které identifikovaly velké množství diferenciálně methylovaných pozic, které mohou být potenciálně kauzální pro rozvoj PAS. Výsledky některých studií poukazují také na vliv imunitní aktivace na epigenetické modifikace v souvislosti s PAS, přesněji při těhotenství. Maternální imunitní aktivace představuje jednu z hlavních podezříváných složek patogeneze autismu a výsledky těchto studií navrhují, že může zapříčinit epigenetické změny, které mohou vést k patogenezi PAS (Havdahl *et al.*, 2021; Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019).



Obrázek 3: Převzat z Creative biomart (creativebiomart.net). Ukazuje metylaci DNA v eukaryotách na bázích cytozinu (místech CpG).

Epigenetické modifikace mohou mít značný vliv na rozvoj autismu, ale vzhledem k jejich komplexitě, zůstávají z velké části nevysvětlené. Z tohoto důvodu jsme se naší studii rozhodli strukturovat okolo osvětlení těchto modifikací s důrazem na roli Mobilních Elementů (ME) (viz. kapitola 2.2).

2.1.3 Imunologický podklad PAS

Imunitní systém je tvořen z komplikované sítě chemických a buněčných komponent, od buněčných receptorů až po samotné inflamatorní molekuly. PAS je již dlouhou dobu asociován s dysfunkční imunitní aktivací a zvýšenou inflamací. Především maternální imunitní aktivace (MIA) byla s autismem asociována jakožto rizikový faktor, jehož role v rozvoji PAS je podpořena studiem zvířecích modelů (Hughes *et al.*, 2023, Careaga *et al.*, 2017). S autismem je extenzivně propojena zejména dysfunkce nespecifické (vrozené) imunity, specificky dysregulace cytokinů a v jejich důsledku i neuroinflamace.

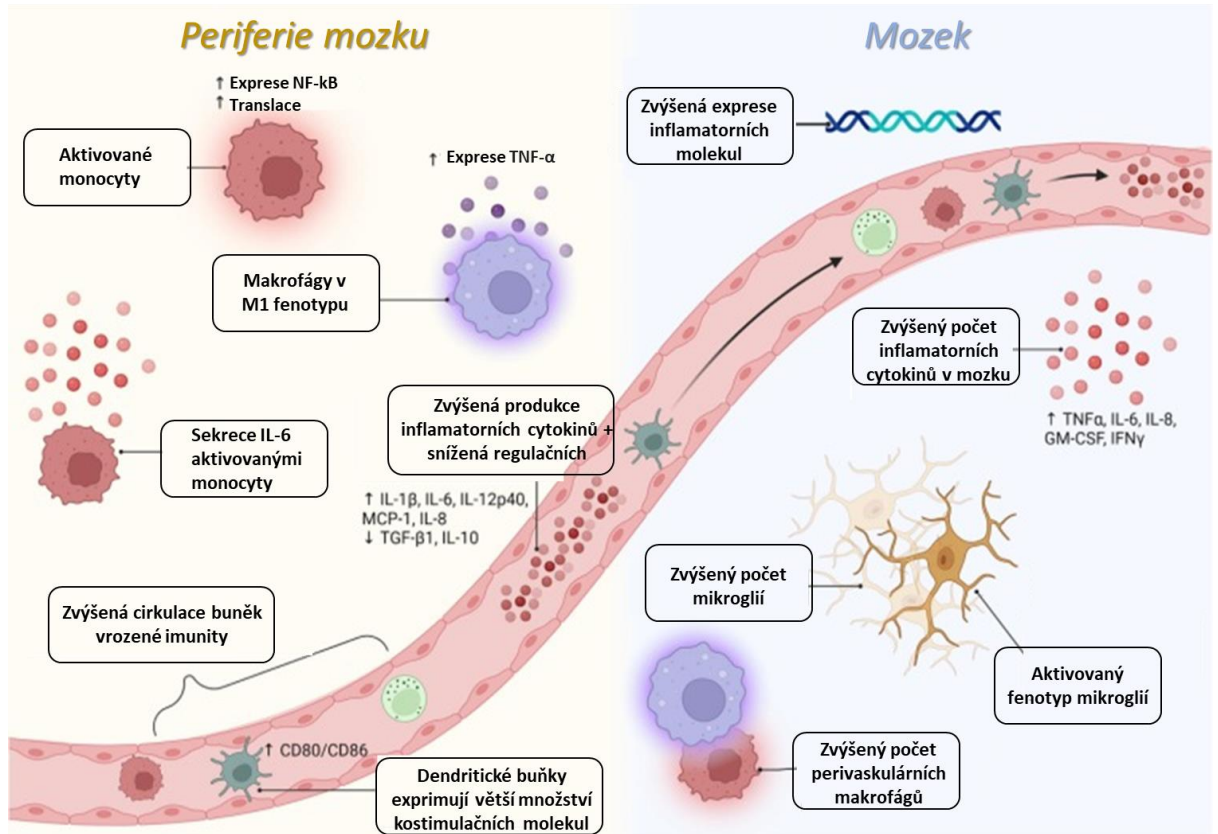
2.1.3.1 Cytokiny

Cytokiny tvoří klíčovou skupinu signálních peptidů zprostředkávajících imunitní odpověď. Kromě jejich imunitní funkce představují nezbytnou součást neurovývoje, jelikož jejich receptory jsou exprimovány na neuronech. Cytokiny například regulují formaci synapsí nebo apoptózu buněk v centrálním nervovém systému (CNS).

U pacientů s PAS byla opakovaně zjištěna zvýšená exprese cytokinů v CNS, konkrétně zvýšená aktivace receptoru TLR4, který iniciuje zvýšenou expresi cytokinů včetně TNF- α (Tumor necrosis factor = faktor nekrotizující nádory), IL-1 β (Interleukin-1 β), a IL-6 (Interleukin-6). Expresie zmíněných cytokinů bývá výrazně zvýšená u dospělých i dětských pacientů s autismem v porovnání se zdravými kontrolami (Emanuele *et al.*, 2010; Ricci *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2023). Výsledky nedávné meta-analýzy, která našla zvýšenou expresi IL-1 β , IL-6, TNF- α , a IFN- γ (Interferon γ) v 38 nezávislých studiích, dále podporují roli cytokinů v patogenezi autismu (Saghazadeh *et al.*, 2019).

Výše zmíněné cytokiny jsou totiž kritické pro organizaci imunitní odpovědi a jejich dysregulace může být příčinou chronického zánětu, například, mediátory monocytů a makrofágů jsou

produkovány na základě vazby mezi nukleárním faktorem kappa B (NF- κ B) a cytokiny, jejichž dysfunkce může způsobit nekontrolovanou imunitní reakci. Dysregulace cytokinů má tudíž četné následky, které mohou kontribuovat k následné dysfunkci jiných biologických procesů jako například mozkové funkce (Obrázek 4) (Hughes *et al.*, 2023).



Obrázek 4: Upraveno podle Hughes *et al.* (2023). Ukazuje dysregulaci nespecifického imunitního systému a jejím efektu na mozkovou funkci (Zvýšený počet a aktivace mikroglíí). Zvýšená exprese cytokinů vede k následné aktivaci makrofágů a monocytů, což dále umocňuje dysregulaci imunitního systému. Homeostáza mozku je pozměněna, jelikož cytokiny, monocyty a makrofágy jsou schopny projít hematoencefalickou bariérou do mozku.

2.1.3.2 Neuroinflamace

Mikroglie jsou specializované makrofágy v CNS, které hrají důležitou roli, jak v neurovývoji tak v homeostáze mozku. Podobně jako monocyty, jsou zodpovědné za sledování svého místního prostředí a mohou se aktivovat, pokud jsou vystaveny cizímu antigenu nebo za zánětlivých podmínek. Studie post-mortem mozkových tkání pacientů s PAS, odhalily důkazy o neuroinflamaci včetně aktivovaných mikroglíí a zvýšené exprese cytokinů. Navíc, transkriptomické analýzy post-mortem mozkových tkání ukázaly obohacení genů spojených s imunitní aktivací. Všechny tyto studie a analýzy poskytují jasné důkazy pro spojení neuroinflamace a patogeneze autismu, ovšem, velikosti vzorků posmrtných mozkových tkání jsou limitované a je potřeba většího množství jejich studií pro pochopení role neuroinflamace v autismu (Hughes *et al.*, 2023).

2.1.4 Terapie a diagnostika PAS

Správná a včasná diagnóza PAS je klíčová pro následnou terapii jedince. I přes pokroky v genetickém pochopení autismu, je genetická diagnostika prozatím nedostačující, ale screeningové technologie mohou být pomocnými nástroji k úspěšné diagnostice (Zwaigenbaum & Penner, 2018). Diagnostika dětí je prováděna dětským psychiatrem a samotná diagnóza je určena dle diagnostického manuálu používaného v dané zemi. V České republice je nejpoužívanější škála CARS (*Clinical autism Rating Scale*), která evaluuje 15 oblastí na základě pozorování a informací od rodičů. Mezi další techniky patří DACH – *dětské autistické chování*, vytvořena Kateřinou Thorovou na základě jejich pozorování, nebo ADI-R (*autism diagnostic interview*). Samotná diagnostika dítěte může být značně problematická a její výsledky mohou být zkresleny neochotou spolupráce dítěte. Nezbytnou součástí je i klinické pozorování dítěte, zejména u dětí, které nekomunikují. Mnohdy se můžeme domnívat, že jsou tyto děti mentálně retardované, což klinické pozorování může vyvrátit (Mejsnarová, 2016). Diagnostika u dospělých může probíhat podobně, jako u dětí a opět záleží na diagnostickém manuálu používaném v dané zemi.

Samotná terapie se liší pro každého jedince s autismem a záleží na kontextu závažnosti jejich stavu. Obecně je doporučeno nasměrování do některého z center, věnujícího se pomoci dětem s autismem, v České republice například centrum APLA – Asociace pomáhající lidem s autismem. Z hlediska vzdělání se klade na tzv. strukturované učení, založeno na základě programu TEACCH (*Treatment and Education of Autistic and Communication Handicapped Children*), který klade důraz na přizpůsobení učebních podmínek na míru autistickým dětem. Pro neverbální děti je často aplikována metoda VOKS – *výměnný obrázkový komunikační systém*, pomocí kterého se dítě dorozumívá prostřednictvím kartiček s konkrétními obrázky (Thorová, 2006).

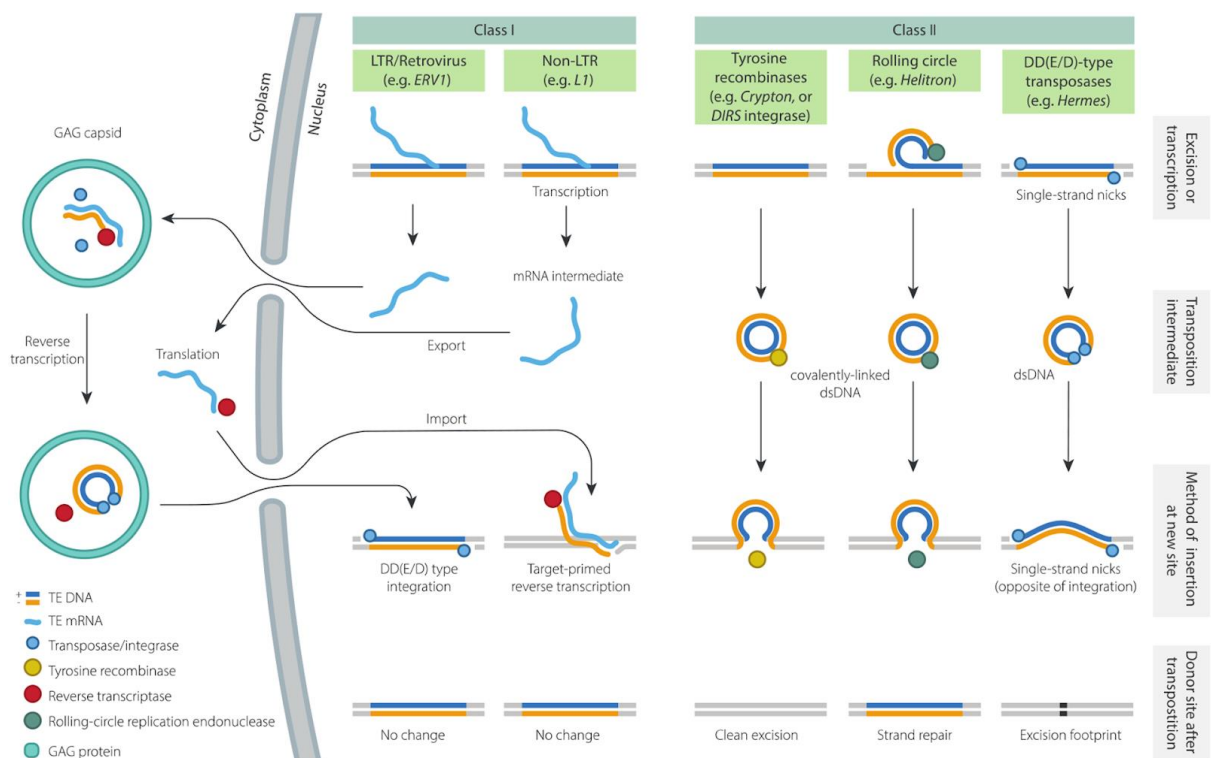
Pro zmírnění symptomů jsou u pacientů s PAS často používány antipsychotika. Pro mládež s PAS (věk 5–16 let) může být použitý např. Risperidon nebo Aripiprazol, které zmírňují agresi. Mnoho používaných antipsychotik, ale často nemá dostatečné důkazy jejich efektivity, např. Fluoxetin (selektivní inhibitor vychytávání serotoninu – SSRI) ukázal určité zmírňující účinky na repetitivní chování dospělých s PAS, ale jeho prospěch nebyl spolehlivě prokázán v pediatrických populacích. Obecně pro terapii za pomoci SSRI chybí důkazy jejich benefičního účinku, ale naopak, některé studie prokázaly potenciální adverzní efekty pro pacienty s PAS (Genovese & Butler, 2020).

S dnešním vývojem genového inženýrství, zejména metody CRISPR-Cas9, je do budoucna představitelná genová terapie pro pacienty s PAS. Naše momentální znalost genetického podkladu onemocnění je pro realizaci podobné terapie prozatím nedostačující.

2.2 Mobilní Elementy

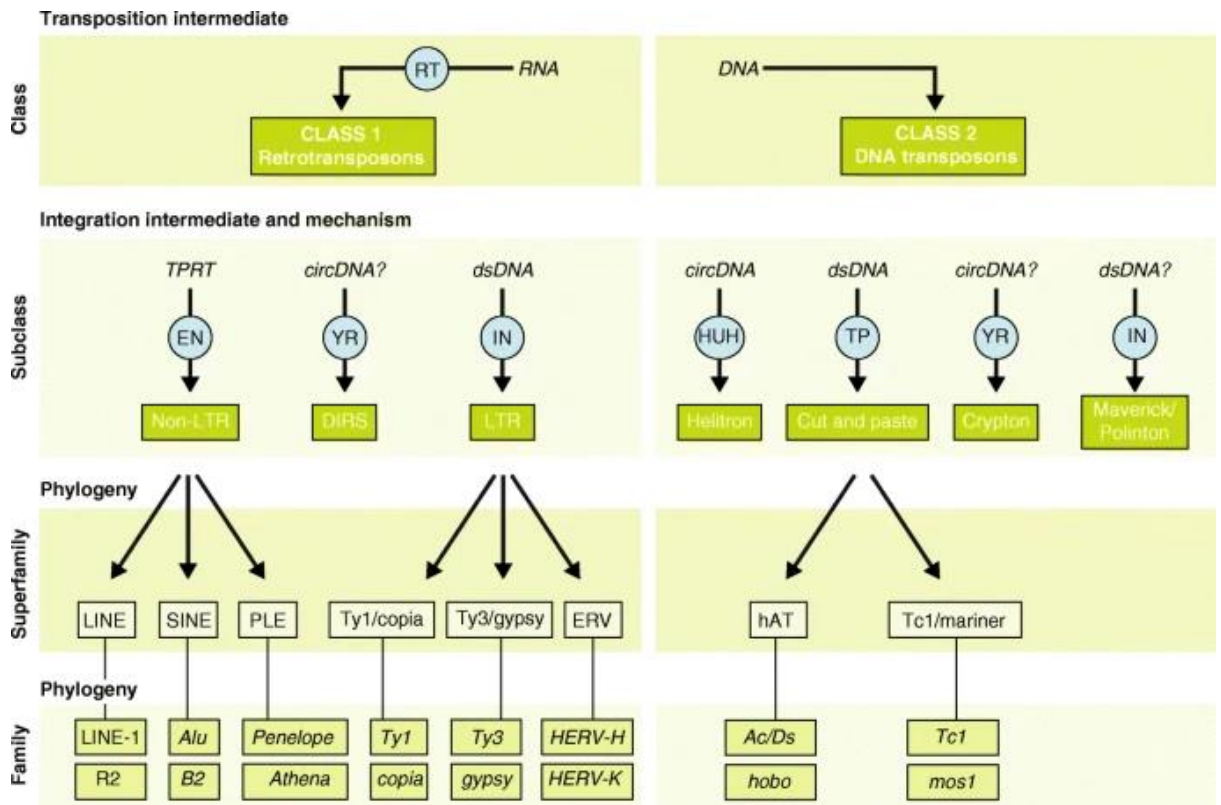
Lidský genom představuje stále se měnící „ekosystém“ rozmanitých genových sekvencí. Dnes z hlediska jeho složení víme, že se skládá zejména ze čtyř částí: jedinečných sekvencí, kódující DNA, nekódující DNA a repetitivních sekvencí, což jsou často se opakující kopie v DNA. Právě repetitivní sekvence významně kontribuovaly a stále kontribuují k rozmanitosti genových sekvencí. Můžeme je rozdělit mezi dva typy: Tandemové repetice (Tandem repeats - TR), jednotlivé kopie sekvencí vkládané v řadě za sebou, a rozptýlené repetice (Interspersed repeats - IR), na rozdíl od TR se v genomu vyskytují samostatně a souhrnně je nazýváme mobilní elementy (TE - anglicky *transposable elements*) (Pošvářová, 2016).

Mobilní elementy (ME), také nazývané transpozony, jsou obecně klasifikovány jako sekvence DNA schopné změnit svou pozici v genomu. Představují pozůstatky předchozích retrotranspozičních událostí a tvoří přibližně 50 % lidského genomu. Jejich nejzákladnější rozdělení se zakládá na klasifikaci Davida Finnegana z roku 1989, která rozlišuje dvě třídy v závislosti na meziprojektu nukleové kyseliny, které používají k transpozici. Jsou to: DNA-transpozony (třída I), které používají DNA jako jejich meziprodukt, a retrotranspozony (třída II), které používají RNA jako jejich meziprodukt. Mechanismy jejich transpozice jsou dvojího typu: „copy-and-paste“ a „cut-and-paste“. Retrotranspozony používají mechanismus „copy-and-paste“, při kterém zůstává templátová DNA netknutá, a tudíž jsou retrotranspozony schopny se „množit“, zatímco většina DNA-transpozonů používá mechanismus „cut-and-paste“ při kterém je sekvence transpozonu vyjmuta a přenesena na nový lokus (Obrázek 5). Samotné enzymy použité k jejich transpozici buďto kódují transpozony sami (autonomní prvky) nebo spoléhají na enzymy ostatních ME (neautonomní prvky) (Wells & Feschotte, 2020).



Obrázek 5: Převzat od Wells & Feschotte, 2020. Ukazuje různé mechanismy transpozice. Třída I (retrotranspozony) používá RNA meziprodukt, který integruje za pomoci enzymů transponázy / integrázy nebo reverzní transkriptázy do jiné části genomu. RNA je zpracována v cytoplazmě a následně vložena do genomu. Třída II (DNA-transpozony), používá DNA meziprodukt, který je následně vložen do genomu za pomoci enzymů tyrosinové rekombinázy, endonukleázy replikace typu rotujícího kruhu (Rolling-circle replication) nebo transponázy. Celý proces je vykonán v buněčném jádru.

Mobilní elementy můžeme dále rozdělit do skupin dle jejich využití určitého mechanismu transpozice (Obrázek 5). Náš výzkum byl založen převážně na bázi retroelementů, a tudíž se podíváme hlouběji zejména na ně.



Obrázek 6: Převzato od Bourque *et al.* (2018). Ukazuje schéma klasifikace transpozonů. Modré kruhy zastupují transpoziční enzymy. Zkratky: EN – endonukleáza, IN – integráza, YR – tyrosin rekombináza, HUH – Rep / helicase protein s endonukleázovou aktivitou, RT – reverzní transkriptáza, TP – transponáza, TPRT – cíl primovaná reverzní transkripce (Target-Primed Reverse Transcription), circDNA – meziprodukty s kruhovou DNA, dsDNA – meziprodukt s lineární dvouřetězcovou DNA.

