

Otistik spektrum bozukluklarında *SLC6A4* geni ekspresyonunun araştırılması

Investigation of SLC6A4 gene expression in autism spectrum disorders

Elif Funda Şener^{1,2}, Keziban Korkmaz^{2,3}, Didem Behice Öztöp⁴, Gökmen Zararsız⁵, Yusuf Özkul³

ÖZET

Amaç: Otizm kompleks bir nörogelişimsel bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Hastalık etiolojisinde genetik bir taban olduğu bilinmektedir. Serotonin ve otizm arasında bir ilişki olduğu daha önce yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. *SLC6A4* geni (SERT veya 5-HTT) serotoninin geri alımında önemli bir role sahiptir. Bu özelliğinden dolayı bu çalışmada otizm hastalarında *SLC6A4* geninin ekspresyon düzeyi araştırılmıştır.

Yöntemler: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na ilk kez başvurup, yapılan değerlendirme sonrası DSM-V kriterlerine göre otistik spektrum bozukluğu (OSB) tanısı alan 34 hasta (26 erkek, 8 kız) ve sağlıklı 23 kontrol (16 erkek, 7 kız) çalışmaya dahil edilmiştir. Gruplardan alınan periferik kan örneklerinden TRIzol yardımıyla RNA izolasyonu yapılmıştır. *SLC6A4* geni ekspresyonu Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile belirlenmiştir.

Bulgular: *SLC6A4* geni ekspresyonunun hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde daha düşük olduğu bulundu ($p=0,027$).

Sonuç: Hasta grubunda ekspresyonun düşük olması serotoninin geri alınımında bir bozukluk olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen bu sonuçlarımıza göre genin ekspresyonunun aynı hasta grubunda genişletilerek çalışılması, özellikle genin metilasyon durumu ve genin ekspresyonunu etkileyen polimorfizmlerin de birlikte araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Otizm, ekspresyon, *SLC6A4*, gen, serotonin

GİRİŞ

Otizm, otistik spektrum bozuklukları (OSB) içerisinde yer alan, klinik ve genetik heterojenite gösteren kompleks bir nörogelişimsel bozukluk olarak

ABSTRACT

Objective: Autism is defined as a complex neurodevelopmental disorder. Genetics plays a major role in the etiology of autism spectrum disorders (ASD). The role of the serotonin in the development of autism has been widely investigated. *SLC6A4* gene (SERT or 5-HT) has an important role reuptaking of serotonin. Because of this, our study examined the expression level of *SLC6A4* gene in autism patients.

Methods: Thirty-four patients (26 male, 8 female) who diagnosed as autism firstly according to DSM-V criteria in the Department of child psychiatry, Erciyes University Medical Faculty and healthy 23 controls (16 male, 7 female) were enrolled in this study. Total RNA was isolated from peripheral blood samples using TRIzol. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed to detect *SLC6A4* gene expression.

Results: *SLC6A4* gene expression was found statistically significant and low in autism group compared with controls ($p=0,027$).

Conclusion: The low gene expression in the patient group implied that there is an abnormality of serotonin reuptake. According to our results, we suggest that much more studies may be planned with the expression and methylation profile of this gene combined with gene polymorphisms especially affecting the expression in larger sample sizes. *J Clin Exp Invest* 2015; 6 (2): 165-169

Key words: Autism, Expression, Gene, Serotonin, *SLC6A4*

tanımlanmaktadır [1-3]. Bugün için hastalık tanısı Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Mayıs 2013'te tanı kriterlerini genişlettiği DSM-V'e (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition) göre konmaktadır [4]. Hastalık etiolojisinde genetik bir

¹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kayseri, Türkiye

³ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Kayseri, Türkiye

⁴ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Psikiyatri AD, Kayseri, Türkiye

⁵ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik AD, Kayseri, Türkiye

Correspondence: Elif Funda Şener,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD 38039 Kayseri, Türkiye Email: efefunda@yahoo.com

