

한국인 남성에서 자폐스펙트럼장애와 DLX6 유전자 단일염기다형성간 연관성 연구

김현근¹⁾ · 원성식¹⁾ · 이승구¹⁾ · 남 민²⁾ · 방희정²⁾ · 박현정²⁾
윤진영²⁾ · 최경식³⁾ · 홍미숙⁴⁾ · 정주호⁴⁾ · 곽규범¹⁾

차의과대학교 의학유전체교실,¹⁾ 이화여자대학교 심리학교실,²⁾
중부대학교 유아특수교육과,³⁾ 경희대학교 약리학교실/고향의학연구소⁴⁾

No Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in Distal-Less Homeobox-6 (DLX6) and Autism Spectrum Disorders (ASD) from the Korean Male Population

Hyoun Geun Kim, M.S.¹⁾, SeongSik Won, M.S.¹⁾, Seung Ku Lee, Ph.D.¹⁾, Min Nam, M.D., Ph.D.²⁾, Hee Jung Bang, Ph.D.²⁾, Hyun Jung Park, M.A.²⁾, Jin Young Yoon, M.A.²⁾, Kyung-Sik Choi, Ph.D.³⁾, Mee Sook Hong, Ph.D.⁴⁾, Joo-Ho Chung, M.D., Ph.D.⁴⁾ and KyuBum Kwack, Ph.D.¹⁾

¹⁾Medical Genomics Lab, CHA Research Institute, CHA University, Seongnam, Korea

²⁾Department of Psychology, Ewha Womans University, Seoul, Korea

³⁾Department of Elementary Special Education, College of Social Science, Joongbu University, Geumsan, Korea

⁴⁾Department of Pharmacology, Kohwang Medical Research Institute, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Objectives : Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that is characterized by abnormalities of social functioning, communication and behavior. The association of the 7q21-34 region with ASD has been reported. The DLX6 gene, which is located at the 7q22 region, is one of the positional and functional candidate genes for ASD. We found that there is no association between DLX6 polymorphisms and ASD in the Korean male population.

Methods : We selected three single nucleotide polymorphisms (SNPs) that might be implicated in the change of the DLX6 gene expression. The genomic DNA was collected from the venous blood of 147 male controls and 179 male patients with ASD. The genotypes of the selected SNPs were determined using the Illumina GoldenGate assay, and the statistical analyses were performed using HapAnalyzer software and SAS Enterprise.

Results : We found no association of the three SNPs in the DLX6 gene with ASD in the Korean male population.

Conclusion : Our study suggests that the three SNPs in the DLX6 gene are not associated with ASD, and we need to analyze the previously reported regions for their associations with ASD.

KEY WORDS : Autism Spectrum Disorders · ASD · DLX6 · SNP.

서 론

자폐스펙트럼장애(autism spectrum disorders)는 사회 적 상호작용, 의사소통 및 상동적 행동 분야의 발달이 손상

된 전반적 발달장애로서 자폐증(autism), 레트장애(Rett's disorder), 소아기 붕괴장애(childhood disintegrative disorder), 아스퍼거 증후군(Asperger's syndrome), 특정불 능의 전반적 발달장애로 분류된다.

자폐스펙트럼장애의 대부분은 소아기 자폐스펙트럼장애로 10,000명당 2~5명의 유병률을 보이며, 아스퍼거 증후군 등 다른 자폐성 전반적 발달 장애를 포함하는 경우 10,000명당 20~50명으로 높다. 남녀 성비는 약 4 : 1로서 여자보다 남 자에서 발생 빈도가 높게 나타난다.^{1,2)} 또한 자폐스펙트럼장 애와 연관성이 있는 유전자도 남녀에 따라 차이를 보이며, 7번 염색체에 위치한 유전자의 경우 보고된 유전자부위는 남

접수완료 : 2009년 11월 3일 / 심사완료 : 2010년 1월 4일
Address for correspondence : KyuBum Kwack, Ph.D., Medical Genomics Lab, CHA Research Institute, CHA University, Yatap-dong, Bundang-gu Seongnam, 463-836, Korea
Tel : +82.31-725-8376, Fax : +82.31-725-8350
E-mail : kbkwack@cha.ac.kr, kbkwack@gmail.com
본 연구는 보건복지가족부(A040002) 과제의 지원으로 수행되었다.