DNA-transpozony představují asi 2-3 % genomu a jsou to autonomní elementy. Hlavním mechanismem jejich pohybu je již zmíněný „cut-and-paste” mechanismus, který je zprostředkován enzymem transponázy, ale existují i další (Obrázek 6). V současné době, jsou však transpozičně neaktivní.¹

¹ DNA-transpozony mají na obou svých koncích tzv. koncové terminální repetice (TIR – Terminal Inverted Repeats), které jsou transponázou rozpoznány. Transponáza následně DNA-transpozon vystřihne a spojí oba volné konce DNA (Obrázek 5), poté ho opět rozštěpí a vloží transpozon na své nové místo.

Retrotranspozony představují asi 45 % genomu a jsou rozděleny do dvou skupin podle toho zda obsahují dlouhé koncové repetice (LTR - Long Terminal Repeats) či nikoli (Non-LTR).

LTR-retrotranspozony

LTR-retrotranspozony jsou často přirovnávány k vnitrobuněčným parazitů, zejména retrovirům. Virům se totiž podobají nejen strukturou, ale i pohybem po genomu. V důsledku, hlavní skupinu LTR-retrotranspozonů nazýváme tzv. endogenní retroviry (ERV – Endogenous retrovirus). Je možné, že se vyvinuly z nějakého proviru, který nakonec došel k symbióze s organismem a ponechal si své transpoziční schopnosti (*Obrázek 7*). Systém jejich transferu v genomu je zprostředkován enzymem integrázy a dnes tvoří asi 7-8 % genomu (Pošvářová, 2016; Bourque *et al.*, 2018).

Non-LTR retrotranspozony

Tento druh retroelementů zahrnuje dlouhé a krátké rozptýlené jaderné elementy (SINE – Short Interspersed Nuclear Element a LINE – Long Interspersed Nuclear Element) a dnes tvoří většinu mobilních elementů v genomu. Prvky SINE představují neaktivní elementy a jsou tedy naprosto dependentní na aktivitě prvků LINE a obvykle podporují jejich rozšíření. Prvky LINE jsou z hlediska naší studie zajímavější. Rozlišujeme u člověka tři rodiny: LINE 1, 2, 3, z nichž největší zastoupení má rodina L1, která má také nejvyšší transpoziční aktivitu v celém genomu (Pošvářová, 2016; Wells & Feschotte, 2020).

Nicméně, více než 90 % retrotranspozonů ztratilo schopnost transpozice kvůli akumulaci bodových mutací, které vedou k neschopnosti kódovat transpoziční enzymy (Oja *et al.*, 2007; Lynch, 2007). Bez své transpoziční schopnosti, transpozony často slouží k jiným funkcím, jako je regulace transkripce, která figuruje jakožto hlavní téma naší studie.

2.2.1 Regulační schopnosti mobilních elementů

Cis-regulační sítě jsou sítě regulačních sekvencí (cis elementů), které jsou umístěné daleko od transkripčního startovního místa (TSS – transcription start site), ale na stejné molekule DNA. Tyto sítě koordinují transkripci často velkého počtu genů, jejichž proteinové produkty spolupracují na organizaci různých biologických funkcí a drah. Nyní, četné studie přináší důkazy, že mobilní elementy (zejména retrotranspozony) byly bohatým zdrojem materiálu pro vytvoření těchto sítí, vzhledem k jejich multiplikační nátuře (Lynch *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2014; Notwell *et al.*, 2015). A skutečně, inserce transpozičních elementů může vytvořit nové enhancerové či promotorové sekvence pro různé geny. A jelikož se mobilní elementy replikují a osidlují genom jakožto příbuzné kopie, mají afinitu ke stejným regulačním molekulám, a tudíž vytváří specifické regulační sítě (Bourque *et al.*, 2018).

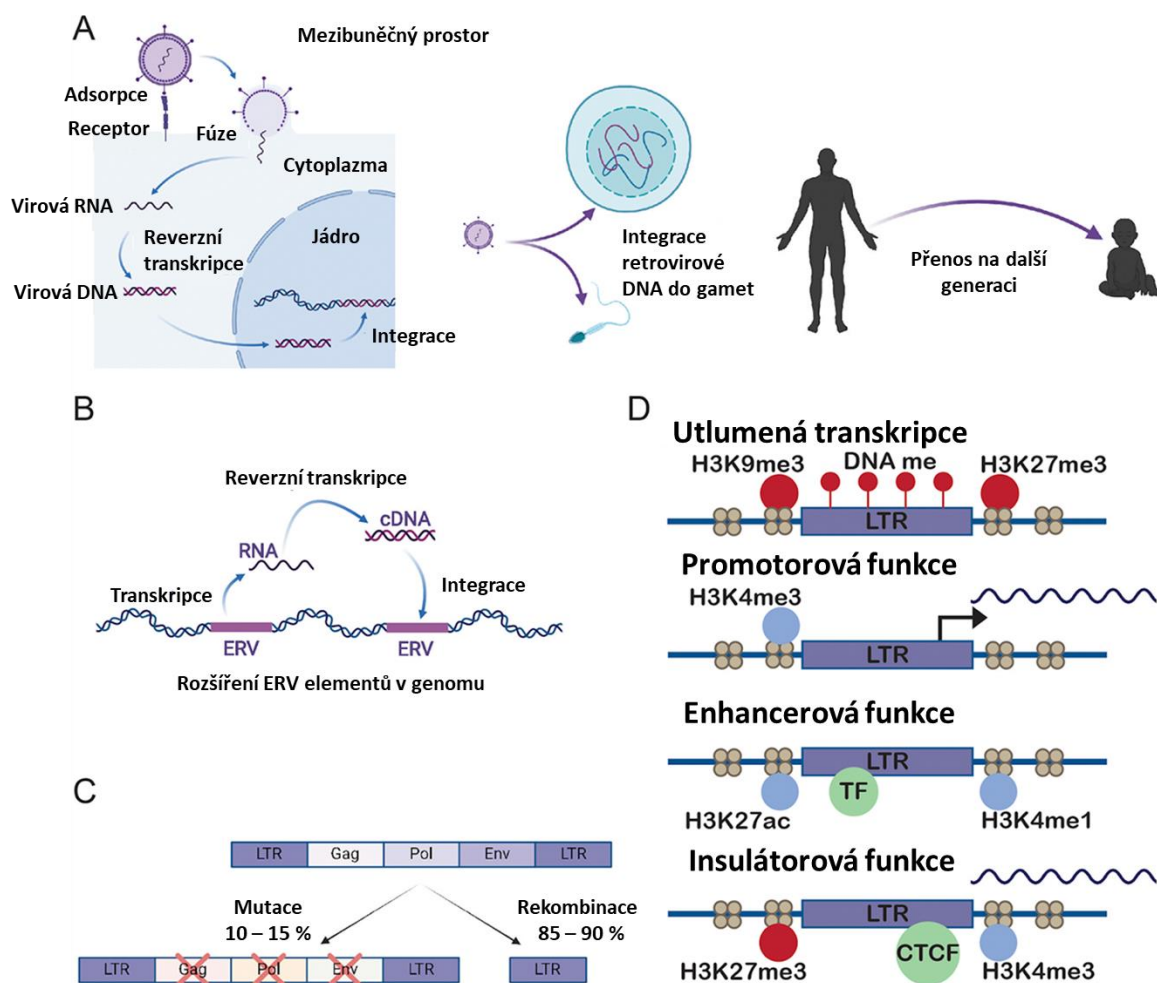
Transpozony totiž tvoří přibližně 52 % všech CpG míst v genomu (Su *et al.*, 2012), což dokazuje jejich značnou afinitu k metylaci. Obsahují také mnoho vazebných míst pro transkripční faktory (Qiu & Köhler, 2020), přičemž např. výše zmíněné endogenní retroviry (ERVs – druh transpozonů) obsahují dlouhé terminální repetice (LTRs – long terminal repeats),

které mají značný regulační potenciál (Xiang & Liang, 2021). Existuje několik případů, kdy tyto faktory výrazně ovlivňují konkrétní fenotyp, například barva srsti myši *aguti*, která je ovlivněna úrovněmi metylace transpozonu nad jejím promotorem (Michaud *et al.*, 1994; Bourque *et al.*, 2018). A jelikož genetická hypometylace bývá spojena s genomickou nestabilitou, molekuly regulující metylaci transpozonů, mají také stabilizační funkci. (Patchsung *et al.*, 2017).

Z hlediska specifických mobilních elementů se jedná zejména o retrotranspozony, specificky ERV a LINE elementy (spojené nejvíce svými cis-regulačními schopnostmi), které se svým specifickým transpozičním mechanismem dokázali po genomu rozmnožit. Je nutné zmínit, že elementy SINE mají také velký regulační potenciál, avšak ty se nacházejí spíše u promotorů než daleko od TSS, jak je tomu u LINE a ERV elementů. Navíc jsou narušeny od LINE a ERV elementů velice krátké a jejich přesná identifikace je tudíž komplikovaná, stejně jako práce s nimi. Pro potřebu naší studie jsme si tedy zvolili hojnější LINE a ERV elementy.

2.2.1.1 Endogenní retroviry

HERV (Human endogenous retrovirus), lidské endogenní viry, umožňují regulaci genové exprese díky jejich obsahu dlouhých terminálních repeticií (LTR). LTR sekvence totiž obsahují velké množství vazebných míst pro transkripční faktory (TFBS – transcription factor binding sites) a jsou náchylné k epigenetickým modifikacím (*Obrázek 7*) (Thompson *et al.*, 2016). HERV elementy poskytují v genomu lokusy pro metylaci CpG míst a histonovou metylaci a acetylaci. Histonová metylace je jedna z nejvíce studovaných aspektů genové regulace HERV elementů a je zejména zprostředkována zinc-finger proteiny s asociovanou KRAB doménou (Krüppel associated box zinc finger proteins – KZFPs) (Hurst & Magiorkinis, 2017).



Obrázek 7: Upraveno dle Buttler & Chuong (2021). Ukazuje proces integrace retrovirů do lidské DNA a jejich regulační potenciál. A – Retrovirů jsou integrovány při infekci a stanou se endogenními retrovirů, když jsou integrovány do gamet a přeneseny na další generaci. B – Endogenní retrovirů se „rozmnžují“ a rozšřřují po genomu pomocí stovek či tisíců transpozičních událostí. C – ERV často ztratí svoji schopnost transpozice z důvodu akumulace mutací nebo rekombinace jejich LTR. D – Příklady epigenetické modifikace ERV a jejich funkcí. Většina je epigeneticky utlumená metylací. Některé mají aktivní promotorovou (stávají se TSS) nebo (zejména) enhancerovou funkci, v rámci, které na sebe vážou transkripční faktory. Jiné zase zastupují insulátorovou funkci spojenou s vázáním CTCF (CCCTC-vázající faktor), který má schopnost tlumit transkripci genů.

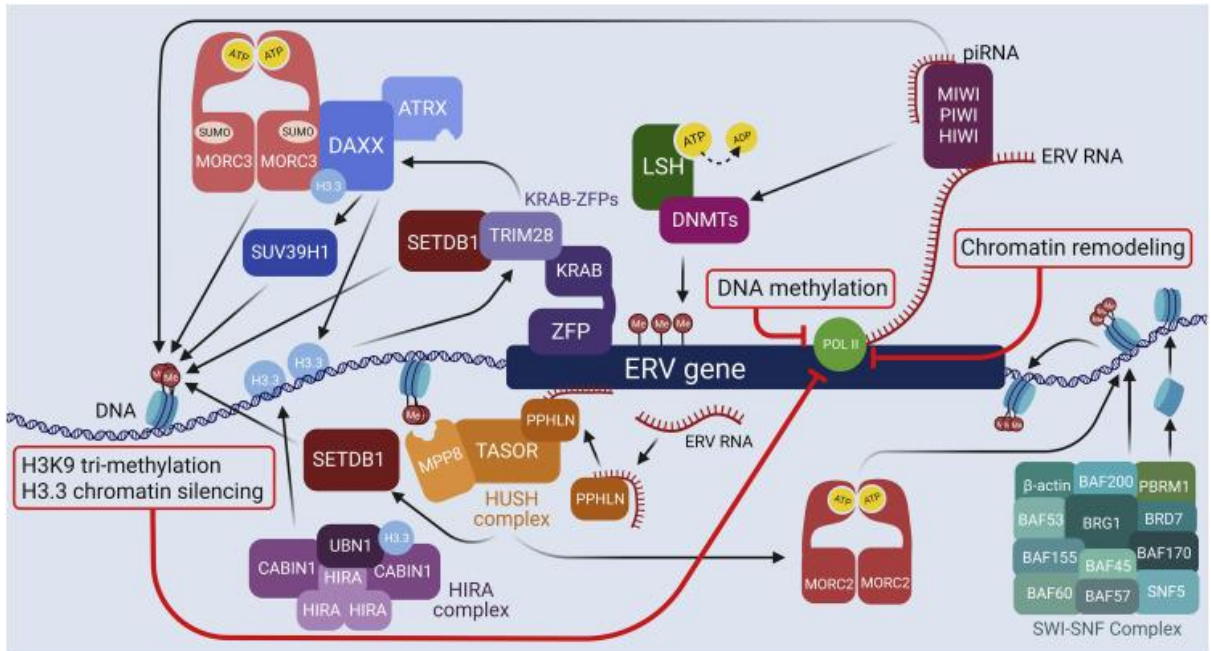
2.2.1.2 LINE elementy

Z hlediska regulace genové exprese, jsou dvě rodiny LINE elementů obecně asociovány s touto schopností, a to L1 a L2. Přestože jejich regulační schopnosti zůstaly dlouhou dobu relativně neprostudovány, nedávné studie přinesly jejich zvýšené pochopení. Specificky studie od Roller *et al.* (2019) ukázala silnou asociaci elementů L1 a zejména L2 v regulaci genové exprese, přičemž L2 elementy mohou také fungovat, jako specifické silencers v T-lymfocytech (Donnelly *et al.*, 1999). Cao *et al.* (2019), přímo identifikoval určité L2 elementy s enhancerovou funkcí. Jejich schopnost regulace spočívá zejména v histonové metylaci.

Jak již bylo zmíněno, tyto sekvence DNA dokáží regulovat genovou expresi díky rozmanitým vazebným místům pro určité regulační molekuly, jako jsou methylové (-CH₃) či acetylové (-OCH₃C) funkční skupiny. Adice těchto regulačních molekul je mediována různými proteiny se specifickými mechanismy, z nichž hlavní jsou vysvětlené v další kapitole.

2.2.2 Mechanismy epigenetických modifikací retroelementů

Epigenetických mechanismů, které regulují expresi mobilních elementů a v důsledku také genovou expresi blízkých DNA sekvencí, je velké množství. Na obrázku 8 jsou zobrazeny známé mechanismy regulace ERV elementů.



Obrázek 8: Převzato od Dopkins *et al.* (2022). Ukazuje známé epigenetické modifikace ERV elementů regulujících jejich expresi. Mezi tyto modifikace patří: H3K9 tri-metylace, H3.3 inzerce (Histon 3.3 - varianta histonu, jehož inzerce má za následek kompakci chromatinu), DNA metylace, and chromatinové remodelování pro inhibici aktivity RNA Pol II.

Nejznámější mechanismus regulace ERV jsou již dříve zmíněné KRAB Zinc-finger proteiny. Zinkové prsty (Zinc-finger domains – ZFDs) jsou strukturální doména zinc-finger proteinů (ZFP). Jedná se o sekvenci asi 30 aminokyselin, s charakteristickými cysteinovými a histidinovými zbytky, které stabilizují kvartérní strukturu proteinu interakcí se zinečnatým kationtem. ZFP pracují coby transkripční faktory ERV elementů, jejichž specificita záleží na sekvenci aminokyselin zinkového prstu. Společně s Krüppel-asociovaním boxem (KRAB) a Tripartite motif-containing 28 (TRIM28) a SET-domain-bifurkovanou histonovou lysin methyltransferázou 1 (SETDB1) jsou schopny vytvořit komplex, který je schopen selektivní metylace proximálních sekvencí DNA a tri-metylace blízkých H3K9 (devátý lysin třetího histonu) zbytků (Dopkins *et al.*, 2022).

Dalším velmi známým typem regulace je skrz typ ribonukleové kyseliny známé jako piwi-interagující RNA (pi-RNA – P-element-induced wimpy testis interacting RNAs). Tyto nekódující RNA molekuly využívají proteinů známých jako argonauti k regulaci exprese ERV elementů pomocí dvou způsobů. První způsob používá komplex PIWI-protein-piRNA k provedení tri-metylace H3K9 zbytků. Druhý způsob používá komplex k rozštěpení komplementární mRNA kódující daný ERV (Dopkins *et al.*, 2022).

Jak je zřejmé z obrázku 8, existuje mnoho dalších důležitých mechanismů pro regulaci exprese ERV, coby například MORC proteiny nebo SWI-SNF komplex. Z tohoto důvodu, jsme se rozhodli prozkoumat v naší studii pouze nejznámější z mechanismů regulace, a to KRAB Zinc-finger proteiny. Epigenetická regulace elementů LINE je založena zejména na jejich rozsáhlém obsahu vazebných míst pro DNA (cytosine-5)-methyltransferázu 3A (DNMT3A) a 3B (DNMT3B), díky čemuž jsou schopni regulovat expresi genů (Jin *et al.*, 2011). Většina molekul zmíněných na obrázku 8, zejména KRAB Zinc-finger proteiny, také targetují LINE elementy a zprostředkovávají jejich epigenetické modifikace.

2.2.3 Regulace imunity prostřednictvím retrotranspozonů

Právě díky regulačním schopnostem mobilních elementů (kapitola 2.2.1), byla velká část z nich asociována zejména v regulaci exprese genů důležitých pro fungování imunitního systému. Nyní, díky rozvoji sekvenčních technik epigenomu, zejména EWAS, momentálně víme, že ERV tvoří 15-30 % všech enhancerů v imunitních buňkách. Velké množství ERV elementů (asi 15 %), je zdrojem vazebných míst pro interferon-asociované transkripční faktory STAT1 a IRF1 v makrofázích. Rodina ERV, MER41, byla asociována s interferonovou aktivitou, která u jejího jednoho lokusu byla prokázána i experimentálně.² Dysregulace ERV elementů může tudíž rezultovat v dysregulaci imunitního systému. Transkripční dysregulace genů spojených s imunitou představuje hlavní faktor autoimunitních onemocnění a role ERV v nich může být signifikantní (Buttler & Chuong, 2021; Chuong *et al.*, 2016).

LINE elementy jsou také díky svým regulačním schopnostem asociovány v modulaci imunitního systému (zejména rodiny LINE-1 a LINE-2). Specificky LINE-1, jakožto RNA-produkt je schopen imunitní aktivace (Zhang *et al.*, 2020). Ale z hlediska dysregulace imunitního systému jsou ERV elementy prostudované více do hloubky.

2.2.4 Vztah mezi PAS a retroelementy

Jak je vidno ze všech výše popsaných faktorů, mobilních elementy (LINE a ERV) by mohly z hlediska regulace imunity a genové exprese hrát v patogenezi PAS signifikantní roli, což je potvrzeno nedávnými studiemi. První studie provedená na potenciální roli mobilních elementů v PAS v roce 2013 (kromě studie v roce 2012, která se zabývala přímo roli HERV v ASD) od Williams *et al.*, zjistila, že transpozony se nacházejí ve větším počtu poblíž genů implikovaných v patogenezi PAS. Od té doby, byly provedeny studie zabývající se přímo expresí mobilních elementů (Obrázek 9), ale žádná z nich se nezabývala přímo diferenciální expresí genů v jejich blízkosti (Misiak *et al.*, 2020), ale díky jejich obsahu hojných CpG míst a vazebných míst pro transkripční faktory, existuje vysoká pravděpodobnost, že by mohly do dysregulace určitých genů být potenciálně zapojeny.

² Exprese genu AIM2 je stimulována interferonovou aktivitou. Tento specifický gen má element MER41 asi 200bp nad jeho promotorem. Za pomoci CRISPR-Cas9 byla syntetizována DNA s delecí MER41 elementu a vložena do buněčné kultury. Exprese genu byla následně porovnána s expresí v buněčné kultuře s neupravenou DNA. Stimulace kultury interferony v upravené buněčné kultuře, neukázala žádnou indukci exprese genu.

Diagnosis	Study	N	Methods	Main findings
ASD	Balestrieri et al., 2012	28 ASD children 28 HCs	Expression of HERV sequences (E, H, K, and W) in PBMCs – RT-PCR	The percentage of HERV-H and HERV-W positive samples was significantly higher in ASD patients compared to HCs. HERV-H was more abundantly expressed and HERV-W had lower abundance in ASD patients than in HCs. PBMCs from ASD patients had an increased potential to up-regulate the HERV-H expression upon stimulation.
	Balestrieri et al., 2016	30 ASD children 30 HCs	Expression of HERV sequences (H, K, and W) in PBMCs – RT-PCR	There were significantly higher expression levels of HERV-H in PBMCs from ASD children compared to HCs. In turn, expression levels of HERV-K and HERV-W were significantly higher in PBMCs from healthy controls compared to ASD children.
	Saeliiv et al., 2018	36 ASD patients 20 HCs Publicly available datasets of DNA expression profiling (465 ASD patients and 276 HCs)	Methylation (COBRA) and expression of Alu sequences (RT-PCR) in lymphoblastoid cell lines	A total of 320 Alu-inserted genes were differentially expressed. These genes are known to be associated with neurodevelopmental and neurological disorders. Pathway analysis revealed that these genes are involved in inflammation, estrogen receptor and androgen signaling.
	Shpyleva et al., 2018	13 ASD patients 13 HCs	LINE-1 methylation (the 5-methylcytosine MeDIP assay) and expression (RT-PCR) as well as H3K9me3 (ChIP) in post-mortem brain	LINE-1 expression was significantly higher in the cerebellum but not in the BA9, BA22, and BA24 brain regions from ASD patients. The binding of repressive MeCP2 protein and histone H3K9me3 to LINE-1 was significantly lower in the cerebellum of ASD patients. Higher LINE-1 expression was associated with elevated levels of oxidative stress. Overall, no significant differences in methylation levels between ASD patients and HCs were found. However, significantly altered Alu methylation patterns were observed in ASD cases sub-grouped based on clinical manifestation compared with HCs.