Received: 18.05.2015, Accepted: 22.06.2015

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2015, All rights reserved

taban olduğu bilinmesine rağmen yapılan tüm çalışmalar hastalık patogenezi aydınlatmada yetersiz kalmıştır [5,6]. Otizmi anlamak adına yapılan genetik çalışmalar spesifik genlerdeki riskli varyantları tanımlayarak etiyojide rol oynayan biyolojik mekanizmaları aydınlatmaya yöneliktir. Bu anlamda özellikle son 10-15 yılda otizmin aydınlatılması için yapılan araştırmaların sayısında ciddi anlamda artışlar vardır [7]. Yapılan genetik çalışmalar ile 1000'den fazla genetik lokusun bu bozuklukta rol oynadığı ortaya konmuştur [7-10]. Özellikle aday gen çalışmalarına göre başta *NRXN1*, *SHANK3*, *NLGN3*, *NLGN4*, *MeCP2*, *EN2*, *CNTNAP2*, *OXR*, *RELN*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3* olmak üzere yüzlerce gen otizmden sorumlu tutulmaktadır [11-12]. Tüm bu çabalara rağmen bugüne kadar vakaların çok az bir kısmından sorumlu olan varyasyonlar belirlenebilmiştir.

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) merkezi ve periferik sinir sisteminde önemli rol oynayan bir nörotransmitterdir. Otizmin de içinde bulunduğu bir grup psikiyatrik hastalıkların temelinde serotonin metabolizmasındaki değişimlerin etkisi vardır. Serotonin ve otizm arasında ilişkinin olduğu daha önce yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir [13-15]. Serotoninin bu kadar önemli olmasının çeşitli nedenleri vardır. İlk olarak, serotonin bir nörotransmitter olarak merkezi sinir sisteminin gelişimini regüle ederek davranış ve çeşitli fizyolojik süreçlerle (anksiyete, sosyal davranışlar ve agresyon) ilişkilendirilmiştir [16]. Özellikle yüksek serotonin seviyesi (hiperserotonemi) otizm bulgularından birisi olarak kabul edilmektedir [17-19]. Serotonin transporter (*SLC6A4*, Solute Carrier Family 6 Member 4) geni 17q11.1-q12'ye haritalanmıştır. *SLC6A4* geni (SERT veya 5-HTT olarak da bilinmektedir) 31 kb uzunluğunda ve 14 ekzon içermektedir. Serotonin beyin sinapslarına salındıktan sonra, *SLC6A4* tarafından düzenlenerek hem serotonerjik sinir ucundan hem de plateletlerden geri alındığı çok iyi bilinmektedir [15,20,21]. Bir diğer neden de serotonin inhibitörleri ile otizm hastalarında görülen bazı semptomların düzeltilebilmesidir [19].

Özellikle OSB ile yapılan aday gen ilişki çalışmalarında *SLC6A4* geni önemli bir gen olarak kabul edilmektedir. Literatürde bu genin polimorfizmleri OSB'de çalışılmış ve bu gen otizm için aday genlerden biri olarak kabul edilmiştir [16,18,22]. Cook ve diğerleri yaptıkları çalışmada *SLC6A4* geninin promotör bölgesindeki VNTR polimorfizminin kısa allelinin aileden otistik çocuklarına geçişini göstermişlerdir [23]. Bu polimorfizmdeki kısa veya uzun alleli taşıma, genin fonksiyonunu etkilemektedir [19].

Literatüre bakıldığında serotonin ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır, bu çalışmalar çoğunlukla polimorfizm ve kan serotonin seviyesinin belirlenmesine yönelik olarak yapılmıştır. Dolayısıyla serotonin alımını düzenleyen *SLC6A4* geninin de otizmde rolü olabileceği düşünülebilir. Ancak OSB grubunda bu genin ekspresyonuna ait çalışma bulunmamaktadır. Yukarıda açıklanan özelliklerden dolayı bu çalışmada, *SLC6A4* geni ekspresyonunun otizm hastalarındaki düzeyini araştırmayı amaçladık.