성에서 더욱 유의한 차이가 있음이 보고되었다.³⁾ 아직까지 자폐스펙트럼장애의 정확한 원인은 보고되어 있지 않으나 많은 연구에서 유전학적 요인이 제시되었다. 자폐환자의 형제 자매들은 2~4%에 자폐장애 유병률을 보이며,^{4,5)} 쌍생아 연구에서 자폐스펙트럼장애환자가 있는 일란성 쌍생아에서의 일치율은 36%이며, 이란성 쌍생아의 경우는 0%, 자폐스펙트럼장애상을 폭 넓게 본 경우 일란성 쌍생아에서는 85%, 이란성 쌍생아의 경우는 약 10%로 보고되었다.⁶⁾ 가족 및 쌍생아 연관성 연구를 통하여 자폐스펙트럼장애는 복잡하고 다양한 상호작용 유전자좌(multiple locus)가 연루됨이 제시되었다.⁷⁻⁹⁾ 최근에는 다양한 연관성 분석 및 전유전체조사(genome-wide scanning)를 통하여 자폐스펙트럼장애와 연관성이 있는 유전자를 찾는 연구가 진행되었으며, 22개의 상동염색체 중 7번 염색체는 여러 연구를 통하여 자폐스펙트럼장애와 연관성이 많은 염색체로 보고되었다.¹⁰⁻¹³⁾ 또한, Distal-less homeobox-6(DLX6)가 포함되어 있는 7q21~7q22 영역 또한 자폐스펙트럼장애와의 연관성이 보고된 바 있다.^{11,14)} Distal-less 유전자는 homeobox 유전자에 속하며, 6개의 유전자(Dlx 1, 2, 3, 5, 6, 7)로 구성된다. 이 유전자는 초기 발육에 있어서 각각의 새궁(branchial arch)에 특징적인 발현 부위를 형성하며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 몇몇 Dlx 유전자 군집(gene family)의 유전자는 전뇌와 기초 중추 발달에 관여하는 중요한 조절인자이다.¹⁸⁾ 포유류에서 이 유전자 군집은 쌍(Dlx1/2, Dlx3/7, Dlx5/6)을 이루어 존재하며, 각각의 쌍은 동일한 발현부위를 보인다.¹⁵⁾ 이 유전자 군집에 속한 DLX6는 전뇌(forebrain) 발달의 원시 신경절 융기(ganglionic eminence)와 배쪽간뇌(ventral diencephalon)에서 배형성 동안에 발현된다.¹⁸⁾ 이러한 전유전체조사연구 및 DLX6 유전자의 생물학적 기능에서 DLX6가 자폐스펙트럼장애의 발병에 기여할 수 있다고 생각된다.

이에 본 저자들은 DLX6 유전자에서 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 3개 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 선정하여 이들 단일염기다형성들의 유전형을 확인하고 연관성분석을 통해 자폐스펙트럼장애와의 관련성을 알아보려 하였다.