Obrázek 9: Převzatý od Misiak *et al.* (2020). Ukazuje různé studie propojující roli mobilních elementů ve spojení s patogenezi PAS a jejich výsledky.

3 CÍLE PRÁCE

Přestože studie zkoumající metylaci transpozonů jsou čím dál tím četnější (Saeliw *et al.*, 2018; Misiak *et al.*, 2019), regulační potenciál transpozonů u pacientů s PAS zůstává neprozkoumán. Ze všech výše zmíněných faktorů jsme se rozhodli strukturovat studii, která by zohlednila genovou expresi na úrovni celého transkriptomu a zaměřila se na efekt mobilních elementů a jejich regulačních molekul v potenciální dysregulaci exprese genů u pacientů s PAS za pomoci volně dostupných bulk RNA-seq. dat.

Naše studie se tedy zaměřila na 3 hlavní cíle:

1. Odhalit možnou homogenitu mezi diferenciálně exprimovanými geny u pacientů s PAS
2. Odhalit rodiny retrotranspozonů potenciálně implikované v dysregulaci genové exprese a kvantifikovat pravděpodobnost jejich implikace na základě jejich vzdálenosti od promotoru, jelikož dle Pulver *et al.* (2023) expresi genů ovlivňují Mobilní elementy s cis-regulační funkcí umístěné až do přibližně 500 kb od promoterů.
3. Prozkoumat potenciální dysfunkci KRAB Zinc-finger proteinů u pacientů s PAS

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Data

K naší studii jsme použili veřejně dostupná bulk RNA sekvenační data (Irimia *et al.*, 2015). Původní autoři provedli RiboZero Gold (rRNA depletovali) 50bp PE RNA-sekvenování v sadě vzorků případů a kontrol (n = 24 každý) pro profilování transkriptomu. RNA-sekvenování bylo provedeno ze vzorků tkáně sulcus temporalis superior. Stejně jako v jejich studii jsme použili podmnožinu 12 vzorků PAS s signálem, který byl nejbližší mediánu všech kontrol.

4.2 Analýza diferenciální genové exprese

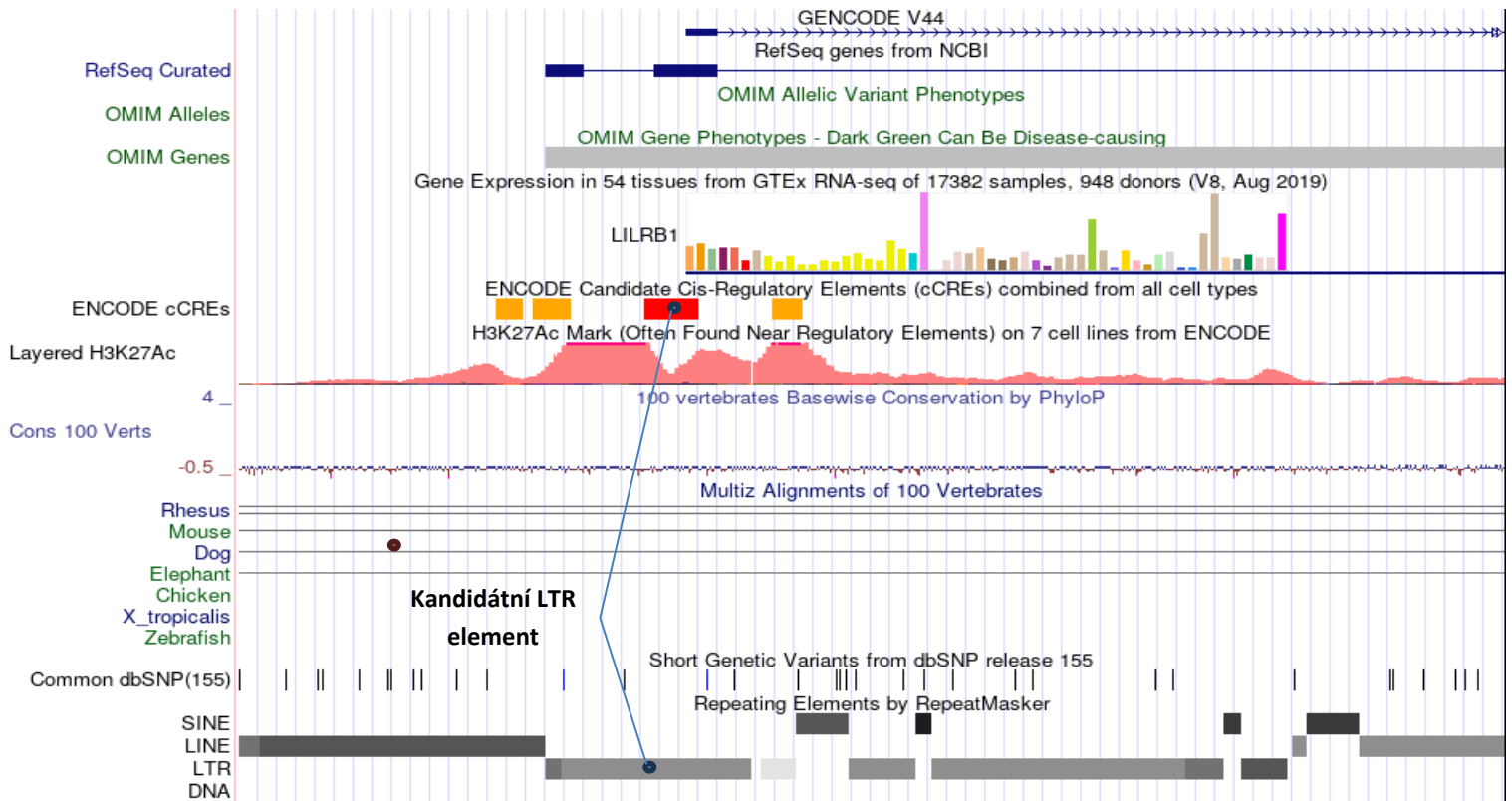
Analýza diferenciální genové exprese (DEA – differential expression analysis) je statistický test používaný k analýze významnosti pozorovaného rozdílu v počtech čtení v kvantitativních testech pomocí sekvenování DNA fragmentů s vysokým průtokem. Je modelována pomocí negativního binomického (NB – negative binomial) rozdělení, které má dva parametry: průměr a rozptyl, které jsou vázány regresí. Tyto dva parametry jsou v praxi odhadovány z dat, kde průměr je očekávanou hodnotou pozorovaných počtů pro gen ve vzorku a rozptyl je součtem shot noise termínu, který zahrnuje minimální očekávanou odchylku, a termínu surového rozptylu (raw variance term), který zahrnuje inherentní variabilitu genové exprese před zpracováním dat (Anders a Huber, 2010; Costa-silva *et al.*, 2017).

Výstupem analýzy je úroveň významnosti reprezentovaná p-hodnotou a celkový rozdíl počtů čtení reprezentovaný log2foldchange. Ve naší studii jsme analyzovali data pomocí balíčku DESeq2 obsaženého v statistickém programu R (R: The R Project for Statistical Computing, n.d.; DESeq2, n.d.), který nám pomohl identifikovat dataset genů použitý pro další analýzy. Výsledky DEA byly poté porovnány s databází SFARI (SFARI Gene, n.d.) obsahující geny implikované v PAS.

4.3 Genome browser analýza

Od svého založení v roce 2001 (Kent *et al.*, 2002) se UCSC Genome Browser stal nezbytným nástrojem pro interpretaci a analýzu sestav genomu. Tento vizualizační nástroj obsahuje velké množství funkcí používaných pro anotaci genomu a zároveň je schopen jasně reprezentovat genomická, epigenomická a transkriptomická data vedle sebe. Jednou z těchto funkcí je registr ENCODE kandidátních cis-regulačních elementů (cCREs), který byl přidán do lidského genomu hg38 v roce 2020 (Gonzales *et al.*, 2021). Tento registr vychází z fáze III projektu Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), který, jak autoři uvádějí: „poskytuje rozsáhlý zdroj pro vědeckou komunitu pro lepší pochopení organizace a funkce myšího a lidského genomů” (s. 699). cCREs tvoří podmnožinu míst DNase hypersenzitivních v genomu. Celkem bylo v sestavě lidského genomu hg38 identifikováno 926 635 cCREs (Kundaje *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2020).

V naší analýze jsme kombinovali registr ENCODE s anotací hg38 RepeatMasker (RepeatMasker, n.d.), která pochází z RepeatMasker, který prohledává sekvence DNA pro rozptýlené opakování a sekvence DNA s nízkou složitostí, jako jsou ME. Použitím těchto dvou funkcí a registru ENCODE pro identifikaci ME, které by mohly zároveň být cCRE, v Genome Browseru jsme byli schopni identifikovat rodiny retrotranspozonů potenciálně odpovědné za modifikaci exprese genů v genech získaných z DEA.



Obrázek 10: Ukazuje příklad potenciálního LTR elementu, který by mohl být zodpovědný za dysregulaci genu LILRB1 (nachází se nad promotorem LILRB1).

4.4 Analýza obohacení mobilních elementů

Během této analýzy jsme zkoumali vzdálenost rodin ME, určeným za pomoci analýzy v genome browseru ke genům, které byly upregulovány a měly p-hodnotu nižší než 0,05, dle výsledků DEA. Porovnali jsme průměrné vzdálenosti ME od genů implikovaných v PAS a náhodné sady genů, které neukazovaly žádnou asociaci s patologií PAS v našich analýzách RNA-seq dat. Anotace mobilních elementů, tzn. jejich lokace v genomu byla stažena z databáze UCSC genome browseru (*RepeatMasker Genomic Datasets*). Tato analýza byla provedena za účelem získání kvantifikovatelné míry významnosti možné regulace genů prováděné transpozitelnými elementy. Data použitá v této analýze zahrnovala anotaci genů a mobilních elementů z NCBI. Analýza byla opět provedena v R, konkrétně pomocí balíčku GenomicRanges (GenomicRanges, n.d.). Statistická významnost vzdálenosti byla následně potvrzena t-testem.

4.5 WebGestalt pathway a gene ontology analýza

WebGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit), se od svého vydání v roce 2005 stal jedním z nejvíce používaných nástrojů pro analýzu genových sad (WebGestalt, n.d.). S rostoucím zájmem o genové sady spíše, než o jednotlivé geny představil WebGestalt jedinečný způsob, jak je analyzovat a poskytnout biologické poznatky (Liao *et al.*, 2019; Zhang *et al.* 2005). Nástroj sám poskytuje množství metod používaných pro různé analýzy. Pro účely naší studie jsme použili analýzu nadměrného zastoupení (Over Representation Analysis – ORA) a analýzu obohacení genové sady (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA). ORA porovnává vstupní seznam vybraných genů, který je významný pro studii (například s ohledem na p-hodnotu nebo log₂foldchange), s předem určeným seznamem genů spojených s určitou dráhou nebo biologickým procesem. V tomto procesu je každá dráha testována na nad-/pod-reprezentaci v seznamech genů aplikací testů založených na hypergeometrickém, chi-kvadrátovém nebo binomickém rozdělení (Khatri *et al.*, 2012).

Metoda ORA však čelí několika omezením. Jelikož je třeba vybrat práh pro podmnožinu genů, mohou být vynechány určité asociace genů, a všechny geny jsou považovány za rovnocenné, což může vést ke ztrátě informací (Wang *et al.*, 2017). Proto byla použita také metoda GSEA, která bere v úvahu profily exprese genomu a vypočítává skóre exprese, které odráží exprese určitých sad genů tak, aby se maximalizoval zisk informací (Subramanian *et al.*, 2005). Je důležité zmínit, že ani jedna z těchto metod nezohledňuje závislosti a interakce mezi geny na úrovni systému, což vede k čistě kvantitativnímu výsledku. V naší studii jsme se rozhodli prozkoumat databáze pathway a gene ontology, konkrétně Biological non-redundant pro analýzu gene ontology a KEGG pro analýzu pathway. V každé analýze jsme upřednostnili vizualizaci 20 nejvýznamnější obohacených drah a/nebo ontologií. Data, které jsme analyzovaly za pomoci ORA byly: geny, které měla ve své blízkosti určitý mobilní element, a signifikantní geny z naší analýzy DEA. GSEA analýza zkoumala všechny geny z DEA a porovnávala je na základě řazení, které bylo vytvořeno v excelu následovně: SIGN(log₂foldchange)*(-log(p-value)).

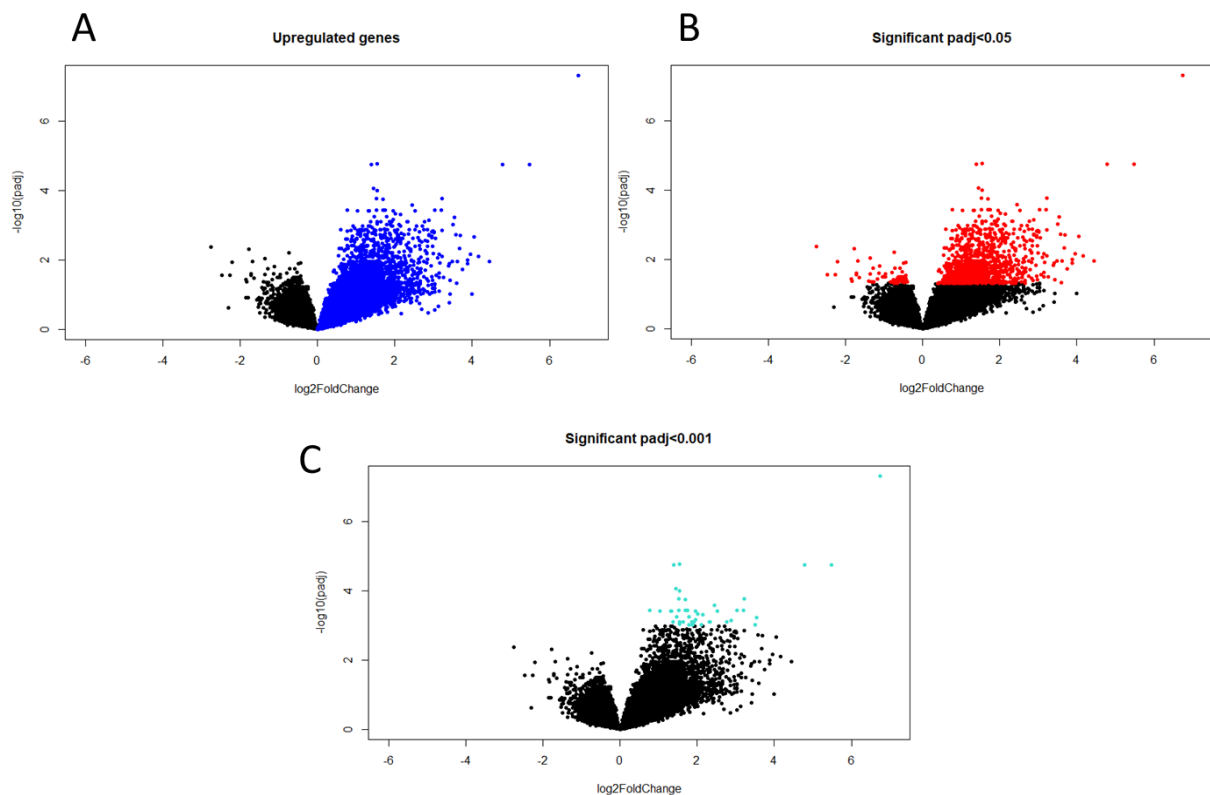
4.6 Analýza obohacení KRAB Zinc-Finger proteinů

Během této analýzy jsme stáhli seznam proteinů KRAB Zinc-Finger (KZFPs) z databáze Krabopedia (KRABopedia, n.d.) a porovnali je s datasetem signifikantně dysregulovaných genů získaných z DEA v Excelu, přičemž jsme se zaměřili zejména na downregulované geny s významnou upravenou p-hodnotou (p_{adj}). Tato analýza umožňuje identifikaci potenciálně dysfunkčních KZFPs, které vedou k dysregulaci určitých genů u pacientů s PAS. Tyto KZFPs byly následně za pomoci databáze Krabopedia spojeny s mobilními elementy, na které se váží.