YÖNTEMLER

Hastaların seçimi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda konuşma, sosyal ve iletişimde gecikme şikâyeti ile ilk kez başvurup, çalışmaya Ocak 2014-Şubat 2015 tarihleri arasında 1 araştırma görevlisi ve 1 çocuk psikiyatri uzmanı tarafından DSM-V kriterlerine göre yapılan klinik görüşme ve psikiyatrik değerlendirme sonucunda "otistik spektrum bozukluğu-ağır şiddet tanısı alan" 34 hasta çocuk (26 erkek, 8 kız) alınmıştır. Kronik bir tıbbi, psikiyatrik veya genetik hastalığı olmayan ve psikiyatrik ilaç tedavisi almayan sağlıklı 23 kontrol (16 erkek, 7 kız) çalışmaya dahil edilmiştir. Erciyes Üniversitesi'nden etik kurul onayı ve ailelerden gerekli onamlar alınmıştır. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) tanıları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi-Şimdi ve Yaşam Boyu Şekli uygulandı. Mental retardasyon (MR) tanısı 1 çocuk psikiyatri uzmanı ve 1 çocuk nöroloji uzmanı tarafından psikiyatrik ve nörolojik muayene ve psikometrik değerlendirme (Ankara Gelişim Tarama Envanteri) sonucunda konuldu. Epilepsi tanısı ise çocuk nöroloji uzmanı tarafından kondu.

RNA İzolasyonu ve gen ekspresyon çalışmaları

Genetik çalışmalar Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde yapılmıştır. Gruplardan alınan 2 ml periferik kan örneklerinden (TRIZOL, Roche, Almanya) RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA'nın kalitesi ve miktarı BioSpec-Nano Spektrometre ile ölçülmüştür. RT² HT First Strand (Qiagen) kit ile RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir. Komplementer DNA sentezi yapılırken 42°C 15 dk ve 95°C 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. *SLC6A4* geni ekspresyonu Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile belirlenmiştir. Ekspresyon çalışması için RotorGene (Qiagen) cihazı kullanılmıştır. Ekspresyon çalışması yapılırken 95°C 10 dk ve 40 döngü boyunca 95°C 15 sn, 60°C 60 sn inkübe edilmiştir.

Her bir örnek çift çalışılmış ve house keeping gen olarak beta-aktin seçilmiştir. Beta-aktin ile normalize edilen örneklerin rölatif kantifikasyonu için delta delta Ct metodu uygulanmıştır.

İstatistiksel analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenitesi Levene test ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar, nicel veriler için bağımsız iki örneklem t testi, Mann-Whitney U testi ve Pearson ki kare analizi ile yapıldı. Veriler ortalama ve standart sapma, ortanca (25.-75. yüzdeler) ve frekans ile yüzdeleri olarak ifade edildi. Odds oranları %95 güven aralığı ile verildi. Verilerin analizi R 3.2.0 (www.r-project.org) programı ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

34 hasta (26 erkek, 8 kız) ve sağlıklı 23 kontrol (16 erkek, 7 kız) bu çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması (yıl) $4,38 \pm 2,05$ ve kontrol grubunun ise $5,61 \pm 1,95$ olarak bulunmuştur. Grup-

lar arasında cinsiyetler açısından bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,561$). Hasta grubunun klinik özellikleri incelendiğinde otizm dışında 11 hastada MR, 5 hastada dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB), 2 hastada da epilepsi bulguları tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Hastaların klinik özelliklerinin özetlenmesi

| Bulgular | Hasta (n=34) |
|----------------------|-----------------|
| Cinsiyet (Erkek/Kız) | 26/8 |
| Yaş | $4,38 \pm 2,05$ |
| MR | 11 |
| DEHB | 5 |
| Epilepsi | 2 |

MR: mental retardasyon, DEHB: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan SLC6A4 geni ekspresyonu hasta grubunda düşük olarak tespit edilmiştir ($p=0,027$) (Tablo 2). Hasta profilinde alt gruplar bulunmadığı için başka karşılaştırmalar yapılmamıştır.