방 법

1. 대 상

자폐스펙트럼장애환자는 7~22.5세로 2004년에서 2006년까지 3개 특수학교의 학생 및 병원의 외래환자를 대상으로 179명의 남성을 선정하였으며, 이들은 모두 정신장애 진단 및 통계편람(Diagnostic and Statistical Manual of Men-

tal Disorder-IV, DSM-IV)¹⁹⁾과 한국판 자폐 평정척도.(Korean version of Childhood Autism Rating Scale, K-CARS)²⁰⁾ 총점 30점 이상 기준을 통해 자폐스펙트럼장애환자로 진단되었다. 본 연구진은 자폐스펙트럼장애의 유병률이 여성에 비해 남성에서 높은 것을 고려하여 성별에 의한 질병의 위험도를 배제하고자 남성들만을 대상으로 실험하였다. 모든 진단은 독립된 2명의 경험 있는 정신과 의사 및 심리학자에 의해 수행되었다. 대조군으로 유전학적, 신경학적 병력이 없는 건강한 남성 147명을 선정하였다. 본 연구는 차의과학대학교 임상 시험 심사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 심의를 통과하였다.

2. 단일염기다형성 선정 및 유전형 검사

본 연구를 수행하기 위하여 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 dbSNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)에 등록되어있는 단일염기다형성들 중에서 DLX6 유전자의 전사 및 해독과정에 영향을 줄 수 있는 단일염기다형성들을 다음 기준으로 선정하였다. 실제로 발현에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 조절부위(promoter region)의 단일염기다형성 선정은 유전자를 기준으로 앞뒤로 2,000base 이내의 단일염기다형성을 선정하였다. 이들 조절부위의 단일염기다형성 선정은 BIOBASE G-mbH의 AliBaba 2.1 software²¹⁾를 이용하였다. AliBaba는 전사인자결합부위(transcription factor binding site)를 예측하여 주는 웹 기반 프로그램으로서 염기서열을 넣어서 해당 부위에 결합할 수 있는 전사인자를 예측할 수 있다. 이를 이용하여 조절부위인 5' flanking UTR에서 2개 단일염기다형성(rs1034759, rs117937)을 선정하였으며, mRNA의 안정성에 영향을 주는 3' UTR에서 한 개 단일염기다형성(rs321654)을 선정하였다. 선정된 단일염기다형성들은 Illumina BeadStation 500 GX(Illumina Inc., San Diego, USA)의 Golden-Gate assay^{22,23)}을 이용하여 얻어진 신호값들을 Bead Studio Software(version 3.0.19.0., Illumina Inc., San Diego, USA)로 clustering 분석을 통하여 유전형을 확인하였다.

3. 통계분석

통계적 검정은 SAS Enterprise(Cary, NC)을 사용하여 실시하였다. 유전자의 분포가 정상군 및 자폐스펙트럼장애군에서 Hardy-Weinberg equilibrium(HWE)을 만족하는지를 검정하기 위해 카이제곱 적합도 검정(chi-square goodness-of-fit test)를 사용하였으며, Lewontin's D'(|D'|)²⁴⁾과 r²를 이용하여 두 단일염기다형성들 사이에 연관비평형(linkage disequilibrium, LD)을 확인하였다. 단일

염기다형성들에 대한 연관비평형 블록은 Gabriel 등이 제시한 알고리즘²⁵⁾을 통하여 확인하였으며 Haploview software (version 4)²⁶⁾를 사용하였다. 각각의 단일염기다형성에 대한 자페스펙트럼장애의 위험도를 검정하기 위하여 로지스틱 회귀분석을 실시하였으며 이를 통해 교차비(Odds ratios, OR)와 95% 신뢰구간 및 *p*-value를 산출하였다. 질병의 특징 및 유전학적 분석을 위하여 우성(dominant), 열성(recessive), 공우성(co-dominant)의 세 가지 분석 모형에 따른 자페스펙트럼장애와의 유의성을 분석하였다. 다수 대립인자를 A이라 하고 소수 대립인자를 B라 하면, 공우성(co-dominant) 모형은 AA, AB 및 BB에 대한 각각의 빈도를 비교하는 것이고, 우성(dominant) 모형은 AA의 빈도와 AB와 BB의 빈도에 대한 합을 비교하는 것이고, 열성(recessive) 모형은 AA와 AB의 빈도의 합과 BB의 빈도를 비교하는 것이다. 모든 연관성 분석은 Hapanalyzer software²⁷⁾와 SAS Enterprise Genetics module을 이용하여 분석하였다. 통계적 분석에서 *p*-value<.05 미만인 경우를 유의성이 있다고 하였다.