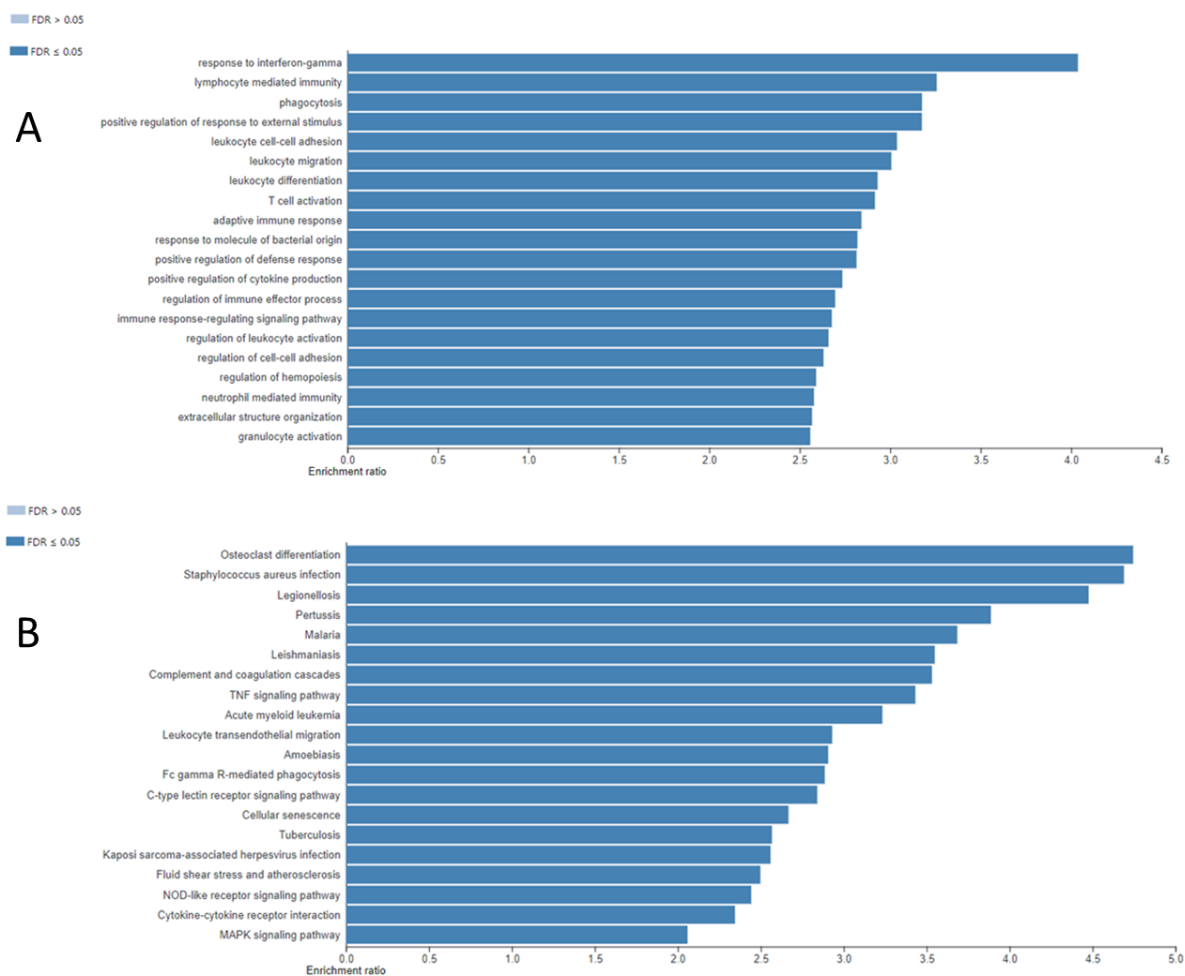
5 VÝSLEDKY

5.1 DEA

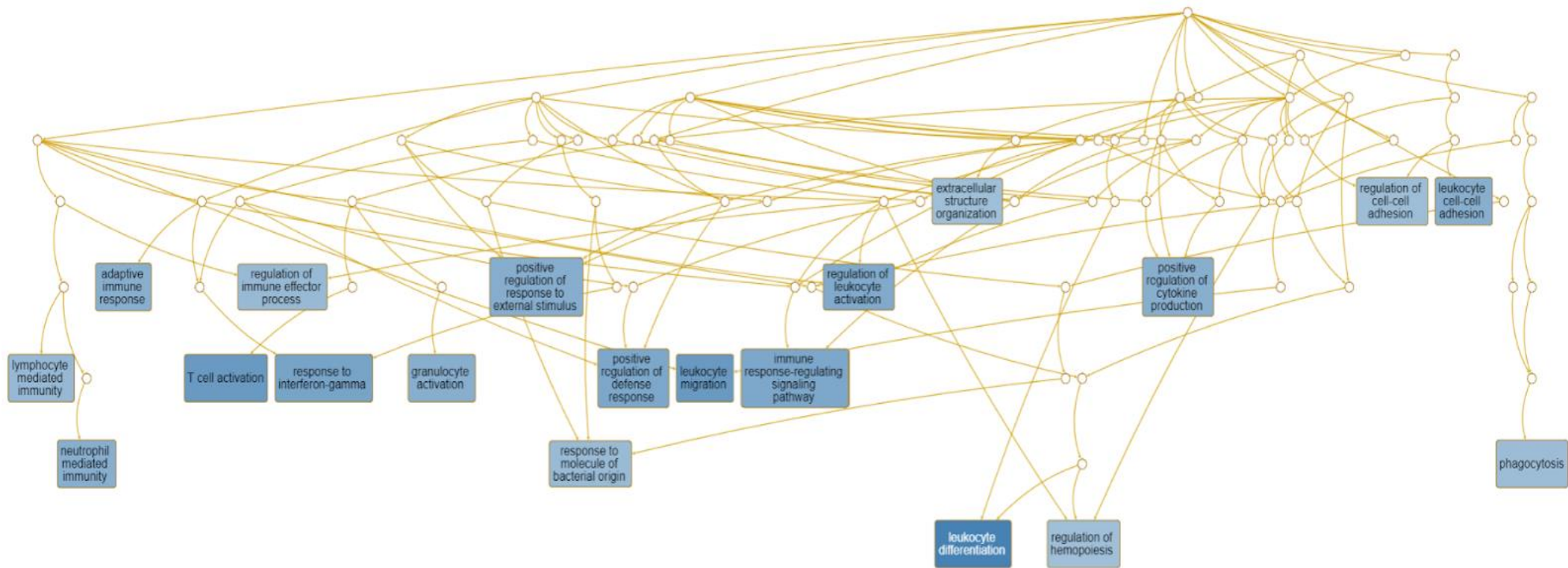
Prozkoumali jsme genovou expresi v sulcus temporalis superior u 12 případů PAS a 12 kontrol z veřejně dostupných dat bulk RNA sekvenování. Po provedení diferenciální analýzy exprese jsme našli 1216 diferenciálně exprimovaných genů (DEGs) s upravenou p-hodnotou $<0,05$, z nichž 1148 bylo upregulováno a 68 downregulováno (*Obrázek 11B*). Tato datová sada byla následně použita pro všechny další analýzy. Nejvýznamnější DEGs jsou ukázány níže (*Tabulka 3*: 20 nejvýznamnějších DEGs v dodatečných materiálech). Většina genů byla upregulována (*Obrázek 11A*) u pacientů s autismem, z nichž 5637 mělo $\log_2\text{foldchange} > 1$, přičemž všechny geny, které měly významnou upravenou p-hodnotu ($\text{padj} < 0,001$), byly upregulovány (*Obrázek 11C*). Při porovnání 1216 DEGs s databází genů autismu SFARI (SFARI Gene, n.d.), která obsahuje 1152 genů, bylo nalezeno 38 genů společných (*Tabulka 4*: 38 genů společných mezi SFARI databází a naší DEA analýzou).



Obrázek 11: A - Všechny upregulované geny jsou zobrazeny modře, B - Pouze významné geny s $\text{padj} < 0,05$ jsou zobrazeny červeně, C - Pouze významné geny s $\text{padj} < 0,01$ jsou zobrazeny zeleně. Výsledky pocházejí z diferenciální analýzy genové exprese dat bulk RNA-seq od pacientů s PAS a zdravých kontrol ($n = 12$, každá skupina). Na ose x se nachází $\log_2\text{foldchange}$ (změna exprese mezi autistickou skupinou a kontrolní skupinou) a na ose y upravená p-hodnota (padj).



Obrázek 12: Zobrazuje výsledky analýzy ORA pro výše zmíněných 1216 DEGs. A – Výsledky ORA Gene Ontology: zobrazují biologické procesy ve kterých jsou implikované významně dysregulované geny. B – Výsledky pathway: zobrazují biologické dráhy, ve kterých jsou implikované významně dysregulované geny z DEA. Tato figura byla vygenerována pomocí statistického nástroje WebGestalt (WebGestalt, n.d.). Na y-ose jsou názvy biologických procesů či drah a na x-ose je tzv. ratio of enrichment = (počet pozorovaných genů v dané kategorii)/(počet očekávaných genů v dané kategorii).



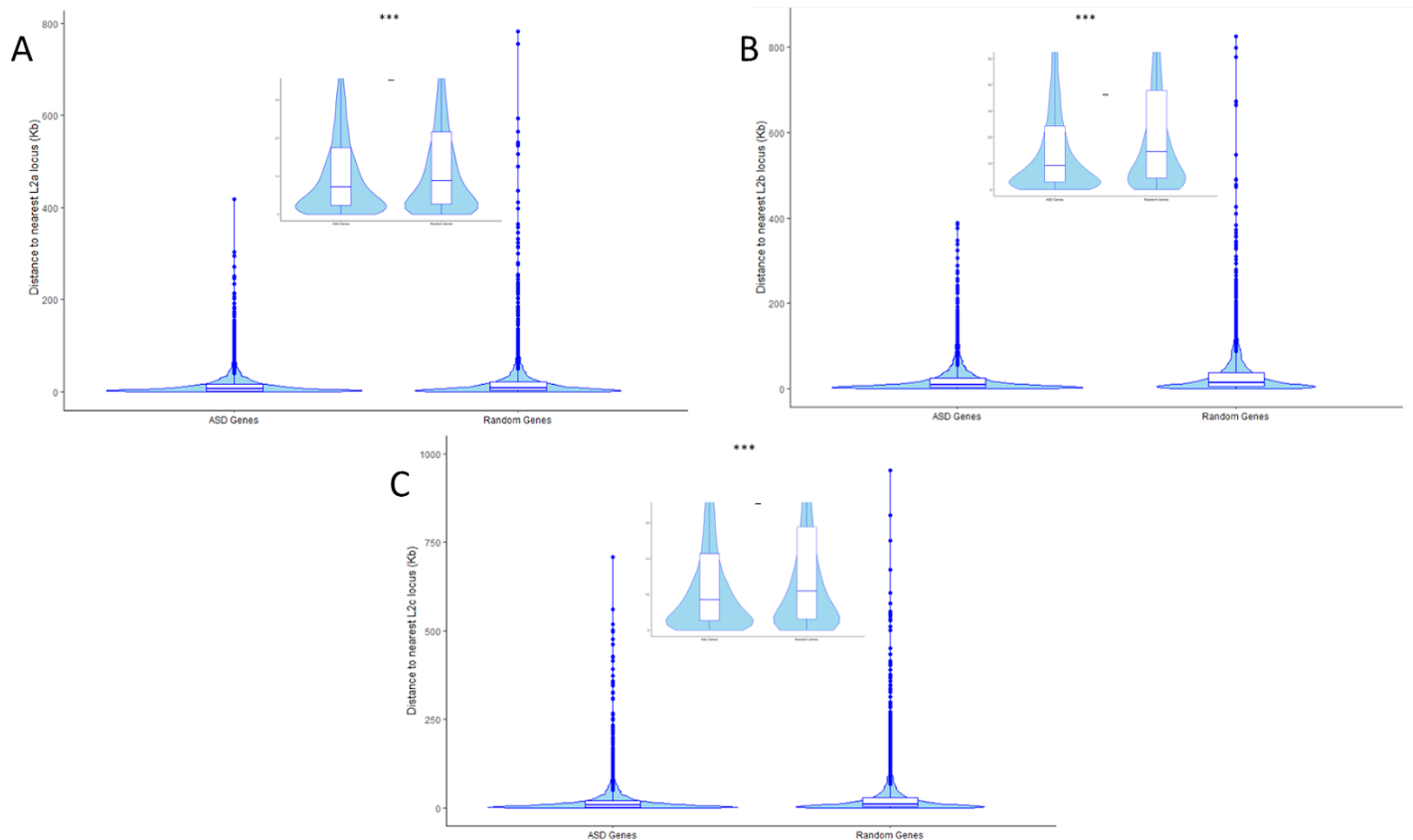
Obrázek 13: DAG (Directed acyclic graph) ukazující výsledky analýzy Gene Ontology. Tento graf ukazuje síť biologických funkcí, ve kterých jsou implikované významně dysregulované geny z DEA. Tato figura byla vygenerována pomocí statistického nástroje WebGestalt (WebGestalt, n.d.).

5.2 Genome browser a obohacení mobilních elementů

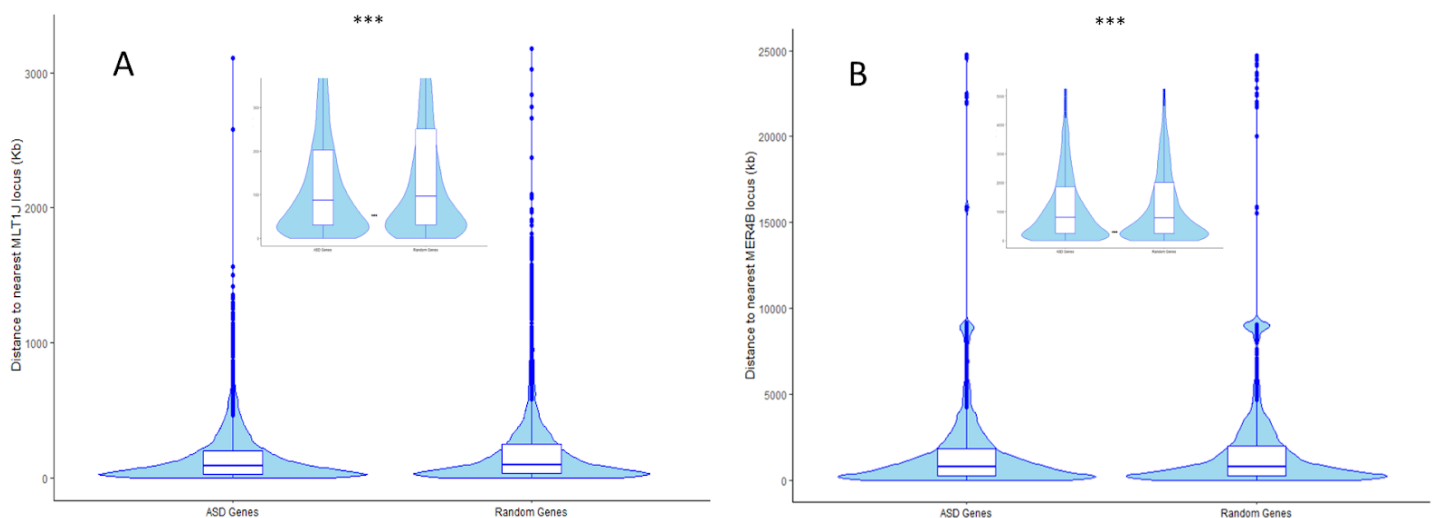
Analýza provedena za pomoci programu Genome browser prvních 226 genů seřazených podle p-hodnoty ($p < 0.05$) nám poskytla několik potenciálních kandidátů pro následnou analýzu obohacení ME: MLT1J, MER4B, MER41B, MER21C a MER21B, což jsou endogenní retroelementy (ERV) a L1PA15-16, L2a, L2b a L2c, což jsou dlouhé interspersované jaderné elementy (LINE). Pro analýzu obohacení ME jsme si vybrali geny, které byly upregulovány u pacientů s autismem a měly upravenou p-hodnotu < 0.5 , což vedlo k seznamu 5508 genů. Tato analýza, opět provedená v R, ukázala významné obohacení MLT1J, MER4B, L2a, L2b a L2c v blízkosti těchto statisticky významných genů, ve srovnání se stejně velkou sadou genů, které neukázaly žádnou korelaci s patologií PAS v datasetu, což by mohlo být interpretováno tak, že tyto mobilní elementy mají funkční vliv na expresi DEGs (Obrázek 14 A, B a C; Obrázek 15 A, B a C).

Poté jsme shromáždili geny, které jsou v rozmezí 10 kb a 125 kb (pro MLT1J a MER4B) určitého mobilního elementu. Tento rozsah jsme si vybrali na základě studie z roku 2023, která zkoumala vliv cis-regulačních elementů na geny na základě vzdálenosti a zjistila, že: expresi genů ovlivňují mobilní elementy s cis-regulační funkcí, pokud jsou umístěny do přibližně 500 kb od promotorů (Pulver *et al.*, 2023). Proto jsme si původně vybrali rozsah 125 kb, abychom byli jisti, že na gen je možný regulační efekt. Po provedení další analýzy jsme však zjistili, že elementy LINE jsou v blízkosti genů mnohem četnější, a proto jsme si vybrali rozsah 10 kb, abychom získali vyšší úroveň významnosti a dataset rovnoměrnější velikosti s datasetem ERV. Z 5508 genů celkem 3841 ukázalo alespoň jeden z výše uvedených transpozitelných elementů v jejich blízkosti. Na níže uvedených grafech (Obrázek 14 A, B a C; Obrázek 15 A, B a C) ukazujeme různé vzdálenosti výše uvedených elementů od statisticky významných genů a od genů, které byly vybrány ze seznamu genů, které byly shledány jako nevýznamné naší analýzou DEA týkající se patogeneze PAS.

Výše zmíněná analýza odhalila datasety genů s určitými retrotranspozony v jejich bezprostřední blízkosti. Tyto datasety byly následně prozkoumány za pomoci statistického programu WebGestalt, který odhalil jejich biologické funkce a implikace v rozmanitých drahách.



Obrázek 14: Vzdálenost od nalezených DEGs v porovnání se vzdáleností náhodných nesignifikantních genů k nejbližším elementům LINE: A – Porovnání vzdálenosti elementu L2a v kilobázích od 0-800 kb od genů implikovaných v PAS (signifikantní dle naší DEA) a náhodných genů (**vlevo**), které nebyly signifikantní dle naší DEA (**vpravo**). Graf uprostřed ukazuje rozdělení v prvních 10 kilobázích (kb). B – Vzdálenost elementu L2b v kilobázích od 0-800 kb mezi geny implikovaných v PAS (signifikantní dle naší DEA) a náhodnými geny, které nebyly signifikantní dle naší DEA, Graf uprostřed ukazuje rozdělení v prvních 10 kilobázích (kb). C – Vzdálenost elementu L2c v kilobázích od 0-1000 kb od genů implikovaných v PAS (signifikantní dle naší DEA) a náhodných genů, které nebyly signifikantní dle naší DEA. Graf uprostřed ukazuje rozdělení v prvních 10 kilobázích (kb).



Obrázek 15: Vzdálenost od nalezených DEGs v porovnání se vzdáleností náhodných nesignifikantních genů k nejbližším elementům ERV: A – Vzdálenost MLT1J v kilobázích od 0-3000 s zvětšeným obrázkem uprostřed ukazujícím vzdálenost k 300 kb, B – Vzdálenost MER4B v kilobázích od 0-25000 se zvětšeným obrázkem ukazujícím vzdálenost k 5000 kb.

5.3 Analýza nadměrného zastoupení a obohacení sady genů

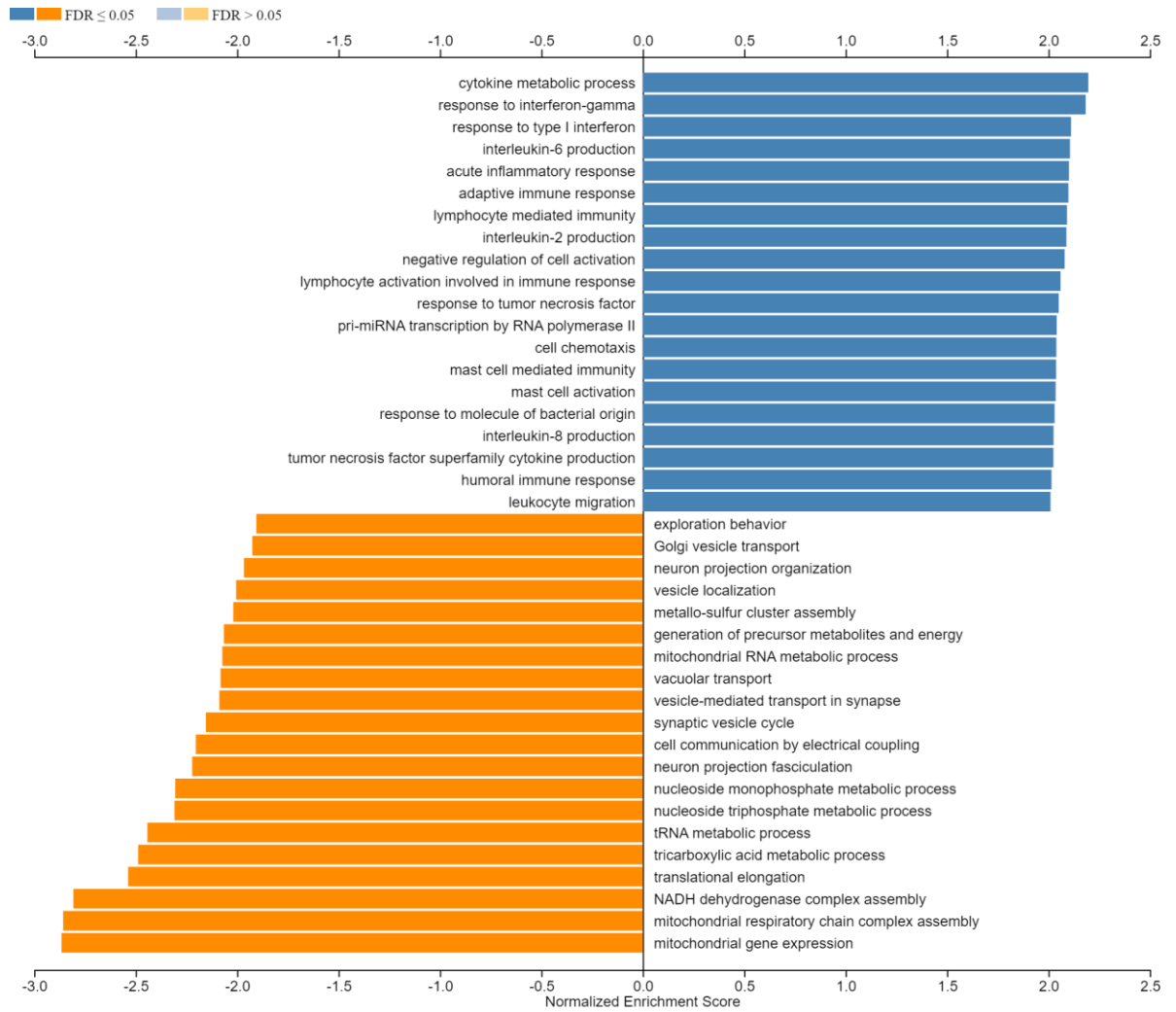
Abychom našli potenciální funkční homogenitu mezi skupinami nalezených DEGs, provedli jsme analýzu nadměrného zastoupení (ORA) a analýzu obohacení sady genů (GSEA) v statistickém programu WebGestalt, konkrétně za pomoci databází Biological NonRedundant pro Gene Ontology a KEGG pro Pathway. GSEA přinesla výsledky, které byly relativně podobné a byly podle jejich FDR (false discovery rate) významné (*Obrázek 12* a *Obrázek 13*).