Tablo 2. SLC6A4 gen ekspresyonunun gruplar arasındaki dağılımının gösterilmesi

| | Kontrol (n=23) n (%) | Otizm (n=34) n (%) | p değeri | OR (95% CI) |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------|------------------|
| Cinsiyet | | | | |
| Kız | 7 (30,4) | 8 (23,5) | 0,561 | 1,42 (0,43-4,68) |
| Erkek | 16 (69,6) | 26 (76,5) | | |
| SLC6A4 ekspresyonu | 0,41(0,29-0,72) | 0,31 (0,18-0,45) | 0,027 | 0,11 (0,01-0,95) |

Değerler n (%),ortanca (25.-75. yüzdeler) olarak ifade edilmiştir

TARTIŞMA

Otizm yaşamın ilk 3 yılında ortaya çıkan, hastalığa eşlik eden klinik bulgular nedeniyle kişinin toplumla ilişkisini hemen hemen tamamen yok eden bir bozukluktur [12,24]. Otizm araştırmalarında ilk olarak ilişkilendirilen biyomarker yüksek serotonin seviyesidir [3,25-28]. Bugüne kadar serotonin transporter geni ile yapılan ilişkilendirme çalışmalarından da çelişkili sonuçlar alınmıştır. SLC6A4 geni promotöründe tanımlanan delesyon/insersiyon polimorfizminin (5-HTTLPR) ve intron 2 VNTR polimorfizminin psikiyatrik bozuklukların etiolojisinde rol oynadığı bildirilmektedir [16,18,22,29]. Özellikle bu 2 polimorfizm bu genin transkripsiyonu ve fonksiyonunu etkilemektedir [30]. Bazı çalışmalarda bu genin polimorfizmleri ile otizm arasında korelasyon bulunurken, diğerlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir

[3,19,31]. Bugüne kadar yapılan büyük çaplı ilişki çalışmalarından Devlin ve arkadaşları 5-HTTLPR ve intron 2 VNTR polimorfizmlerini 390 ailede (1528 birey) araştırmıştır. 5-HTTLPR'nin kısa allelinin daha çok kalıtıldığı gösterilmiştir [19]. 352 ailenin dahil edildiği SLC6A4 genine ait 9 polimorfizmin araştırıldığı bir diğer büyük çalışmada ise anlamlı sonuçlar elde edilememiştir [32]. Tordjman ve arkadaşları ise 5-HTTLPR promotör polimorfizminin otizm riskini etkilemesinden çok özellikle kısa veya uzun alleli taşıyıp taşıyımama durumuna göre sosyal ve iletişimsel davranış fenotipini değiştirdiğini öne sürmüşlerdir [21].

Her ne kadar polimorfizm ve kan serotonin seviyelerinin belirlenmesine yönelik birçok araştırma olsa da [20,26-30] serotoninin düzenleyicisi olan SLC6A4 geninin ekspresyonun otizmdeki düzeyi

ile ilgili bir yayına rastlanamamıştır. Bizim çalışmada gruplar arasında SLC6A4 geni ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Hasta grubunda ekspresyonun daha düşük olarak tespit edilmesi serotoninin geri alınımında eksiklik olduğunu düşündürmektedir. Selektif serotonin reuptake inhibitörleri (SSRI) sıklıkla OSB grubunda bazı semptomları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmaya dahil edilen hastalar ilk kez OSB tanısı alanlardan oluştuğu için kan örnekleri alındığı sırada ilaç kullanımına başlanmamıştır. Bu açıdan bakıldığında SSRI kullanımını sonuçlarımızı etkilememektedir ve çalışmamız bu yönüyle de özgündür. Ancak hastalarda serotonin düzeyleri ölçülmemiştir. Bu nedenle özellikle aynı hasta grubunda serotonin seviyelerinin de belirlenmesi gerektiği açıktır. Ayrıca hafif ve orta düzeyde OSB tanısı alanlarla ağır olan hastaların da dahil edilerek farklı karşılaştırmaların yapılması da literatüre yeni katkılar sağlayabilir.