결 과

대조군은 세 단일염기다형성 모두에서 유전형질 확인에 성공하여 147명을 확인 할 수 있었다. 남성 자페스펙트럼장애

환자군에서 단일염기다형성 rs3213654는 179명 모두 유전형질을 확인할 수 있었다.

단일염기다형성 rs1034759와 rs1917937은 전사인자결합부위 예측 소프트웨어인 AlliBaba에서 각각 전사인자 GC-N4와 SP1의 결합부위에 존재하는 단일염기다형성들이다. 각 단일염기다형성들의 유전자상의 위치와 연관비평형 블록은 Fig. 1에 요약하였다(Fig. 1).

환자군과 대조군에서 Hardy-Weinberg equilibrium 검사를 수행한 결과, rs1034759를 제외한 두 단일염기다형성에서 평형상태를 유지함을 확인할 수 있었다.

rs1034759의 경우 대조군에서 TT 유전자형의 빈도가 100%로 확인되었다. 단일형태의 유전형을 가짐을 확인할 수 있었다.

Pair-wise linkage 분석을 통하여 단일염기다형성들간의 연관비평형 블록의 구조를 조사한 결과, 이들 세 단일염기다형성들은 블록을 형성하지 않았다.

본 실험에서는 정상 남성 147명과 자페스펙트럼장애 남성 환자 179명을 대상으로 DLX6 유전자의 5'-flanking UTR에서 2개 단일염기다형성(rs1034759, rs1917937)과 3'-UTR에서 1개 단일염기다형성(rs3213654)을 선정하여 유전형질을 확인하고 자페스펙트럼장애와의 연관성을 분석하였다. 단일염기다형성(우성, 열성, 공우성)에서 모두 *p*-value>.05로 자페스펙트럼장애와 대조군에서 유의한 차