5.3.1 Analýza diferenciálně exprimovaných genů z DEA za pomoci ORA

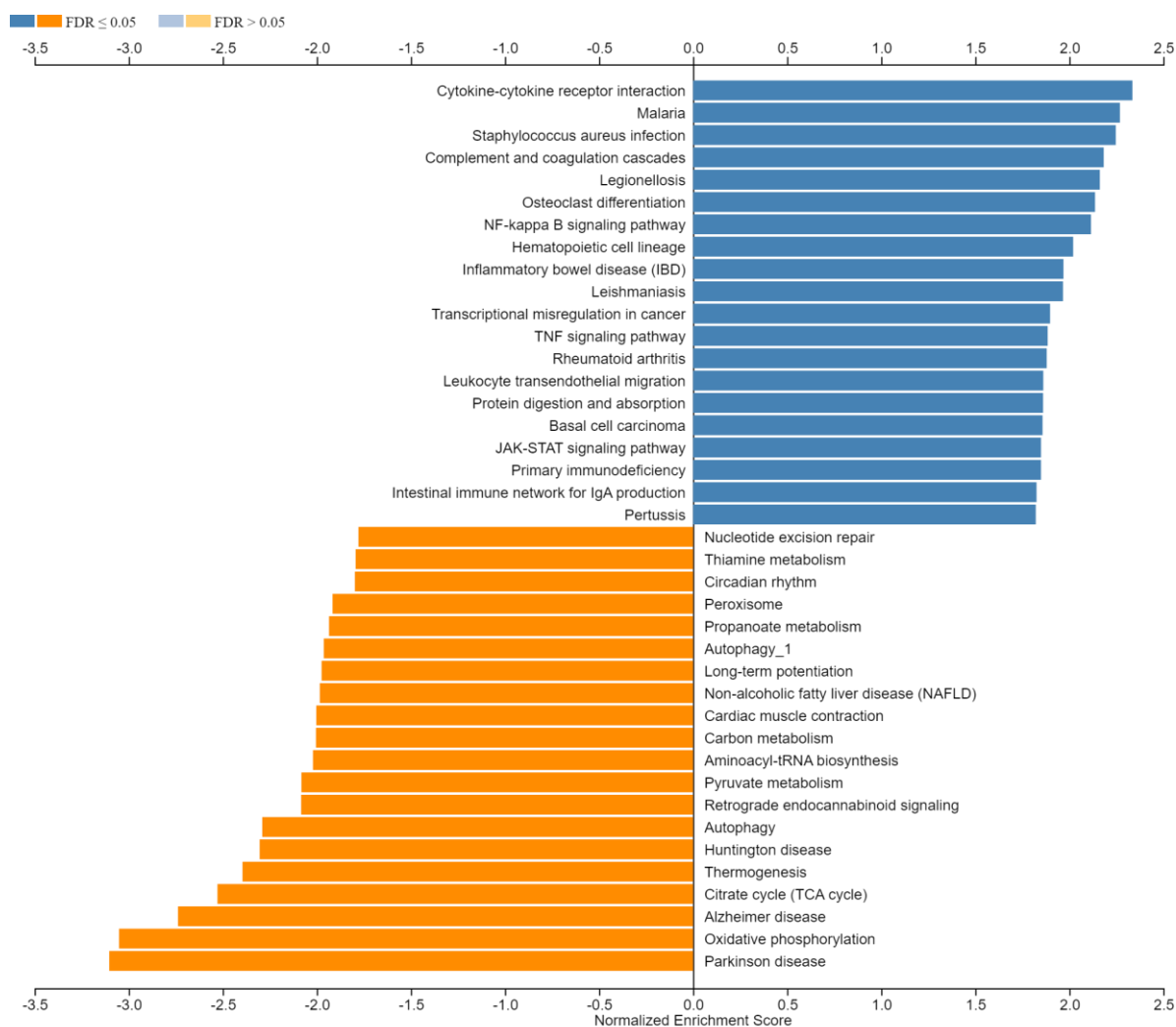
Prozkoumali jsme prvních 1216 genů ($p < 0.05$) z naší DEA. Analýza ORA ukázala velmi výrazný trend funkcí souvisejících s imunitou jak ve výsledcích Gene Ontology (GO), tak ve výsledcích pathway (*Obrázek 12* a *Obrázek 13*). Nejvýznamnější biologické procesy odhalené GO analýzou byly odpověď na interferon-gamma (p -hodnota = $2.2649e-14$) a imunita zprostředkovaná lymfocyty (p -hodnota = $3.0984e-11$). Výsledky pathway analýzy vykazaly nejsilnější asociaci s dráhou diferenciací osteoklastů (p -hodnota $3.337e-16$) a mnoha dalšími drahami spojenými s imunitou, jako je signální dráha TNF (p -hodnota $1.3121e-7$) nebo dráha interakce cytokinu s cytokinovým receptorem (p -hodnota $1.4343e-7$). Na obrázcích 12 a 13 je zobrazena rozsáhlejší síť nalezených obohacených drah a ontologií, z nichž většina souvisí s imunitou. Tabulky s kompletními výsledky analýzy jsou v dodatečných materiálech (*Tabulka 5* a *Tabulka 6*).

5.3.2 Analýza diferenciálně exprimovaných genů z DEA za pomoci GSEA

GSEA analýza nám pomohla potvrdit signifikanci nalezených drah a biologických funkcí nalezených skrz analýzu ORA. GSEA potvrdila signifikanci drah: diferenciací osteoklastů (p -hodnota $2.2e-16$), signální dráhy TNF (p -hodnota $2.2e-16$) a dráhy interakce cytokinů (p -hodnota $2.2e-16$). Přidala navíc jiné dráhy spojené s imunitou, jako NF-kappa B signální dráhu (p -hodnota $2.2e-16$). Z hlediska biologických procesů odhalené GO analýzou, nejvíce signifikantní byl metabolismus cytokinů (p -hodnota $2.2e-16$). GSEA znovu potvrdila signifikanci výše zmíněných drah, jako právě odpověď na interferon-gamma a imunita zprostředkovaná lymfocyty (obě p -hodnota $2.2e-16$). Výsledky GSEA analýzy, tedy ještě více umocnily naši pozorovanou imunitní roli. Kompletní výsledky analýzy jsou v dodatečných materiálech (*Tabulka 7* a *Tabulka 8*). Na obrázcích 16 a 17 jsou výsledky vyobrazeny.



Obrázek 16: Zobrazuje výsledky GSEA analýzy pathway. V oranžové jsou downregulované signifikantní dráhy a v modré jsou upregulované signifikantní dráhy. Na ose x se nachází „normalized enrichment score“, které indikuje distribuci kategorií drah v našem seznamu genů. Čím je jeho absolutní hodnota vyšší, tím signifikantnější výsledek.



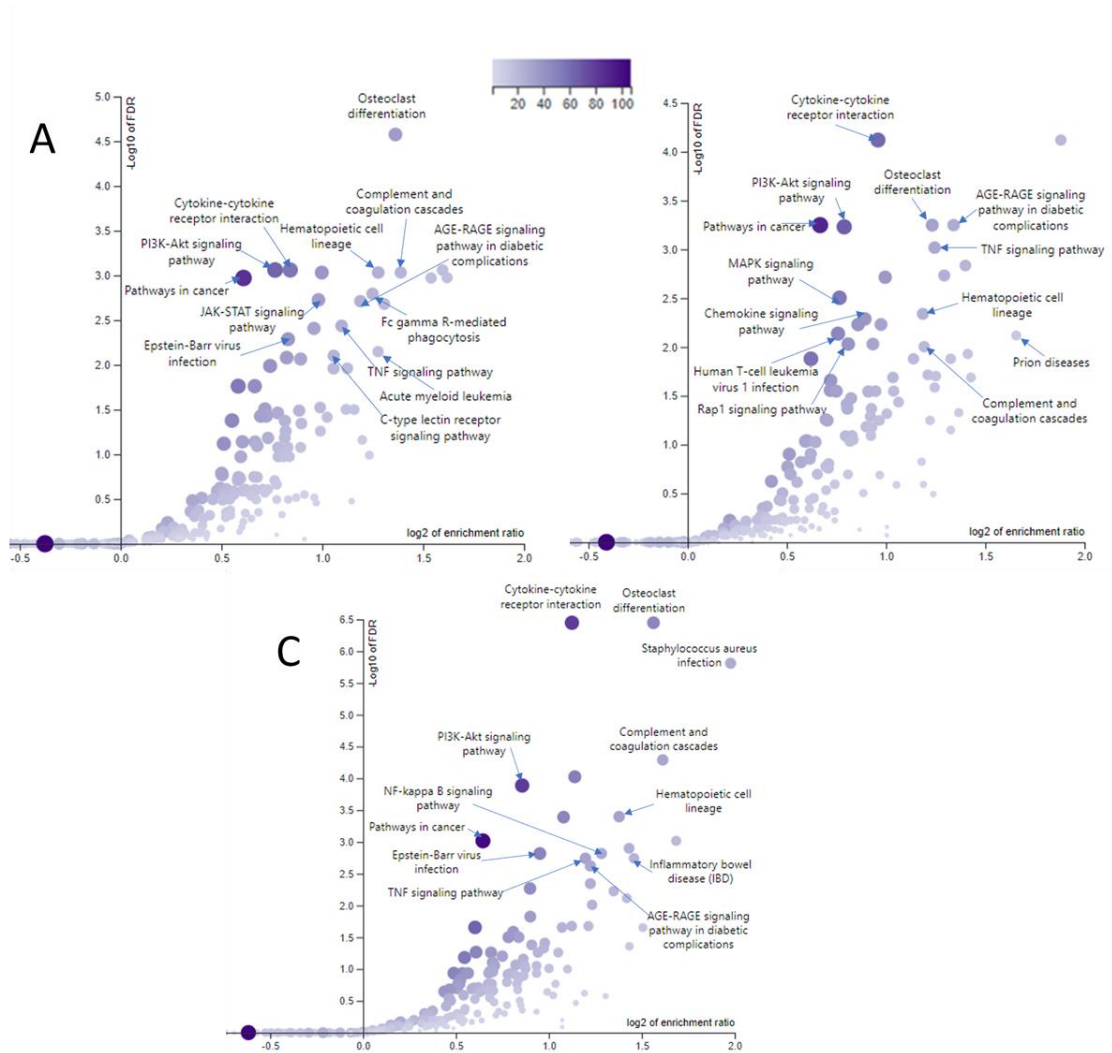
Obrázek 17: Zobrazuje výsledky GSEA analýzy Gene Ontology. V oranžové jsou downregulované signifikantní dráhy a v modré jsou upregulované signifikantní dráhy. Na ose x se nachází „normalized enrichment score“, které indikuje distribuci kategorií drah v našem seznamu genů. Čím je jeho absolutní hodnota vyšší, tím signifikantnější výsledek.

5.3.3 Analýza datových sad genů s určitými ME v jejich blízkosti

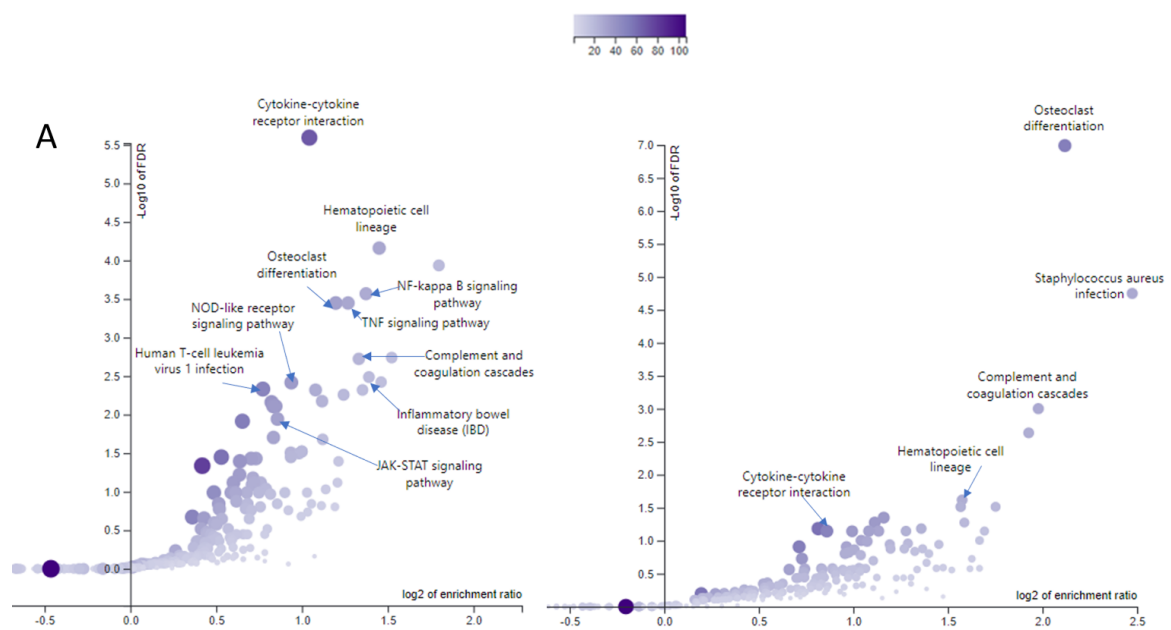
Při zkoumání datových sad získaných z naší analýzy obohacení ME, tzn. geny s elementy L2a, L2b a v L2c ve vzdálenosti maximálně 10 kb od promotoru a geny s elementy MER4B a MLT1J ve vzdálenosti maximálně 125 kb od promotoru, můžeme vidět velmi významný trend v imunitní obraně hostitele. Sady genů v blízkosti pro každou z výše uvedených rodin ME ukázaly silný trend imunitních funkcí v analýzách Gene Ontology a Pathway.

Biologický proces s nejsilnější asociací v analýze Gene Ontology téměř ve všech datových sadách byl metabolismus cytokinů, zatímco zbytek obohacených ontologií také vykazoval silný překryv mezi rodinami ME. Sada genů v blízkosti MER4B byla výjimkou, s aktivací leukocytů jakožto nejvýznamněji obohacenou ontologií, což se ale stále neodchyluje od inflamačních / imunitních funkcí. Sada spojená s MER4B také ukázala zajímavou a významnou asociaci s funkcí neuroinflamace, kterou žádná z ostatních datových sad neprokázala (Obrázek 18 a Obrázek 19). Z hlediska pathway analýzy, patřily mezi nejvýznamnější dráhy: dráha interakce cytokinu s cytokinovým receptorem, diferenciací osteoklastů a hematopoetické linie, všechny

opět silně spjaté s imunitou. Obrázky 18 a 19 ukazují rozšířenou síť imunitních drah, spojených s geny s retrotranspozony v jejich blízkosti.



Obrázek 18: A – Asociované dráhy genů s L2a ve vzdálenosti maximálně 10 kb; B – Asociované dráhy genů s L2b ve vzdálenosti maximálně 10 kb, C – Asociované dráhy genů s L2c ve vzdálenosti maximálně 10 kb. Tato figura byla sestavena pomocí statistického nástroje WebGestalt (WebGestalt, n.d.)



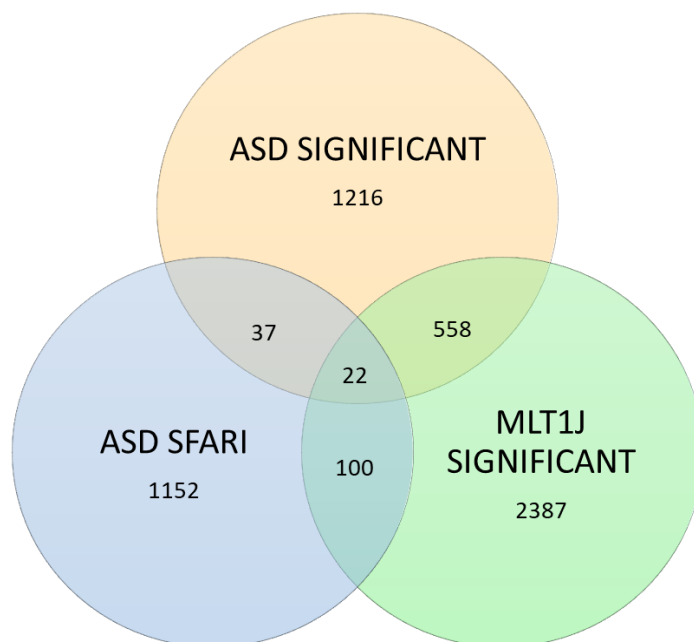
Obrázek 19: A – Asociované signifikantní dráhy genů s MLT1J do vzdálenosti 125 kb, B – Asociované signifikantní dráhy genů s MER4B do vzdálenosti 125 kb. Tato figura byla sestavena pomocí statistického nástroje WebGestalt (WebGestalt, n.d.).

Zaměřili jsme se hlouběji na MLT1J, rodinu ME, která nebyla dříve spojena s regulací imunitních genů hostitele, a dále jsme prozkoumali překryv mezi DEG v blízkosti MLT1J a geny spojenými s PAS uvedenými v databázi SFARI. 22 genů, které byly shledány jako významné v naší diferenciální analýze genové exprese mezi autistickou a neautistickou mozkovou tkání, byly přítomny v databázi SFARI a byly do vzdálenosti 125 kb od lokusu MLT1J (Obrázek 20 a Tabulka 2). Z těchto genů byla většina implikována v imunitních funkcích, které byly dříve spojeny s PAS. Naše výsledky tedy naznačují, že mobilní elementy, jako je MLT1J, mají potenciálně významnou roli v imunitní dysregulaci spojené s PAS.

Tabulka 2: Tabulka 22 genů, nalezených v průsečíku Vennova diagramu s jejich funkcemi.

Gen	Funkce
PLAUR	Buněčná signalizace
RAB43	Membranový transport
C4B	Imunitní odpověď
CAPN12	Rozklad proteinů
SPP2	Inhibiční aktivita
KCNJ15	Buněčný transport draslíku
PDCD1	Inhibice imunity

Gen	Funkce
KIF14	Buněčný cyklus
OXTR	Recepce oxytocinu
VDR	Recepce vitamínu D
ITGB3	Tvorba integrinových receptorů
THBS1	Angiogeneze/Regulace imunity
LILRB2	Imunitní odpověď
SLC25A39	Transport koenzymu A
CASZ1	Regulace exprese genů
DOCK8	Imunitní funkce
HTR3C	Recepce serotoninu
MSR1	Regulace zánětu
CCIN	Diferenciace spermií
PHF8	Demethylace histonů
ARHGEF10	Regulace GTPázy
RNF135	Ubikvitinace



Obrázek 20: Vennův diagram ukazuje různé datové sady genů nalezené během našich analýz nebo veřejně dostupné datové sady PAS; “ASD significant” z naší diferenciální analýzy exprese ($p < 0.05$); “ASD SFARI” z databáze genů ASD SFARI a “MLT1J significant” z naší analýzy obohacení ME (vzdálenost k genu < 125kb)

6 DISKUZE

Poruchy autistického spektra (PAS) je rozšířeným neurovývojovým postižením charakterizovaným repetitivním chováním a deficitem v sociální interakci. V současné době jsou terapeutická a diagnostická opatření pro PAS nedostatečná, kvůli nekompletnímu pochopení jejich biologických základů. Z tohoto důvodu jsme strukturovali tuto studii tak, abychom objasnili určité mechanismy spojené s PAS, s ohledem na transpozony (ME - mobilní elementy), které mohou být příčinou či následkem jejich působení. Od první studie na toto téma (Williams *et al.*, 2013) další výzkum zdůraznil potenciál účasti ME na patogenezi autismu prostřednictvím zvýšené genomické nestability. Nicméně jen málo studií zkoumalo potenciální regulační vliv ME na geny spojené s autismem a zároveň zohlednilo funkční důležitost těchto genů. S tímto cílem jsme provedli analýzu diferenciální exprese z dat RNA-seq u jedinců s a bez PAS (n = 12, každá skupina), přičemž jsme identifikovali 1216 signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (DEGs), z nichž 94,4 % bylo upregulováno. Následnou analýzou obohacení transpozonů jsme identifikovali zajímavé retrotranspozony na základě jejich významné blízkosti k genům spojeným s PAS - konkrétně MLT1J, MER4B, L2a, L2b a L2c - a potenciálním regulačním efektem na již zmíněné DEGs. Mezi těmito geny jsme pozorovali jasný funkční trend, z nichž většina byla přímo či nepřímo zapojena do imunitní reakce. Bylo již dobře prokázáno, že pacienti s PAS projevují známky zvýšené/chronické imunitní aktivity, avšak doposud nebyla navržena ani zkoumána účast regulačních aktivit ME na tomto fenotypu.

6.1 LILR rodina

Jedna rodina genů, která se pravidelně objevovala ve všech analýzách, byla rodina LILR (Leukocytární imunoglobulinový receptor), která představuje receptory zodpovědné za aktivaci a inhibici imunitního systému. Konkrétně mezi 1216 signifikantně diferenciatně exprimovanými geny (DEGs) byly upregulovány geny LILRB1/2/4 a LILRA2/6. Zvláště LILRB2 je zajímavý pro PAS, jelikož koliguje s TREM2, což inhibuje jeho signalizační vlastnosti (Zhao *et al.*, 2022). Vzhledem k tomu, že inhibovaná signalizace TREM2 je silně spojena s patogenezi PAS (Filipello *et al.*, 2018), můžeme očekávat, že role LILRB2 je zde významná. LILRB2 byl ukázán jako potenciálně ovládaný prvkem MER4B 48 kb nad transkripčním startovním místem genu (TSS – Transcription Start Site), přičemž v blízkosti byly také nalezeny L2 a MLT1J, což dále podporuje naši hypotézu o regulaci TE. Všechny tyto geny zastupují imunitní funkce, protože se převážně vážou na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC – major histocompatibility complex), které zprostředkovávají interakci imunitních buněk, přičemž některé z nich ovlivňují specificky nervovou funkci. Například LILRB1 byl dříve spojen s Alzheimerovou chorobou (Takeda & Nakamura, 2017). Jejich exprese je také potenciálně regulována lokusy z dříve zmíněných rodin ME, přičemž každý z genů má ve své blízkosti alespoň jeden lokus z výše uvedených rodin, což dále ukazuje možné zapojení transpozonů do upregulace těchto genů.