Sonuç olarak, verilerimize göre SLC6A4 geninin ekspresyonunun aynı hasta grubunda genişletilerek çalışılması, özellikle genin metilasyon durumunun ve genin ekspresyonunu etkileyen polimorfizmlerin de birlikte araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Serotonin metabolizması ile ilgili bilinenlerin ve ilerleyen dönemde bu alanda yapılacak yeni araştırmalarla da elde edilecek bulgular ile otizm patogenezinin katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Ek olarak, gelecekteki otizm genetiği çalışmalarında davranışlar ile ilgili major lokusların dikkatli incelenerek olası katkılarının değerlendirilmesi de bu alanda yeni görüşler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Voineagu I. Gene expression studies in autism: Moving from the genome to the transcriptome and beyond. *Neurobiol Dis* 2012;45:69-75.
- Eapen V. Genetic basis of autism: is there a way forward? *Curr Opin Psychiatry* 2011;24:226-236.
- Gabriele S, Sacco R, Persico AM. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24:919-929.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Washington, 5th edition, 2013.
- Sener EF, Oztop D, Ozkul Y. MTHFR Gene C677T Polymorphism in autism spectrum disorders. *Genet Res Int* 2014;2014:698574.
- Butler MG, Rafi SK, Hossain W, et al. Whole Exome Sequencing in Females with Autism Implicates Novel and Candidate Genes. *Int J Mol Sci* 2015;16:1312-1335.
- Sener EF. Association of Copy Number Variations In Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. *Chinese Journal of Biology* 2014, doi: org/10.1155/2014/713109.
- Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, et al. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2013;93:607-619.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 2012;485:242-245.
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 2012;74:285-299.
- Goldani AA, Downs SR, Widjaja F, et al. Biomarkers in autism. *Front Psychiatry* 2014;5:100.
- Şener EF, Özkul Y. Otizmin Genetik Temelleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2013;22:86-92.
- Guhathakurta S, Ghosh S, Sinha S, et al. Serotonin transporter promoter variants: Analysis in Indian autistic and control population. *Brain Res* 2006;1092:28-35.
- Jaiswal P, Guhathakurta S, Singh AS, et al. SLC6A4 markers modulate platelet 5-HT level and specific behaviors of autism: a study from an Indian population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 56:196-206.
- Whyte A, Jessen T, Varney S, Carneiro AM. Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain. *Neurochem Int* 2014;73:122-126.
- Huang CH, Santangelo SL. Autism and Serotonin Transporter Gene Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:903-913.
- Longo D, Schüler-Faccini L, Brandalize AP, et al. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Res* 2009;1267:9-17.
- Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, et al. Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Dev* 2006;28:257-260.
- Devlin B, Cook EH Jr, Coon H, et al. Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. *Mol Psychiatry* 2005;10:1110-1116.
- Peralta-Leal V, Leal-Ugarte E, Meza-Espinoza JP, et al. Association of a serotonin transporter gene (SLC6A4) 5-HTTLPR polymorphism with body mass index categories but not type 2 diabetes mellitus in Mexicans. *Genet Mol Biol* 2012;35:589-93.
- Tordjman S, Gutknecht L, Carlier M, et al. Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. *Mol Psychiatry* 2001;6:434-439.
- Conroy J, Meally E, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M, Gallagher L. Serotonin transporter gene and autism: a

- haplotype analysis in an Irish autistic population. *Mol Psychiatry* 2004;9:587-593.
23. Cook EH, Courchesne R, Lord C, et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* 1997;2:247-250.
 24. Chung BH, Tao VQ, Tso WW. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formos Med Assoc* 2014;113:400-408.
 25. Ruggeri B, Sarkans U, Schumann G, Persico AM. Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. *Psychopharmacology (Berl)* 2014;231:1201-1216.
 26. Coutinho AM, Oliveira G, Morgadinho T, et al. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol Psychiatry* 2004;9:264-271.
 27. Connors SL, Matteson KJ, Sega GA et al. Plasma serotonin in autism. *Pediatr Neurol* 2006; 35:182-186.
 28. Anderson GM, Hertzog ME, McBride PA. Brief report: Platelet-poor plasma serotonin in autism. *J Autism Dev Disord* 2012;42:1510-1514.
 29. Longo D, Schüler-Faccini L, Brandalize AP, et al. Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Res* 2009;1267:9-17.
 30. Bradley SL, Dodelzon K, Sandhu HK, Philibert RA. Relationship of serotonin transporter gene polymorphisms and haplotypes to mRNA transcription. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;136B:58-61.
 31. Wu S, Guo Y, Jia M, et al. Lack of evidence for association between the serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and autism in the Chinese trios. *Neurosci Lett* 2005;381:1-5.
 32. Ramoz N, Reichert JG, Corwin TE, et al. Lack of evidence for association of the serotonin transporter gene SLC6A4 with autism. *Biol Psychiatry* 2006;60:186-191.