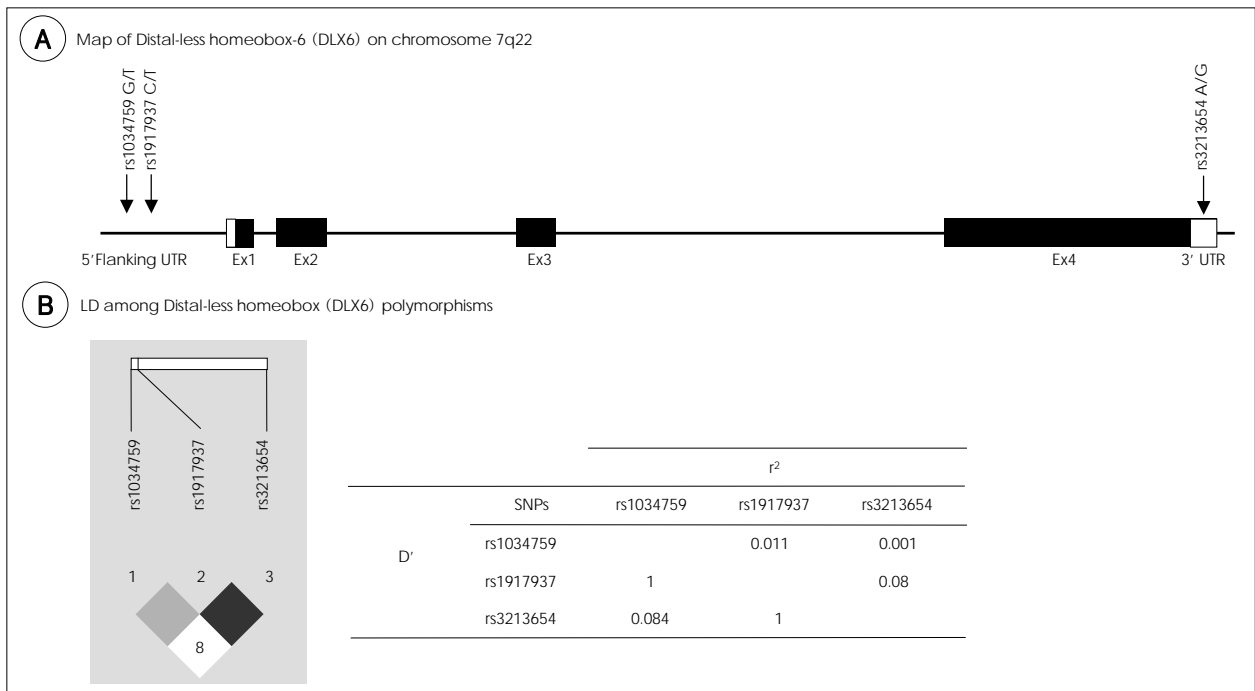


Fig. 1. Gene map and LD coefficients of the DLX6. A : The genetic map with 3 SNPs in DLX-6 gene. Coding exons are marked by black blocks. Putative transcription factor binding sites are marked by gray blocks. B : Linkage disequilibrium coefficients ($|D'|$ and r^2) among SNPs in DLX6

Table 1. Logistic regression analysis of DLX6 polymorphisms among ASD and controls

rs	Function	Genotype	Genotype distribution		Co-dominant		Dominant		Recessive	
			Control (N, %)	ASD (N, %)	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
rs1034759	5' Flanking UTR	TT	146 (100.0)	167 (99.4)						
		GT		1 (0.6)						
rs1917937	5' Flanking UTR	CC	74 (52.5)	70 (47.6)	1.149 (0.818-1.614)	0.422	1.215 (0.765-1.929)	0.410	1.172 (0.566-2.426)	0.670
		CT	52 (36.9)	59 (40.1)						
		TT	15 (10.6)	18 (12.2)						
rs3213654	3'UTR	AA	105 (71.4)	130 (72.6)	0.957 (0.635-1.442)	0.833	0.942 (0.580-1.532)	0.810	0.985 (0.294-3.294)	0.980
		AG	37 (25.2)	43 (24.0)						
		GG	5 (3.4)	6 (3.4)						

Logistic regression analyses were used calculating for odds ratios (95% confidence interval). Genotyping distribution and p-values for logistic analyses of three alternative models (co-dominant, dominant and recessive) are listed

이를 확인할 수 없었다(Table 1).

고찰

자폐스펙트럼장애환자와 가족을 대상으로 수행한 연관성 분석에서 염색체 7q21~22영역이 유의하다고 보고된 바 있다.^{10,11,14} 염색체 7q21~22영역의 유전자중 DLX6를 포함하여 DLX5, PCLO 등의 연관성 연구결과가 보고되었다.^{28,29}

DLX6는 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 발견된 Dlx 유전자군집에 포함되는 유전자들 중 하나로, 동물실험을 통하여 배형성 동안 전뇌 발달에 중요한 조절인자로 알려져 있다. 게다가 신경세포의 활성화를 조절하여 뇌에서 과도한 신경자극을 억제하는 기능을 담당하는 GABAergic system에 관여하는 유전자들과의 관련성도 연구되었다.^{32,33} 이는 자폐스펙트럼장애가 신경발달 장애로부터 기인한다는 사실을 고려해 볼 때, DLX6의 유전적 변이가 자폐스펙트럼장애 발병 기전에 관여할 수 있음을 암시한다고 볼 수 있다.