6.2 DOCK rodina

Další genová rodina, která ukázala významnou asociaci s PAS, byla rodina Deducator of Cytokinesis (DOCK), což jsou proteiny, které se silně podílejí na intracelulární imunitní signalizaci a na dalších obranných funkcích. Mezi 1216 DEGs byly významné geny DOCK zastoupeny DOCK2 a DOCK8, přičemž oba byly upregulovány. DOCK8 již byl spojen s ASD; jeho nedostatek způsobuje řadu imunitních poruch (Su, Jing & Zhang, 2011). DOCK2 je často spojován s neuroinflamací a funkcí mikroglíí (Shi, 2013). Opět bylo zjištěno, že všechny tyto geny se nachází v blízkosti určitých mobilních elementů: exprese DOCK2 je potenciálně kontrolován elementem MLT1J vzdáleným 2129 bp od TSS, s vloženými L2 elementy v blízkosti; DOCK8 elementem MLT1J vzdáleným 18 kb od TSS, s L2 elementy a MER4B elementem v blízkosti. Jelikož DOCK2 dosud nebyl s patogenezí ASD spojen, mohl by teoreticky být předmětem dalšího zkoumání.

Takto výrazná role imunity by mohla být překvapující, protože PAS jsou neinfekční poruchy, existuje však mnoho teorií a funkcí, které tuto souvislost vysvětlují. Jednou z nejrozšířenějších teorií je model aktivace mateřské imunity (MIA), který má stálou experimentální podporu z pokusů na hlodavcích (Brown *et al.*, 2004). Tento model naznačuje, že změny v neurovývoji potomstva jsou důsledkem mateřské imunitní reakce na určité onemocnění. Tuto teorii dále podporuje studie cytokinů, malých buněčných signálních proteinů působících jako imunomodulační a endokrinní signalizační molekuly, u kterých bylo prokázáno, že se podílejí na neurovývoji (Jones & Thomsen, 2013). Tyto prenatální imunitní změny pak mohou přetrvávat do postnatálního vývoje, přičemž postnatální dysregulace imunity u pacientů s PAS je dobře zdokumentována (Meltzer & Van De Water, 2016). Tato fakta dokonce vedla vědce k názoru, že PAS by mělo být klasifikováno jako autoimunitní onemocnění (Ashwood *et al.*, 2011), přičemž důkazy silně naznačují, že zánět a dysregulace imunitního signálu mohou významně ovlivnit neuropsychiatrické chování (Haroon *et al.*, 2011). Role zánětu a dysregulace imunity pravděpodobně tvoří velmi silnou část patogeneze PAS, což bylo potvrzeno i našimi výsledky.

6.3 Webgestalt analýza

Provedli jsme analýzu ORA (Over expression analysis) a GSEA (Gene set enrichment analysis) v statistickém programu WebGestalt pomocí databází pathway a gene ontology. Pro tyto analýzy jsme využili sady genů získané naší DEA, stejně jako naší analýzou obohacení mobilních elementů. Jasný trend pozorovaný v průběhu všech analýz byla dysregulace různých procesů souvisejících s imunitní funkcí, což dále podporuje významnou roli imunitního systému v PAS. Výsledky poukazyvaly na různé dráhy, konkrétně dráha interakce cytokinů s cytokinovými receptory nebo dráha hematopoetické linie, které byly přítomny v průběhu všech analýz datových sad genů s určitými mobilními elementy v jejich blízkosti. Jelikož hematopoetické buňky jsou multipotentní prekurzory schopné se vyvíjet do všech typů krvinek a cytokiny tvoří signální sítě odpovědné za řízení imunitní odpovědi, což opět posiluje zapojení mobilních elementů do regulačních aktivit přispívajících k dysregulaci imunitní aktivity u pacientů s PAS.

Z dysregulovaných drah analyzovaných ve statistickém programu WebGestalt byla jedna, která byla obzvláště významná v souvislosti s naší analýzou obohacení ME, a to signální dráha TNF (Tumor Necrosis Factor). TNF (také známý jako TNF- α) je cytokin regulující akutní imunitní odpověď. Mnoho studií dříve ukázalo zvýšené hladiny TNF a dalších zánětlivých cytokinů u pacientů s PAS (Li *et al.*, 2009), což bylo v souladu s výsledky naší analýzy DEA, jelikož právě TNF-alfa byl upregulován (padj = 0,125 a p-hodnota = 0,0133). Geny zapojené do dráhy byly konkrétně: CCL2, CCL20, CEBPB, CREB3L3, CSF1, CXCL2, CXCL3, FOS, ICAM1 a IL6. Všechny tyto geny měly alespoň jeden lokus z výše uvedených rodin mobilních elementů v těsné blízkosti (tj. v rámci vzdálenosti umožňující regulační dopad genu ME). TNF-alfa konkrétně měl element MLT1J vzdálený 1059 bázových párů od TSS a elementy L2a, L2b a L2c v těsné blízkosti (nejvzdálenější byl L2b s vzdáleností 2400 bázových párů).

Další dysregulovanou dráhou možné spojenou s vlivem ME byla dráha diferenciac osteoklastů, která byla již dříve spojena s pacienty s PAS (Neueymer *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2020). Osteoklasty jsou buňky, které degradují kostní tkáň, pro iniciaci normální remodelaci kostí a umožňují ztrátu kostí v patologických podmínkách zvýšením své resorpční aktivity (Boyce *et al.*, 2009). Věří se, že jsou akutními / vrozenými regulátory imunity uvnitř kostí (Boyce, 2013). Opět všechny geny měly alespoň jeden z prozkoumaných ME v jejich blízkosti. Mezi těmito geny můžeme najít gen CSF1 (Colony stimulating factor 1), který byl dříve spojen s PAS kvůli svým regulačním schopnostem na mikroglíích (Kana *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2023). Tento gen by mohl být regulován elementem MER4B vzdáleným 35 kb od TSS, stejně jako elementem L2c, vzdáleným 759 bázových párů. Jeho receptor, CSF1R, byl také upregulován (padj = 0,125, p-hodnota = 0,0133) s elementem MER4B vzdáleným 93 kb, L2b 1244 bázových párů a L2c 6155 bázových párů. Tato silná asociace specifických drah implikovaných v PAS se studovanými ME proto podněcuje další výzkum tohoto tématu na molekulární úrovni.

Imunitní dráha, která byla pravděpodobně statisticky nejvýznamnější v našich analýzách, i z hlediska patogeneze PAS, byla dráha interakce cytokinů s cytokinovými receptory. Cytokiny tvoří rozmanitou sadu signálních molekul odpovědných za řízení imunitní odpovědi. Dysregulace cytokinů byla dříve již spojena s PAS (Goines & Ashwood, 2012) a neuropoetické cytokiny (IL6, IL-B, IFN- γ atd.) se podílejí na neurovývoji a neuronální funkci, kromě toho, že jsou neuro-imunitními mediátory. Zajímavé je, že podle našich výsledků DEA byla exprese interferonu gamma (IFN- γ) relativně nezměněna, na rozdíl od jiných studií (Li *et al.*, 2009). Naopak, interleukin 6 (IL6) byl dle očekávání významně upregulován. Interleukin 6 má také v blízkosti několik prozkoumaných elementů: MLT1J (68 kb od TSS), MER4B (18 kb), L2a (6 kb), L2b (4 kb) a L2c (8 kb). Jelikož bylo prokázáno, že elementy L2 mohou fungovat jako specifické silencers v T-buňkách (Donnelly *et al.*, 1999), lze očekávat, že jejich dysfunkce by měla za následek upregulaci daného genu, jak vidíme u všech výše uvedených drah. Elementy MER4 byly dříve spojeny s regulací imunitní odpovědi (Cancer, 2022), je tedy logické, že jejich dysfunkce by ovlivnila expresi určitých genů. MLT1J na druhou stranu je novinkou v souvislosti s exprese genů souvisejících s imunitou a vyžaduje další studium.

V této studii jsme pozorovali velmi výraznou asociaci imunitní funkce s patogenezí PAS, zejména pokud jde o vliv ME na expresi určitých genů, z nichž většina je spojena s imunitní

odpovědí. Podle výsledků analýzy statistickým programem WebGestalt, byla většina genů v těsné blízkosti určitého transpozonu (pro elementy L2: 10 kb, pro elementy ERV – MER4B a MLT1J: 125 kb), zapojena do stejných či podobných drah (Obrázek 18 & 19). Jak jsme pozorovali, většina genů, které byly u pacientů s PAS významně upregulovány a byly spojeny s imunitou, měla v jejich blízkosti alespoň jeden mobilní element. Můžeme tedy teoretizovat, že mechanismy řídící regulační procesy, jako je metylace či vázání represorů na silencers, by mohly být u pacientů s PAS potenciálně dysfunkční, což by vedlo k následné dysregulaci genů implikovaných v PAS.

6.4 KZNF analýza

Proteiny KRAB zinc-finger (KZNFs) jsou transkripční faktory, které zprostředkovávají metylaci na transpozonech (Dopkins *et al.*, 2022). Při pozorování jejich exprese pomocí dat získaných z naší DEA, naše očekávání bylo najít dysregulované KZNFs, které by byly většinou downregulovány, právě z důvodu jejich represorové funkce, což by odpovídalo většinovému trendu upregulace DEGs. Tato analýza přinesla zajímavé, ale většinou protichůdné výsledky, protože většina lidských KZNFs nebyla významně dysregulována. Ty, které byly významné ($p < 0,05$), byly výhradně upregulovány a nebyly u nich nalezeny žádné významné regulační funkce v souvislosti s nalezenými elementy. Stojí však za zmínku, že KZNFs a jejich korepresory (KAP1 a SETDB1) mohou podstoupit post-translační modifikace měnící jejich schopnost vázat se na DNA (Singh *et al.*, 2015; Ecco *et al.*, 2017). Takže naše analýza RNA-seq nemusí být dostatečná k detekci post-translačních modifikací potlačujících metylaci mobilních elementů, která by vyžadovala proteomickou analýzu. Vzhledem ke složitosti všech mechanismů řídících metylaci mobilních elementů (Obrázek 8, Dopkins *et al.*, 2022) je možné, že zde jsou zapojeny také jiné mechanismy řídící jejich aktivitu.

7 ZÁVĚR

Celkově vzato naše výsledky potvrzují význam dráhy vrozeného imunitního systému v patologii poruch autistického spektra (PAS), zejména pokud jde o signalizaci a interakce cytokinů. S ohledem na roli transpozonů v regulačních sítích genů a na dřívější důkazy o zvýšené jejich přítomnosti u pacientů s PAS, věříme, že transpozony mohou částečně ovlivňovat exprese genů spojených s PAS. Dysregulace těchto genů u jedinců s PAS může být způsobena změnami v mechanismech kontroly enhancových funkcí ME, jako je metylace, zprostředkovávána nejen KRAB zinc-finger proteiny (KZNFs). Nicméně na úrovni transkriptomu jsme nebyli schopni tuto dysfunkci objasnit a pokud je přítomna, musí být odhalena podrobnější proteomikou, která zohledňuje jejich sklon k post-translačním modifikacím. Dále jsme také zjistili možnou účast elementů MER4B, L2a, b, c a MLT1J, jejichž souvislosti s regulací exprese genů u pacientů s PAS dosud nebyly široce diskutovány. MLT1J je naprostou novelou, jejíž regulační funkce byla popsána pouze velmi stručně. Jak bylo již uvedeno, dysregulace imunitního systému byla několikrát spojena s PAS, avšak málo studií skutečně objasnilo mechanismy, které se na této dysregulaci podílejí. Naše studie proto poskytuje funkční hypotézu, která zahrnuje transpozony jako jedny z hlavních regulačních činitelů zapojené do této dysregulace, což bylo silně podpořeno našimi výsledky. Vzhledem k tomu, že genetické pochopení PAS je výrazně omezeno a jakákoli diagnostická/terapeutická technika spojená s ním může být z velké části nespolehlivá, je rozšíření tohoto pochopení potřebné. Naše studie tedy poskytla zvýšené pochopení PAS, na kterém budou moci budoucí studie dále rozvíjet, aby v budoucnu objevily zmíněná diagnostická/terapeutická opatření, nyní s ohledem i na retrotranspozony.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. THOROVÁ, Kateřina. Poruchy autistického spektra: dětský autismus, atypický autismus, Aspergerův syndrom, dezintegrační porucha. Praha: Portál, 2006. ISBN 80-7367-091-7
2. MEJSNAROVÁ, Ivana, 2016. DÍTĚ S AUTISMEM: PŘÍPADOVÁ STUDIE DÍVKY S PAS. Olomouc. Bakalářská diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
3. POŠVÁŘOVÁ, Zuzana, 2016. Mobilní elementy v lidském genomu. Praha. BAKALÁŘSKÁ PRÁCE. Univerzita Karlova v Praze.
4. NAGARAJAN, Raman, HOGART, Amber, GWYE, Ynnez, MARTIN, Michelle R and LASALLE, Janine M., 2006. Reduced MeCP2 Expression is Frequent in Autism Frontal Cortex and Correlates with Aberrant MECP2 Promoter Methylation. *Epigenetics* [online]. 23 October 2006. Vol. 1, no. 4, p. 172–182. DOI 10.4161/epi.1.4.3514. Available from: <http://dx.doi.org/10.4161/epi.1.4.3514>
5. PATCHSUNG, Maturada, SETTAYANON, Sirapat, PONGPANICH, Monnat, MUTIRANGURA, Dharm, JINTARITH, Pornrutsami and MUTIRANGURA, Apiwat, 2018. Alu siRNA to increase Alu element methylation and prevent DNA damage. *Epigenomics* [online]. 1 February 2018. Available from: <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0096>
6. KENT, W. James, SUGNET, Charles W., FUREY, Terrence S., ROSKIN, Krishna M., PRINGLE, Tom H., ZAHLER, Alan M. and HAUSSLER, And David, 2002. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research* [online]. 16 May 2002. Available from: <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
7. ANDERS, Simon and HUBER, Wolfgang, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* [online]. 1 October 2010. Available from: <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
8. COSTA-SILVA, Juliana, DOMINGUES, Douglas Silva and LOPES, Fabrício Martins, 2017. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLOS ONE* [online]. 21 December 2017. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
9. GONZALEZ, Jairo Navarro, ZWEIG, Ann S., SPEIR, Matthew L, SCHMELTER, Daniel, ROSENBLOOM, Kate R., RANEY, Brian J., POWELL, Conner C, NASSAR, Luis R, MAULDING, Nathan D, LEE, Christopher M., HINRICHS, Angie S., FYFE, Alastair Charles, FERNANDES, Jason D, DIEKHANS, Mark, CLAWSON, Hiram, CASPER, Jonathan D., BENET-PAGÈS, Anna, BARBER, Galt P., HAUSSLER, David, KUHN, Robert M., HAEUSSLER, Maximilian and KENT, W. James, 2020. The UCSC Genome Browser database: 2021 update. *Nucleic Acids Research* [online]. 22 November 2020. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1070>
10. MOORE, Jill E., PURCARO, Michael J., PRATT, Henry E., EPSTEIN, Charles B., SHORESH, Noam, ADRIAN, Jessika, KAWLI, Trupti, DAVIS, Carrie A., DOBIN, Alexander, KAUL, Rajinder, HALOW, Jessica, VAN NOSTRAND, Eric L., FREESE, Peter, GORKIN, David U., SHEN, Yin, HE, Yiping, MACKIEWICZ, Mark, PAULI-BEHN, Florencia, WILLIAMS, Brian A., MORTAZAVI, A, KELLER, Cheryl A., ZHANG, Xiao-Ou, ELHAJJAJY, Shaimae I., HUEY, Jack, DICKEL, Diane E., SNETKOVA, Valentina, WEI, Xintao, WANG, Xiaofeng, RIVERA-MULIA, Juan Carlos, ROZOWSKY, Joel, ZHANG, Jing, CHHETRI, Surya B., ZHANG, Jialing, VICTORSEN, Alec, WHITE, Kevin P., VISEL, Axel, YEO, G, BURGE, Christopher B., LÉCUYER, Éric, GILBERT, David M., DEKKER, Job, RINN, John L., MENDENHALL, Eric M., ECKER, Joseph R., KELLIS, M, KLEIN, Robert J., NOBLE, William Stafford, KUNDAJE, Anshul, GUIGÓ, Roderic, FARNHAM, Peggy J.,

- CHERRY, J. Michael, MYERS, R, REN, Bing, GRAVELEY, Brenton R., GERSTEIN, Mark, PENNACCHIO, Len A., SNYDER, M, BERNSTEIN, B, WOLD, B, HARDISON, R, GINGERAS, T, STAMATOYANNOPOULOS, J and WENG, Zhiping, 2020. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature* [online]. 29 July 2020. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2493-4>
11. SUBRAMANIAN, Aravind, TAMAYO, Pablo, MOOTHA, Vamsi K., MUKHERJEE, Sayan, EBERT, Benjamin L., GILLETTE, Michael A., PAULOVICH, Amanda G., POMEROY, Scott L., GOLUB, Todd R., LANDER, Eric S. and MESIROV, Jill P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 30 September 2005. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
 12. JIANG, Yong-Hui, WANG, Yi, XU, Xiu, CHOY, Kwong Wai, PURSLEY, Amber N. and CHEUNG, Sau Wai, 2014. Genetic diagnosis of autism spectrum disorders: The opportunity and challenge in the genomics era. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 30 May 2014. Available from: <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.910747>
 13. NEUMEYER, Ann M., SOKOLOFF, Natalia Cano, MCDONNELL, Erin, MACKLIN, Eric A., MCDUGLE, Christopher J. and MISRA, Madhusmita, 2017. Bone microarchitecture in adolescent boys with autism spectrum disorder. *Bone* [online]. 1 April 2017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.01.009>
 14. SHI, Lei, 2013. Dock protein family in brain development and neurological disease. *Communicative & Integrative Biology* [online]. 9 November 2013. Available from: <https://doi.org/10.4161/cib.26839>
 15. LORD, Catherine, ELSABBAGH, Mayada, BAIRD, Gillian and VEENSTRA-VANDERWEELE, Jeremy, 2018. Autism spectrum disorder. *The Lancet* [online]. 1 August 2018. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31129-2)
 16. TANU and KAKKAR, Deepti, 2019. Diagnostic Assessment Techniques and Non-Invasive Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. *International Journal of E-Health and Medical Communications* [online]. 1 July 2019. Vol. 10, no. 3, p. 79–95. DOI 10.4018/ijehmc.2019070105. Available from: <http://dx.doi.org/10.4018/ijehmc.2019070105>
 17. GOLDANI, Andre A. S., DOWNS, Susan R., WIDJAJA, Felicia, LAWTON, Brittany and HENDREN, Robert L., 2014. Biomarkers in Autism. *Frontiers in Psychiatry* [online]. 12 August 2014. Vol. 5. DOI 10.3389/fpsy.2014.00100. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2014.00100>
 18. LOKE, Yuk Jing, HANNAN, Anthony John and CRAIG, Jeffrey Mark, 2015. The Role of Epigenetic Change in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neurology* [online]. 26 May 2015. Vol. 6. DOI 10.3389/fneur.2015.00107. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00107>
 19. ZHUBI, A, CHEN, Y, DONG, E, COOK, E H, GUIDOTTI, A and GRAYSON, D R, 2014. Increased binding of MeCP2 to the GAD1 and RELN promoters may be mediated by an enrichment of 5-hmC in autism spectrum disorder (ASD) cerebellum. *Translational Psychiatry* [online]. 21 January 2014. Vol. 4, no. 1, p. e349–e349. DOI 10.1038/tp.2013.123. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2013.123>
 20. WONG, C C Y, MEABURN, E L, RONALD, A, PRICE, T S, JEFFRIES, A R, SCHALKWYK, L C, PLOMIN, R and MILL, J, 2013. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Molecular Psychiatry* [online]. 23 April 2013. Vol. 19, no. 4, p. 495–503. DOI 10.1038/mp.2013.41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.41>

21. WILLIAMS, Emily, CASANOVA, Manuel, SWITALA, Andrew, LI, Hong and QIU, Mengsheng, 2013. Transposable elements occur more frequently in autism-risk genes: Implications for the role of genomic instability in autism. *Translational Neuroscience* [online]. 1 June 2013. Vol. 4, no. 2, p. 172–202. DOI 10.2478/s13380-013-0113-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.2478/s13380-013-0113-6>
22. BOURQUE, Guillaume, BURNS, Kathleen H., GEHRING, Mary, GORBUNOVA, Vera, SELUANOV, Andrei, HAMMELL, Molly, IMBEAULT, Michaël, IZSVÁK, Zsuzsanna, LEVIN, Henry L., MACFARLAN, Todd S., MAGER, Dixie L. and FESCHOTTE, Cédric, 2018. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biology* [online]. 19 November 2018. Vol. 19, no. 1. DOI 10.1186/s13059-018-1577-z. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>
23. MISIAK, Błażej, RICCERI, Laura and SAŚIADEK, Maria M., 2019. Transposable Elements and Their Epigenetic Regulation in Mental Disorders: Current Evidence in the Field. *Frontiers in Genetics* [online]. 25 June 2019. Vol. 10. DOI 10.3389/fgene.2019.00580. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00580>
24. OJA, Merja, PELTONEN, Jaakko, BLOMBERG, Jonas and KASKI, Samuel, 2007. Methods for estimating human endogenous retrovirus activities from EST databases. *BMC Bioinformatics* [online]. May 2007. Vol. 8, no. S2. DOI 10.1186/1471-2105-8-s2-s11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-s2-s11>
25. SU, Jianzhong, SHAO, Xiujuan, LIU, Hongbo, LIU, Shengqiang, WU, Qiong and ZHANG, Yan, 2012. Genome-wide dynamic changes of DNA methylation of repetitive elements in human embryonic stem cells and fetal fibroblasts. *Genomics* [online]. January 2012. Vol. 99, no. 1, p. 10–17. DOI 10.1016/j.ygeno.2011.10.004. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.10.004>
26. MICHAUD, E J, VAN VUGT, M J, BULTMAN, S J, SWEET, H O, DAVISSON, M T and WOYCHIK, R P, 1994. Differential expression of a new dominant agouti allele (Aiapy) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes & Development* [online]. 15 June 1994. Vol. 8, no. 12, p. 1463–1472. DOI 10.1101/gad.8.12.1463. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.8.12.1463>
27. WILLIAMS, Emily, CASANOVA, Manuel, SWITALA, Andrew, LI, Hong and QIU, Mengsheng, 2013. Transposable elements occur more frequently in autism-risk genes: Implications for the role of genomic instability in autism. *Translational Neuroscience* [online]. 1 June 2013. Vol. 4, no. 2, p. 172–202. DOI 10.2478/s13380-013-0113-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.2478/s13380-013-0113-6>
28. SAELI, Thanit, TANGSUWANSRI, Chayanin, THONGKORN, Surangrat, CHONCHAIYA, Weerasak, SUPHAPEETIPORN, Kanya, MUTIRANGURA, Apiwat, TENCOMNAO, Tewin, HU, Valerie W. and SARACHANA, Tewarit, 2018. Integrated genome-wide Alu methylation and transcriptome profiling analyses reveal novel epigenetic regulatory networks associated with autism spectrum disorder. *Molecular Autism* [online]. 16 April 2018. Vol. 9, no. 1. DOI 10.1186/s13229-018-0213-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13229-018-0213-9>
29. LYNCH, Vincent J, LECLERC, Robert D, MAY, Gemma and WAGNER, Günter P, 2011. Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals. *Nature Genetics* [online]. 25 September 2011. Vol. 43, no. 11, p. 1154–1159. DOI 10.1038/ng.917. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.917>
30. LU, Xinyi, SACHS, Friedrich, RAMSAY, LeeAnn, JACQUES, Pierre-Étienne, GÖKE, Jonathan, BOURQUE, Guillaume and NG, Huck-Hui, 2014. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nature Structural*

- & *Molecular Biology* [online]. 30 March 2014. Vol. 21, no. 4, p. 423–425.
DOI 10.1038/nsmb.2799. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2799>
31. NOTWELL, James H., CHUNG, Tisha, HEAVNER, Whitney and BEJERANO, Gill, 2015. A family of transposable elements co-opted into developmental enhancers in the mouse neocortex. *Nature Communications* [online]. 25 March 2015. Vol. 6, no. 1. DOI 10.1038/ncomms7644. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7644>
 32. DOPKINS, Nicholas, O'MARA, Morgan M., LAWRENCE, Elsa, FEI, Tongyi, SANDOVAL-MOTTA, Santiago, NIXON, Douglas F. and BENDALL, Matthew L., 2022. A field guide to endogenous retrovirus regulatory networks. *Molecular Cell* [online]. October 2022. Vol. 82, no. 20, p. 3763–3768. DOI 10.1016/j.molcel.2022.09.011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2022.09.011>
 33. LIAO, Yuxing, WANG, Jing, JAEHNIG, Eric J, SHI, Zhiao and ZHANG, Bing, 2019. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research* [online]. 22 May 2019. Vol. 47, no. W1, p. W199–W205. DOI 10.1093/nar/gkz401. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz401>
 34. ZHANG, B., KIROV, S. and SNODDY, J., 2005. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research* [online]. 1 July 2005. Vol. 33, no. Web Server, p. W741–W748. DOI 10.1093/nar/gki475. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki475>
 35. KHATRI, Purvesh, SIROTA, Marina and BUTTE, Atul J., 2012. Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. OUZOUNIS, Christos A. (ed.), *PLoS Computational Biology* [online]. 23 February 2012. Vol. 8, no. 2, p. e1002375. DOI 10.1371/journal.pcbi.1002375. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002375>
 36. WANG, Jing, VASAIKAR, Suhas, SHI, Zhiao, GREER, Michael and ZHANG, Bing, 2017. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research* [online]. 3 May 2017. Vol. 45, no. W1, p. W130–W137. DOI 10.1093/nar/gkx356. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx356>
 37. LI, Xiaohong, CHAUHAN, Abha, SHEIKH, Ashfaq M., PATIL, Sangita, CHAUHAN, Ved, LI, Xiu-Min, JI, Lina, BROWN, Ted and MALIK, Mazhar, 2009. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology* [online]. February 2009. Vol. 207, no. 1–2, p. 111–116. DOI 10.1016/j.jneuroim.2008.12.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
 38. FAN, Guangxiang, MA, Jiamin, MA, Ruyi, SUO, Mingjiao, CHEN, Yiwen, ZHANG, Siming, ZENG, Yan and CHEN, Yushan, 2023. Microglia Modulate Neurodevelopment in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 9 December 2023. Vol. 24, no. 24, p. 17297. DOI 10.3390/ijms242417297. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242417297>
 39. KANA, Veronika, DESLAND, Fiona A., CASANOVA-ACEBES, Maria, AYATA, Pinar, BADIMON, Ana, NABEL, Elisa, YAMAMURO, Kazuhiko, SNEEBOER, Marjolein, TAN, I-Li, FLANIGAN, Meghan E., ROSE, Samuel A., CHANG, Christie, LEADER, Andrew, LE BOURHIS, Hortense, SWEET, Eric S., TUNG, Navpreet, WROBLEWSKA, Aleksandra, LAVIN, Yonit, SEE, Peter, BACCARINI, Alessia, GINHOUX, Florent, CHITU, Violeta, STANLEY, E. Richard, RUSSO, Scott J., YUE, Zhenyu, BROWN, Brian D., JOYNER, Alexandra L., DE WITTE, Lotje D., MORISHITA, Hirofumi, SCHAEFER, Anne and MERAD, Miriam, 2019. CSF-1 controls cerebellar microglia and is required for motor function and social interaction. *Journal of Experimental Medicine*

- [online]. 26 July 2019. Vol. 216, no. 10, p. 2265–2281. DOI 10.1084/jem.20182037. Available from: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20182037>
40. RAHMAN, Md Rezanur, PETRALIA, Maria Cristina, CIURLEO, Rosella, BRAMANTI, Alessia, FAGONE, Paolo, SHAHJAMAN, Md, WU, Lang, SUN, Yanfa, TURANLI, Beste, ARGA, Kazim Yalcin, ISLAM, Md Rafiqul, ISLAM, Tania and NICOLETTI, Ferdinando, 2020. Comprehensive Analysis of RNA-Seq Gene Expression Profiling of Brain Transcriptomes Reveals Novel Genes, Regulators, and Pathways in Autism Spectrum Disorder. *Brain Sciences* [online]. 17 October 2020. Vol. 10, no. 10, p. 747. DOI 10.3390/brainsci10100747. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci10100747>
 41. ZHAO, Peng, XU, Yuanzhong, JIANG, Lu-Lin, FAN, Xuejun, KU, Zhiqiang, LI, Leike, LIU, Xiaoye, DENG, Mi, ARASE, Hisashi, ZHU, Jay-Jiguang, HUANG, Timothy Y., ZHAO, Yingjun, ZHANG, Chengcheng, XU, Huaxi, TONG, Qingchun, ZHANG, Ningyan and AN, Zhiqiang, 2022. LILRB2-mediated TREM2 signaling inhibition suppresses microglia functions. *Molecular Neurodegeneration* [online]. 18 June 2022. Vol. 17, no. 1. DOI 10.1186/s13024-022-00550-y. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-022-00550-y>
 42. FILIPELLO, Fabia, MORINI, Raffaella, CORRADINI, Irene, ZERBI, Valerio, CANZI, Alice, MICHALSKI, Bernadeta, ERRENI, Marco, MARKICEVIC, Marija, STARVAGGI-CUCUZZA, Chiara, OTERO, Karel, PICCIO, Laura, CIGNARELLA, Francesca, PERRUCCI, Fabio, TAMBORINI, Matteo, GENUA, Marco, RAJENDRAN, Lawrence, MENNA, Elisabetta, VETRANO, Stefania, FAHNESTOCK, Margaret, PAOLICELLI, Rosa Chiara and MATTEOLI, Michela, 2018. The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity* [online]. May 2018. Vol. 48, no. 5, p. 979- 991.e8. DOI 10.1016/j.immuni.2018.04.016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.016>
 43. TAKEDA, Kazuya and NAKAMURA, Akira, 2017. Regulation of immune and neural function via leukocyte Ig-like receptors. *The Journal of Biochemistry* [online]. 22 June 2017. Vol. 162, no. 2, p. 73–80. DOI 10.1093/jb/mvx036. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvx036>
 44. SU, Helen C., JING, Huie and ZHANG, Qian, 2011. DOCK8 deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. December 2011. Vol. 1246, no. 1, p. 26–33. DOI 10.1111/j.1749-6632.2011.06295.x. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06295.x>
 45. LI, Xiaohong, CHAUHAN, Abha, SHEIKH, Ashfaq M., PATIL, Sangita, CHAUHAN, Ved, LI, Xiu-Min, JI, Lina, BROWN, Ted and MALIK, Mazhar, 2009. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology* [online]. February 2009. Vol. 207, no. 1–2, p. 111–116. DOI 10.1016/j.jneuroim.2008.12.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
 46. DONNELLY, S. R., HAWKINS, T. E. and MOSS, S. E., 1999. A Conserved Nuclear Element with a Role in Mammalian Gene Regulation. *Human Molecular Genetics* [online]. 1 September 1999. Vol. 8, no. 9, p. 1723–1728. DOI 10.1093/hmg/8.9.1723. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/8.9.1723>
 47. SINGH, Kulwant, CASSANO, Marco, PLANET, Evarist, SEBASTIAN, Soji, JANG, Suk Min, SOHI, Gurjeev, FARALLI, Hervé, CHOI, Jinmi, YOUN, Hong-Duk, DILWORTH, F. Jeffrey and TRONO, Didier, 2015. A KAP1 phosphorylation switch controls MyoD function during skeletal muscle differentiation. *Genes & Development* [online]. 1 March 2015. Vol. 29, no. 5, p. 513–525. DOI 10.1101/gad.254532.114. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.254532.114>

48. ECCO, Gabriela, IMBEAULT, Michael and TRONO, Didier, 2017. KRAB zinc finger proteins. *Development* [online]. 1 August 2017. Vol. 144, no. 15, p. 2719–2729. DOI 10.1242/dev.132605. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.132605>
49. BOYCE, Brendan, YAO, Zhenqiang and XING, Lianping, 2009. Osteoclasts Have Multiple Roles in Bone in Addition to Bone Resorption. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression* [online]. 2009. Vol. 19, no. 3, p. 171–180. DOI 10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i3.10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i3.10>
50. ROSENBERG, Rebecca E., LAW, J. Kiely, YENOKYAN, Gayane, MCGREADY, John, KAUFMANN, Walter E. and LAW, Paul A., 2009. Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* [online]. 5 October 2009. Vol. 163, no. 10, p. 907. DOI 10.1001/archpediatrics.2009.98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98>
51. WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK, Barbara and NOWAKOWSKA, Beata Anna, 2019. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics* [online]. 10 January 2019. Vol. 60, no. 1, p. 37–47. DOI 10.1007/s13353-018-00480-w. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-018-00480-w>
52. QIU, Yichun and KÖHLER, Claudia, 2020. Mobility connects: transposable elements wire new transcriptional networks by transferring transcription factor binding motifs. *Biochemical Society Transactions* [online]. 23 June 2020. Vol. 48, no. 3, p. 1005–1017. DOI 10.1042/bst20190937. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/bst20190937>
53. IRIMIA, Manuel, WEATHERITT, Robert J., ELLIS, Jonathan D., PARIKSHAK, Neelroop N., GONATOPOULOS-POURNATZIS, Thomas, BABOR, Mariana, QUESNEL-VALLIÈRES, Mathieu, TAPIAL, Javier, RAJ, Bushra, O'HANLON, Dave, BARRIOS-RODILES, Miriam, STERNBERG, Michael J.E., CORDES, Sabine P., ROTH, Frederick P., WRANA, Jeffrey L., GESCHWIND, Daniel H. and BLENCOWE, Benjamin J., 2014. A Highly Conserved Program of Neuronal Microexons Is Misregulated in Autistic Brains. *Cell* [online]. December 2014. Vol. 159, no. 7, p. 1511–1523. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.035. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.035>
54. BOYCE, B.F., 2013. Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions. *Journal of Dental Research* [online]. 1 August 2013. Vol. 92, no. 10, p. 860–867. DOI 10.1177/0022034513500306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034513500306>
55. BROWN, Alan S., BEGG, Melissa D., GRAVENSTEIN, Stefan, SCHAEFER, Catherine A., WYATT, Richard J., BRESNAHAN, Michaeline, BABULAS, Vicki P. and SUSSER, Ezra S., 2004. Serologic Evidence of Prenatal Influenza in the Etiology of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* [online]. 1 August 2004. Vol. 61, no. 8, p. 774. DOI 10.1001/archpsyc.61.8.774. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.61.8.774>
56. JONES, Kenneth A. and THOMSEN, Christian, 2013. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience* [online]. March 2013. Vol. 53, p. 52–62. DOI 10.1016/j.mcn.2012.10.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.002>
57. MELTZER, Amory and VAN DE WATER, Judy, 2016. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology* [online]. 18 August 2016. Vol. 42, no. 1, p. 284–298. DOI 10.1038/npp.2016.158. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.158>

58. ASHWOOD, Paul, KRAKOWIAK, Paula, HERTZ-PICCIOTTO, Irva, HANSEN, Robin, PESSAH, Isaac N. and VAN DE WATER, Judy, 2011. Altered T cell responses in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity* [online]. July 2011. Vol. 25, no. 5, p. 840–849. DOI 10.1016/j.bbi.2010.09.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.002>
59. HAROON, Ebrahim, RAISON, Charles L and MILLER, Andrew H, 2011. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. *Neuropsychopharmacology* [online]. 14 September 2011. Vol. 37, no. 1, p. 137–162. DOI 10.1038/npp.2011.205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2011.205>
60. XIANG, Yangquan and LIANG, Hongqing, 2021. The Regulation and Functions of Endogenous Retrovirus in Embryo Development and Stem Cell Differentiation. WU, Qiang (ed.), *Stem Cells International* [online]. 27 February 2021. Vol. 2021, p. 1–8. DOI 10.1155/2021/6660936. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2021/6660936>
61. PULVER, Cyril, GRUN, Delphine, DUC, Julien, SHEPPARD, Shaoline, PLANET, Evarist, COUDRAY, Alexandre, DE FONDEVILLE, Raphaël, PONTIS, Julien and TRONO, Didier, 2023. Statistical learning quantifies transposable element-mediated cis-regulation. *Genome Biology* [online]. 10 November 2023. Vol. 24, no. 1. DOI 10.1186/s13059-023-03085-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-023-03085-7>
62. LAI, Meng-Chuan, LOMBARDO, Michael V., CHAKRABARTI, Bhismadev and BARON-COHEN, Simon, 2013. Subgrouping the Autism “Spectrum”: Reflections on DSM-5. NESTLER, Eric (ed.), *PLoS Biology* [online]. 23 April 2013. Vol. 11, no. 4, p. e1001544. DOI 10.1371/journal.pbio.1001544. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001544>
63. GRZADZINSKI, Rebecca, HUERTA, Marisela and LORD, Catherine, 2013. DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Molecular Autism* [online]. 2013. Vol. 4, no. 1, p. 12. DOI 10.1186/2040-2392-4-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/2040-2392-4-12>
64. KERESZTURI, Éva, 2023. Diversity and Classification of Genetic Variations in Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 26 November 2023. Vol. 24, no. 23, p. 16768. DOI 10.3390/ijms242316768. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242316768>
65. DIAS, Caroline M. and WALSH, Christopher A., 2020. Recent Advances in Understanding the Genetic Architecture of Autism. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 31 August 2020. Vol. 21, no. 1, p. 289–304. DOI 10.1146/annurev-genom-121219-082309. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-121219-082309>
66. SCHAAF, Christian P., BETANCUR, Catalina, YUEN, Ryan K. C., PARR, Jeremy R., SKUSE, David H., GALLAGHER, Louise, BERNIER, Raphael A., BUCHANAN, Janet A., BUXBAUM, Joseph D., CHEN, Chun-An, DIES, Kira A., ELSABBAGH, Mayada, FIRTH, Helen V., FRAZIER, Thomas, HOANG, Ny, HOWE, Jennifer, MARSHALL, Christian R., MICHAUD, Jacques L., RENNIE, Olivia, SZATMARI, Peter, CHUNG, Wendy K., BOLTON, Patrick F., COOK, Edwin H., SCHERER, Stephen W. and VORSTMAN, Jacob A. S., 2020. A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder. *Nature Reviews Genetics* [online]. 21 April 2020. Vol. 21, no. 6, p. 367–376. DOI 10.1038/s41576-020-0231-2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0231-2>
67. HAVDAHL, A., NIARCHOU, M., STARNAWSKA, A., UDDIN, M., VAN DER MERWE, C. and WARRIER, V., 2021. Genetic contributions to autism spectrum

- disorder. *Psychological Medicine* [online]. 26 February 2021. Vol. 51, no. 13, p. 2260–2273. DOI 10.1017/s0033291721000192. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/s0033291721000192>
68. GUO, Hui, DUYZEND, Michael H., COE, Bradley P., BAKER, Carl, HOEKZEMA, Kendra, GERDTS, Jennifer, TURNER, Tychele N., ZODY, Michael C., BEIGHLEY, Jennifer S., MURALI, Shwetha C., NELSON, Bradley J., BAMSHAD, Michael J., NICKERSON, Deborah A., BERNIER, Raphael A. and EICHLER, Evan E., 2019. Genome sequencing identifies multiple deleterious variants in autism patients with more severe phenotypes. *Genetics in Medicine* [online]. July 2019. Vol. 21, no. 7, p. 1611–1620. DOI 10.1038/s41436-018-0380-2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-018-0380-2>
69. PÖS, Ondrej, RADVANSZKY, Jan, BUGLYÓ, Gergely, PÖS, Zuzana, RUSNAKOVA, Diana, NAGY, Bálint and SZEMES, Tomas, 2021. DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. *Biomedical Journal* [online]. October 2021. Vol. 44, no. 5, p. 548–559. DOI 10.1016/j.bj.2021.02.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2021.02.003>
70. THAPAR, Anita and COOPER, Miriam, 2013. Copy Number Variation: What Is It and What Has It Told Us About Child Psychiatric Disorders? *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* [online]. August 2013. Vol. 52, no. 8, p. 772–774. DOI 10.1016/j.jaac.2013.05.013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaac.2013.05.013>
71. VICARI, Stefano, NAPOLI, Eleonora, CORDEDDU, Viviana, MENGHINI, Deny, ALESI, Viola, LODDO, Sara, NOVELLI, Antonio and TARTAGLIA, Marco, 2019. Copy number variants in autism spectrum disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. June 2019. Vol. 92, p. 421–427. DOI 10.1016/j.pnpbp.2019.02.012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.02.012>
72. OXELGREN, Ulrika Wester, MYRELID, Åsa, ANNERÉN, Göran, EKSTAM, Bodil, GÖRANSSON, Cathrine, HOLMBOM, Agneta, ISAKSSON, Anne, ÅBERG, Marie, GUSTAFSSON, Jan and FERNELL, Elisabeth, 2016. Prevalence of autism and attention-deficit–hyperactivity disorder in Down syndrome: a population-based study. *Developmental Medicine & Child Neurology* [online]. 9 August 2016. Vol. 59, no. 3, p. 276–283. DOI 10.1111/dmcn.13217. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/dmcn.13217>
73. CORDEIRO, Lisa, TARTAGLIA, Nicole, ROELTGEN, David and ROSS, Judith, 2012. Social deficits in male children and adolescents with sex chromosome aneuploidy: A comparison of XXY, XYY, and XXYY syndromes. *Research in Developmental Disabilities* [online]. July 2012. Vol. 33, no. 4, p. 1254–1263. DOI 10.1016/j.ridd.2012.02.013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ridd.2012.02.013>
74. SCHIELE, M. A. and DOMSCHKE, K., 2017. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. *Genes, Brain and Behavior* [online]. 26 September 2017. Vol. 17, no. 3. DOI 10.1111/gbb.12423. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/gbb.12423>
75. DUFFNEY, Lara J., VALDEZ, Purnima, TREMBLAY, Martine W., CAO, Xinyu, MONTGOMERY, Sarah, MCCONKIE-ROSELL, Allyn and JIANG, Yong-hui, 2018. Epigenetics and autism spectrum disorder: A report of an autism case with mutation in H1 linker histone HIST1H1E and literature review. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [online]. 27 April 2018. Vol. 177, no. 4, p. 426–433. DOI 10.1002/ajmg.b.32631. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32631>