또한, 자폐스펙트럼장애환자의 20%에서 거뇌증(megalencephaly)이 있으며, 그 원인으로 DLX6 유전자가 의심되는 연구결과³⁴가 있다. 이러한 DLX6에 생물학적 기능과 7q21~22 영역의 연관성 연구로부터 DLX6는 자폐스펙트럼장애와 연관된 후보유전자라 생각 할 수 있다. 이러한 DLX6에 생물학적 기능과 7q21~22영역의 연관성에 대한 보고를 고려해 볼 때, DLX6의 유전적 변이는 자폐스펙트럼장애와 연관되어 있음을 알 수 있다.

본 실험에서 연구된 3개의 단일염기다형성은 DLX6의 유전자 발현과 생물학적 기능에 영향력을 고려하여 전사조절 부위로부터 2개, 그리고 mRNA의 안정성에 영향을 주는 3'-UTR에서 1개의 단일염기다형성을 선정하였다. 이들 단일염기다형성의 유전자형들로부터 자폐스펙트럼장애와의 유의

성 있는 연관성은 없었다. 그러나, 기존의 다른 인종에서 DLX6 유전자와 자폐스펙트럼장애와의 유의성 있는 연관성의 보고들을 고려해 볼 때, 한국인 남성에서는 DLX6 유전자의 다형성은 자폐스펙트럼장애와 연관성이 없다는 것을 알 수 있고, 이는 집단 유전학 관점에서 하나의 중요한 실험적 보고자료가 될 것이다.

이번 연구에서 자폐스펙트럼장애와 DLX6 유전자의 단일염기다형성간 연관성을 찾을 수 없었던 원인으로서는 다음과 같은 가능성을 생각할 수 있다. 본 연구에서 선정하여 연구한 3개 단일염기다형성 외에 DLX6 유전자의 다른 단일염기다형성이 연관되어 있을 가능성이 있다. 또한 7q21~22 영역의 DLX6 유전자 이외의 다른 유전자가 자폐와 연관되어 있을 수 있다. 이는 두 유전자의 단일염기다형성에서 반수체형(haplotype) 분석을 통한 분석이 필요하다. 위 문제점들을 극복하기 위해서는 최근 많이 연구되고 있는 whole-genome genotyping(WGG)을 통한 자폐스펙트럼장애와의 연관성을 조사하여 얻어진 후보 유전자 및 단일염기다형성을 연구하는 것이다. 기존에 전유전체조사는 가족기반연관성 연구(family based linkage study)를 통하여 보고 되었다. WGG는 polygenic disease에서 가족기반연관성연구의 조밀하지 못한 마커와 낮은 연관성에 단점^{35,36}을 조밀한 단일염기다형성 마커와 LD를 통하여 극복할 수 있는 방법이라 할 수 있다.^{35,36} 또한, 최근에는 DLX6 유전자의 genomic imprinting과 관련된 연구가 보고^{33,37}된바 있다. 이는 CpG site의 methylation study 연구를 자폐스펙트럼장애 환자화 대조군을 대상으로 연구하는 방법이 필요함을 시사한다.

결론

결론적으로 본 연구에서 자폐스펙트럼장애와 DLX6 유전

자간의 연관성을 찾을 수 없었다. 자폐장애는 complex disease로써 다양한 유전자가 연관성이 상호작용하여 연관되었다고 보고 있으며, 아직 정확한 원인 유전자들은 밝혀지지 않았다. 따라서 새로운 자폐 후보 유전자 연구를 통하여 자폐스펙트럼장애와의 연관성이 요구되며 정확한 후보유전자가 요구된다. 기존에 보고된 위치적인 후보 유전자들에 대해서 자세한 유의성 분석과 DLX6의 다른 단일염기다형성과 자폐스펙트럼장애의 발병에 대한 연구가 필요하다.

중심 단어 : 자폐스펙트럼장애 · ASD · DLX6 · 단일염기다형성.