76. HUGHES, H.K., R.J.MORENO and ASHWOOD, P., 2023. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD). *Brain, Behavior, and Immunity* [online]. February 2023. Vol. 108, p. 245–254. DOI 10.1016/j.bbi.2022.12.001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2022.12.001>
77. CAREAGA, Milo, MURAI, Takeshi and BAUMAN, Melissa D., 2017. Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biological Psychiatry* [online]. March 2017. Vol. 81, no. 5, p. 391–401. DOI 10.1016/j.biopsych.2016.10.020. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.020>
78. EMANUELE, Enzo, ORSI, Paolo, BOSO, Marianna, BROGLIA, Davide, BRONDINO, Natascia, BARALE, Francesco, DI NEMI, Stefania Ucelli and POLITI, Pierluigi, 2010. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters* [online]. March 2010. Vol. 471, no. 3, p. 162–165. DOI 10.1016/j.neulet.2010.01.033. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.033>
79. RICCI, S., BUSINARO, R., IPPOLITI, F., LO VASCO, V. R., MASSONI, F., ONOFRI, E., TROILI, G. M., PONTECORVI, V., MORELLI, M., RAPP RICCIARDI, M. and ARCHER, T., 2013. Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. *Neurotoxicity Research* [online]. 19 April 2013. Vol. 24, no. 4, p. 491–501. DOI 10.1007/s12640-013-9393-4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-013-9393-4>
80. SAGHAZADEH, Amene, ATAEINIA, Bahar, KEYNEJAD, Kimia, ABDOLALIZADEH, Amirhussein, HIRBOD-MOBARAKEH, Armin and REZAEI, Nima, 2019. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *Journal of Psychiatric Research* [online]. August 2019. Vol. 115, p. 90–102. DOI 10.1016/j.jpsychires.2019.05.019. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.05.019>
81. ZWAIGENBAUM, Lonnie and PENNER, Melanie, 2018. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. *BMJ* [online]. 21 May 2018. P. k1674. DOI 10.1136/bmj.k1674. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.k1674>
82. GENOVESE, Ann and BUTLER, Merlin G., 2020. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2 July 2020. Vol. 21, no. 13, p. 4726. DOI 10.3390/ijms21134726. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134726>
83. WELLS, Jonathan N. and FESCHOTTE, Cédric, 2020. A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annual Review of Genetics* [online]. 23 November 2020. Vol. 54, no. 1, p. 539–561. DOI 10.1146/annurev-genet-040620-022145. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
84. BUTTLER, Carmen A. and CHUONG, Edward B., 2021. Emerging roles for endogenous retroviruses in immune epigenetic regulation*. *Immunological Reviews* [online]. 23 November 2021. Vol. 305, no. 1, p. 165–178. DOI 10.1111/imr.13042. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/imr.13042>
85. HURST, Tara and MAGIORKINIS, Gkikas, 2017. Epigenetic Control of Human Endogenous Retrovirus Expression: Focus on Regulation of Long-Terminal Repeats (LTRs). *Viruses* [online]. 31 May 2017. Vol. 9, no. 6, p. 130. DOI 10.3390/v9060130. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/v9060130>
86. THOMPSON, Peter J., MACFARLAN, Todd S. and LORINCZ, Matthew C., 2016. Long Terminal Repeats: From Parasitic Elements to Building Blocks of the Transcriptional Regulatory Repertoire. *Molecular Cell* [online]. June 2016. Vol. 62, no. 5, p. 766–776. DOI 10.1016/j.molcel.2016.03.029. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.029>

87. CAO, Yaqiang, CHEN, Guoyu, WU, Gang, ZHANG, Xiaoli, MCDERMOTT, Joseph, CHEN, Xingwei, XU, Chi, JIANG, Quanlong, CHEN, Zhaoxiong, ZENG, Yingying, AI, Daosheng, HUANG, Yi and HAN, Jing-Dong J., 2018. Widespread roles of enhancer-like transposable elements in cell identity and long-range genomic interactions. *Genome Research* [online]. 19 November 2018. Vol. 29, no. 1, p. 40–52. DOI 10.1101/gr.235747.118. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.235747.118>
88. ELBARBARY, Reyad A., LUCAS, Bronwyn A. and MAQUAT, Lynne E., 2016. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science* [online]. 12 February 2016. Vol. 351, no. 6274. DOI 10.1126/science.aac7247. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aac7247>
89. DUKATZ, Michael, DITTRICH, Marianna, STAHL, Elias, ADAM, Sabrina, DE MENDOZA, Alex, BASHTRYKOV, Pavel and JELTSCH, Albert, 2022. DNA methyltransferase DNMT3A forms interaction networks with the CpG site and flanking sequence elements for efficient methylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. October 2022. Vol. 298, no. 10, p. 102462. DOI 10.1016/j.jbc.2022.102462. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102462>
90. SHENG, WEI, QIAN, YANYAN, WANG, HUIJUN, MA, XIAOJING, ZHANG, PING, CHEN, LONG, MA, DUAN and HUANG, GUOYING, 2013. Association between mRNA levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MBD2 and LINE-1 methylation status in infants with tetralogy of Fallot. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2 July 2013. Vol. 32, no. 3, p. 694–702. DOI 10.3892/ijmm.2013.1427. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2013.1427>
91. ZHANG, Xiao, ZHANG, Rui and YU, Jinpu, 2020. New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 7 August 2020. Vol. 8. DOI 10.3389/fcell.2020.00657. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00657>
92. CHUONG, Edward B., ELDE, Nels C. and FESCHOTTE, Cédric, 2016. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* [online]. 4 March 2016. Vol. 351, no. 6277, p. 1083–1087. DOI 10.1126/science.aad5497. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad5497>

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

DNA Methylation Analysis Service, Services - Epigenetics, [no date]. [online]. Available from: <https://www.creativebiomart.net/epigenetics/services/dna-methylation-analysis-service/>

DESeq2, [no date]. *Bioconductor* [online]. Available from: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>

GenomicRanges, [no date]. *Bioconductor* [online]. Available from: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GenomicRanges.html>

WebGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit), [no date]. [online]. Available from: <https://www.webgestalt.org/>

KRABopedia - The place to find Krab Zinc Finger Proteins, [no date]. *KRABopedia* [online]. Available from: <https://tronoapps.epfl.ch/web/krabopedia/index.php>

R: The R Project for Statistical Computing, [no date]. [online]. Available from: <http://www.r-project.org/>

SFARI Gene - Welcome, [no date]. *SFARI Gene* [online]. Available from: <https://gene.sfari.org/>

RepeatMasker Genomic Datasets, [no date]. [online]. Available from: <https://www.repeatmasker.org/genomicDatasets/RMGenomicDatasets.html>

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<i>Tabulka 1:</i> Ukazuje příklady databází SNV asociovaných s autismem.	12
<i>Tabulka 2:</i> Tabulka 22 genů, nalezených v průsečíku Vennova diagramu s jejich funkcemi.	38
<i>Tabulka 3:</i> 20 nejvýznamnějších DEGs	57
<i>Tabulka 4:</i> 38 genů společných mezi SFARI databází a naší DEA analýzou	58
<i>Tabulka 5:</i> Výsledky ORA, Pathway analýzy	59
<i>Tabulka 6:</i> Výsledky ORA, Gene Ontology analýzy	61
<i>Tabulka 7:</i> Výsledky GSEA, Pathway analýzy	63
<i>Tabulka 8:</i> Výsledky GSEA, Gene Ontology analýzy	66
<i>Obrázek 1:</i> Vytvořeno dle Grzadzinski <i>et al.</i> (2013). Ukazuje dvě hlavní kritéria diagnózy PAS.	10
<i>Obrázek 2:</i> Upraveno dle Dias & Walsh (2020). Ukazuje, propojení genového podkladu PAS.	11
<i>Obrázek 3:</i> Převzat z Creative biomart (creativebiomart.net). Ukazuje metylaci DNA v eukaryotách na bázích cytozinu (místech CpG).	14
<i>Obrázek 4:</i> Upraveno podle Hughes <i>et al.</i> (2023). Ukazuje dysregulaci nespecifického imunitního systému a jejím efektu na mozkovou funkci.	15
<i>Obrázek 5:</i> Převzat od Wells & Feschotte, 2020. Ukazuje různé mechanismy transpozice. ...	18
<i>Obrázek 6:</i> Převzato od Bourque <i>et al.</i> (2018). Ukazuje schéma klasifikace transpozonů.....	18
<i>Obrázek 7:</i> Upraveno dle Buttler & Chuong (2021). Ukazuje proces integrace retrovirů do lidské DNA a jejich regulační potenciál.	21
<i>Obrázek 8:</i> Převzato od Dopkins <i>et al.</i> (2022). Ukazuje známé epigenetické modifikace ERV elementů regulujících jejich expresi.	22
<i>Obrázek 9:</i> Převzatý od Misiak <i>et al.</i> (2020). Ukazuje různé studie propojující roli mobilních elementů ve spojení s patogenezí PAS a jejich výsledky.	24
<i>Obrázek 10:</i> Ukazuje příklad potenciálního LTR elementu, který by mohl být zodpovědný za dysregulaci genu LILRB1.....	27
<i>Obrázek 11:</i> Zobrazuje výsledky analýzy DEA.	29
<i>Obrázek 12:</i> Zobrazuje výsledky analýzy ORA.	30
<i>Obrázek 13:</i> DAG (Directed acyclic graph) ukazující výsledky analýzy Gene Ontology.).....	31
<i>Obrázek 14:</i> Vzdálenost od nalezených DEGs v porovnání se vzdáleností náhodných nesignifikantních genů k nejbližším elementům LINE.	33
<i>Obrázek 15:</i> Vzdálenost od nalezených DEGs v porovnání se vzdáleností náhodných nesignifikantních genů k nejbližším elementům ERV.	33
<i>Obrázek 16:</i> Zobrazuje výsledky GSEA analýzy pathway.	35
<i>Obrázek 17:</i> Zobrazuje výsledky GSEA analýzy Gene Ontology.	36
<i>Obrázek 18:</i> Asociované signifikantní dráhy genů s L2 elementy ve vzdálenosti do 10 kb.....	37
<i>Obrázek 19:</i> Asociované signifikantní dráhy genů s MER4B a MLT1J ve vzdálenosti do 125 kb,	38
<i>Obrázek 20:</i> Vennův diagram ukazuje různé datové sady genů nalezené během našich analýz	39

11 DODATEČNÉ MATERIÁLY

Tabulka 3: 20 nejvýznamnějších DEGs

Gene	log2foldchange	padj
HSPA6	6.742830705	4.89E-08
LILRB1	1.544099947	1.67E-05
SERPINA3	5.479184159	1.74E-05
MYO1F	1.392726278	1.74E-05
SOCS3	4.789054053	1.74E-05
NFAM1	1.445331709	8.73E-05
SPI1	1.550025319	0.000100951
HSPB1	3.222392434	0.000170027
TCIRG1	1.523212939	0.000170027
C6orf118	1.683656292	0.00017943
AL590004.4	2.456052603	0.00026473
APBB1IP	0.762710868	0.000367059
BAG3	3.201857703	0.000367059
C1QC	1.741061094	0.000367059
CD300A	1.525471997	0.000367059
GADD45G	1.684762227	0.000367059
IL4I1	3.039681588	0.000367059
CYTH4	1.026436824	0.000379693
FERMT3	1.962996827	0.000379693
HMOX1	2.52889814	0.000379693

Tabulka 4: 38 genů společných mezi SFARI databází a naší DEA analýzou

Gene	log2foldchange	padj
PLAUR	2.076229	0.001348
KIF14	2.34666	0.001798
OXTR	1.266873	0.002516
SAMD11	2.684744	0.003002
VSIG4	1.793395	0.006193
VDR	1.957599	0.00847
ITGB3	1.705584	0.008652
WDFY4	0.681238	0.00952
DNAH3	1.541515	0.010605
FRG1	-0.48866	0.01287
RAB43	0.989176	0.013658
THBS1	1.912165	0.014585
LILRB2	1.674646	0.014938
SERPINE1	1.773329	0.015976
SLC25A39	0.413351	0.021373
C4B	1.417469	0.022326
CASZ1	1.22086	0.022405
DOCK8	0.725424	0.022582
HTR3C	2.296258	0.023435
CAPN12	1.994578	0.024523
FLNA	1.033951	0.024768
MSR1	1.921686	0.02716
PLXNA3	0.921622	0.027547
CADPS2	-1.04827	0.032307
SLC7A7	0.86719	0.034642
MYO9B	1.031784	0.037218

ITPR1	-0.68842	0.039086
GFAP	1.303191	0.040541
Gene	log2foldchange	padj
SPP2	1.181912	0.044019
KCNJ15	1.62182	0.044265
PDCD1	2.025691	0.045663
CCIN	1.547621	0.045769
PHF8	0.704985	0.047358
ZNF462	0.570131	0.048412
ARHGEF10	0.794159	0.049458
PIK3R2	1.25101	0.049974
RNF135	0.539635	0.049974
IKZF1	0.819391	0.049987

Tabulka 5: Výsledky ORA, Pathway analýzy

Gene Set	Description	Ratio	P Value
hsa04380	Osteoclast differentiation	4,7444	3,33E-16
hsa05150	Staphylococcus aureus infection	4,6895	1,19E-07
hsa04668	TNF signaling pathway	3,4318	1,31E-07
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	2,3447	1,43E-07

hsa05133	Pertussis	3,8873	4,42E-07
Gene Set	Description	Ratio	P Value
hsa05134	Legionellosis	4,4763	5,81E-07
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	2,559	2,2574E-06
hsa05152	Tuberculosis	2,5674	3,1708E-06
hsa04218	Cellular senescence	2,6671	3,4836E-06
hsa04610	Complement and coagulation cascades	3,5319	3,8442E-06
hsa05140	Leishmaniasis	3,5488	6,9446E-06
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	2,9309	0,000011276
hsa04010	MAPK signaling pathway	2,0586	0,000018352
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	2,4424	0,000025973

hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	2,8407	0,000047725
Gene Set	Description	Ratio	P Value
hsa05146	Amoebiasis	2,9065	0,000057213
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	2,4976	0,000082438
hsa04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	2,8858	0,00010291
hsa05144	Malaria	3,6846	0,00013374
hsa05221	Acute myeloid leukemia	3,2329	0,00013984

Tabulka 6: Výsledky ORA, Gene Ontology analýzy

Gene Set	Description	Ratio	P Value
GO:0002521	leukocyte differentiation	2,9306	<2.2e-16
GO:0042110	T cell activation	2,9157	9,99E-16
GO:0050900	leukocyte migration	3,0066	9,99E-16
GO:0034341	response to interferon-gamma	4,0377	2,26E-14

GO:0031349	positive regulation of defense response	2,8141	1,04E-13
Gene Set	Description	Ratio	P Value
GO:0002764	immune response-regulating signaling pathway	2,6774	1,15E-13
GO:0002694	regulation of leukocyte activation	2,6593	2,44E-13
GO:0032103	positive regulation of response to external stimulus	3,175	8,36E-13
GO:0002446	neutrophil mediated immunity	2,5789	1,03E-12
GO:0002250	adaptive immune response	2,8412	1,16E-12
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	2,7356	1,45E-12
GO:0036230	granulocyte activation	2,5583	1,50E-12
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	3,0378	1,55E-12
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	3,2573	3,10E-11
GO:0002697	regulation of immune effector process	2,696	3,66E-11
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	2,819	6,60E-11
GO:0006909	phagocytosis	3,1759	1,20E-10
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	2,6313	1,39E-10

GO:0043062	extracellular structure organization	2,568	2,29E-10
Gene Set	Description	Ratio	P Value
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	2,5908	2,47E-10

Tabulka 7: Výsledky GSEA, Pathway analýzy

Gene Set	Description	P Value	NES
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	<2.2e-16	2,3353
hsa05144	Malaria	<2.2e-16	2,2689
hsa05150	Staphylococcus aureus infection	<2.2e-16	2,2471
hsa04610	Complement and coagulation cascades	<2.2e-16	2,1828
hsa05134	Legionellosis	<2.2e-16	2,1622
hsa04380	Osteoclast differentiation	<2.2e-16	2,1366
hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	<2.2e-16	2,1151
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	<2.2e-16	2,0202
hsa05321	Inflammatory bowel disease (IBD)	<2.2e-16	1,9687
hsa05140	Leishmaniasis	<2.2e-16	1,9664
hsa04136	Autophagy	<2.2e-16	-2,29

hsa05016	Huntington disease	<2.2e-16	-2,3038
Gene Set	Description	P Value	NES
hsa04714	Thermogenesis	<2.2e-16	-2,3949
hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	<2.2e-16	-2,5281
hsa05010	Alzheimer disease	<2.2e-16	-2,738
hsa00190	Oxidative phosphorylation	<2.2e-16	-3,0513
hsa05012	Parkinson disease	<2.2e-16	-3,1034
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	<2.2e-16	1,8976
hsa04668	TNF signaling pathway	<2.2e-16	1,8849
hsa05340	Primary immunodeficiency	<2.2e-16	1,8493
hsa05323	Rheumatoid arthritis	<2.2e-16	1,8797
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	<2.2e-16	1,8615
hsa04974	Protein digestion and absorption	<2.2e-16	1,8605
hsa05217	Basal cell carcinoma	<2.2e-16	1,8577
hsa04630	JAK-STAT signaling pathway	<2.2e-16	1,8495
hsa00620	Pyruvate metabolism	<2.2e-16	-2,0819

hsa04723	Retrograde endocannabinoid signaling	<2.2e-16	-2,0833
Gene Set	Description	P Value	NES
hsa04672	Intestinal immune network for IgA production	<2.2e-16	1,8256
hsa05133	Pertussis	<2.2e-16	1,8218
hsa04260	Cardiac muscle contraction	<2.2e-16	-2,0029
hsa00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	<2.2e-16	-2,0204
hsa01200	Carbon metabolism	<2.2e-16	-2,0046
hsa04720	Long-term potentiation	<2.2e-16	-1,9746
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	<2.2e-16	-1,9841
hsa04140	Autophagy	<2.2e-16	-1,9629
hsa00640	Propanoate metabolism	<2.2e-16	-1,9351
hsa04146	Peroxisome	<2.2e-16	-1,9163
hsa00730	Thiamine metabolism	0,01107	-1,7938
hsa04710	Circadian rhythm	<2.2e-16	-1,7978
hsa03420	Nucleotide excision repair	<2.2e-16	-1,7787
hsa03420	Nucleotide excision repair	<2.2e-16	-1,7787

Tabulka 8: Výsledky GSEA, Gene Ontology analýzy

Gene Set	Description	NES	P Value
GO:0042107	cytokine metabolic process	2,1961	<2.2e-16
GO:0034341	response to interferon-gamma	2,1832	<2.2e-16
GO:0034340	response to type I interferon	2,1112	<2.2e-16
GO:0032635	interleukin-6 production	2,1059	<2.2e-16
GO:0002526	acute inflammatory response	2,1007	<2.2e-16
GO:0002250	adaptive immune response	2,0979	<2.2e-16
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	2,0911	<2.2e-16
GO:0032623	interleukin-2 production	2,0881	<2.2e-16
GO:0050866	negative regulation of cell activation	2,0794	<2.2e-16
GO:0002285	lymphocyte activation involved in immune response	2,0592	<2.2e-16
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	2,0503	<2.2e-16
GO:0061614	pri-miRNA transcription by RNA polymerase II	2,0404	<2.2e-16
GO:0060326	cell chemotaxis	2,0386	<2.2e-16
GO:0002448	mast cell mediated immunity	2,0375	<2.2e-16

GO:0045576	mast cell activation	2,0353	<2.2e-16
Gene Set	Description	NES	P Value
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	2,0302	<2.2e-16
GO:0032637	interleukin-8 production	2,0249	<2.2e-16
GO:0071706	tumor necrosis factor superfamily cytokine production	2,0242	<2.2e-16
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	-2,3048	<2.2e-16
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	-2,3085	<2.2e-16
GO:0006399	tRNA metabolic process	-2,4421	<2.2e-16
GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	-2,4877	<2.2e-16
GO:0006414	translational elongation	-2,5372	<2.2e-16
GO:0010257	NADH dehydrogenase complex assembly	-2,8068	<2.2e-16
GO:0033108	mitochondrial respiratory chain complex assembly	-2,8575	<2.2e-16
GO:0140053	mitochondrial gene expression	-2,8656	<2.2e-16
GO:0050900	leukocyte migration	2,0098	<2.2e-16
GO:0006959	humoral immune response	2,0148	<2.2e-16
GO:0106030	neuron projection fasciculation	-2,2215	<2.2e-16
GO:0010644	cell communication by electrical coupling	-2,2035	<2.2e-16

GO:0099504	synaptic vesicle cycle	-2,1538	<2.2e-16
Gene Set	Description	NES	P Value
GO:0000959	mitochondrial RNA metabolic process	-2,0726	<2.2e-16
GO:0099003	vesicle-mediated transport in synapse	-2,0874	<2.2e-16
GO:0007034	vacuolar transport	-2,0814	<2.2e-16
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	-2,0649	<2.2e-16
GO:0031163	metallo-sulfur cluster assembly	-2,0186	<2.2e-16
GO:0051648	vesicle localization	-2,0047	<2.2e-16
GO:0106027	neuron projection organization	-1,9661	<2.2e-16
GO:0048193	Golgi vesicle transport	-1,9249	<2.2e-16
GO:0035640	exploration behavior	-1,9051	0,0046948