References

- 1) Gillberg C, Wing L. Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatr Scand* 1999;99:399-406.
- 2) Fombonne E. The epidemiology of autism: a review. *Psychol Med* 1999;29:769-786.
- 3) Kaminsky Z, Wang SC, Petronis A. Complex disease, gender and epigenetics. *Ann Med* 2006;38:530-544.
- 4) Folstein S, Rutter M. Genetic influences and infantile autism. *Nature* 1977;265:726-728.
- 5) Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 1977;18:297-321.
- 6) Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 1995;25:63-77.
- 7) Pickles A, Bolton P, Macdonald H, Bailey A, Le Couteur A, Sim CH, et al. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. *Am J Hum Genet* 1995;57:717-726.
- 8) Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 1999;65:493-507.
- 9) Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001;2:943-955.
- 10) IMGSAC. Further characterization of the autism susceptibility locus AUTS1 on chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 2001;10:973-982.
- 11) Huthcheson HB, Bradford Y, Folstein SE, Gardiner MB, Santangelo SL, Sutcliffe JS, et al. Defining the autism minimum candidate gene region on chromosome 7. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;117B:90-96.
- 12) Maestrini E, Paul A, Monaco AP, Bailey A. Identifying autism susceptibility genes. *Neuron* 2000;28:19-24.
- 13) Philippe A, Martinez M, Guilloud-Bataille M, Gillberg C, Rastam M, Sponheim E, et al. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Hum Mol Genet* 1999;8:805-812.
- 14) Ashley-Koch A, Wolpert CM, Menold MM, Zaceem L, Basu S, Donnelly SL, et al. Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7. *Genomics* 1999;61:227-236.
- 15) Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, et al. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 1997;185:165-184.
- 16) Bulfone A, Kim HJ, Puelles L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL. The mouse Dlx-2 (Tes-1) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in mid-gestation mouse embryos. *Mech Dev* 1993;40:129-140.
- 17) Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, et al. Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* 1999;126:3831-3846.
- 18) Liu JK, Ghattas I, Liu S, Chen S, Rubenstein JL. Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev Dyn* 1997;210:498-512.
- 19) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association Press;1994.
- 20) Chlebowski C, Green JA, Barton ML, Fein D. Using the Childhood Autism Rating Scale to Diagnose Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. In Press;2010.
- 21) Grabe N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2002;2:S1-S15.
- 22) Fan JB, Oliphant A, Shen R, Kermani BG, Garcia F, Gunderson KL, et al. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003;68:69-78.
- 23) Shen R, Fan JB, Campbell D, Chang W, Chen J, Doucet D, et al. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat Res* 2005;573:70-82.
- 24) Hedrick PW. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* 1987;117:331-341.
- 25) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225-2229.
- 26) Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.
- 27) Jung HY, Park JS, Park YJ, Kim YJ, Kim K, Koh I. HapAnalyzer: Minimum Haplotype Analysis System for Association Studies. *Genomics Inform* 2004;2:107-109.
- 28) Nabi R, Zhong H, Serajee FJ, Huq AH. No association between single nucleotide polymorphisms in DLX6 and Piccolo genes at 7q21-q22 and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;119:98-101.
- 29) Hamilton SP, Woo JM, Carlson EJ, Ghanem N, Ekker M, Rubenstein JL. Analysis of four DLX homeobox genes in au-

- tistic probands. *BMC Genetics* 2005;6:52.
- 30) Merlo GR, Zerega B, Palcari L, Trombino S, Mantero S, Levi G. Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol* 2000;44:619-626.
- 31) Simeone A, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Gulisano M, et al. Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2250-2254.
- 32) Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, et al. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 2007;27:6878-6891.
- 33) Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* 2005;37:31-40.
- 34) Davidovitch M, Patterson B, Gartside P. Head circumference measurements in children with autism. *J Child Neurology* 1996; 11:389-393.
- 35) Altmuller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 2001;69:936-950.
- 36) Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Reviews* 2005;6:95-108.
- 37) Schule B, Li HH, Fisch-Kohl C, Purmann C, Francke U. DLX5 and DLX6 expression is biallelic and not modulated by MeCP2 deficiency. *Am J Hum Genet* 2007;81:492-506.