Epidemiologiczna i molekularna zależność pomiędzy produkcją szczepionek a występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Theresa A. Deisher, Ph.D.; Ngoc V. Doan, B.S.;** Kumiko Koyama, B.S.;*** Sarah Bwabye, B.S.*****

Tłumaczenie na język polski: Zespół tłumaczy STOP NOP

STRESZCZENIE:

Cele: Ocena skutków szczepionek wyprodukowanych z użyciem linii komórkowych płodu, zawierających szczątkowe fragmenty ludzkiego DNA, w obszarze zdrowia publicznego, z wykorzystaniem metod laboratoryjnych i ekologicznych, w tym statystyk, biologii molekularnej i genomiki.

* Prezes i główny naukowiec. Dr Deisher opracowała i zaprojektowała badanie, nadzorowała gromadzenie wszystkich danych oraz ich wyników, sporządziła pierwotny manuskrypt, zweryfikowała i zatwierdziła ostateczny przedłożony manuskrypt. Przynależność: Sound Choice Pharmaceutical Institute, 1749 Dexter Ave N, Seattle, WA 98109. Adres do korespondencji: Theresa Deisher, tdeisher@soundchoice.org, 206-906-9922, 1749 Dexter Ave N, Seattle, WA 98109.

Oświadczenie dotyczące etyki: Wszystkie dane użyte w tym manuskrypcie pochodziły z publicznych plików danych i dlatego nie podlegają zatwierdzeniu przez Komisję Bioetyczną (IRB - Institutional Review Board) zgodnie z zaleceniami Krajowego Komitetu Doradczego ds. Ochrony Badań na ludziach (NHRPAC) w zakresie zbiorów danych publicznych, zatwierdzonych na posiedzeniu Komisji w dniach 28-29 stycznia 2002 roku. (http://www.hhs.gov/ohrp/archive/nhrpac/documents/dataltr.pdf): "Odpowiedzialność użytkowników danych publicznych: użytkownicy plików danych publicznych nie muszą uzyskiwać zgody Komisji Bioetycznej IRB na korzystanie z takich plików lub dążyć do określenia czy korzystanie z publicznych plików danych spełnia kryteria zwolnienia z weryfikacji przez Komisję Bioetyczną IRB. "

Deklaracja przejrzystości: Główny autor oświadcza, że ten manuskrypt jest rzetelnym, dokładnym i przejrzystym opisem zgłoszonego badania; że nie pominięto ważnych aspektów badania oraz że wyjaśniono wszelkie rozbieżności w badaniu zgodnie z planem.

Wszyscy autorzy, zewnętrzni i wewnętrzni, mieli pełny dostęp do wszystkich danych (w tym raportów statystycznych i tabel)

w badaniu i mogą wziąć odpowiedzialność za integralność danych i dokładność analizy danych.

Źródła finansowania: badanie zostało sfinansowane przez M.J. Murdock Charitable Trust oraz prywatne darowizny.

** Pracownik naukowy. Pani Doan zbierała i analizowała dane; obsługiwała narzędzia analizy danych, recenzowała i zatwierdziła ostatecznie przedłożony manuskrypt.

*** Pracownik naukowy. Pani Koyama koordynowała i zaprojektowała eksperyment, recenzowała i zatwierdziła ostatecznie przedłożony manuskrypt.

**** Pracownik naukowy. Pani Bwabye pomagała w zbieraniu i przeglądzie danych i zatwierdziła ostatecznie przedłożony manuskrypt.

Metody: Dane liczbowe dotyczące stopnia zaszczepienia MMR i autyzmu lub zaburzeń ze spektrum autyzmu dla Norwegii, Szwecji oraz Wielkiej Brytanii, zostały pozyskane z publicznych i rządowych stron internetowych, a także opublikowanych i zrecenzowanych artykułów naukowych. Z biologicznego punktu widzenia wielkość i ilość zanieczyszczenia fragmentami DNA płodu w Merusax® II i Havrix®, jak również skłonność różnych linii komórkowych do absorpcji komórkowej i jądrowej pierwotnych ludzkich fragmentów DNA, została zmierzona i określona ilościowo za pomocą elektroforezy żelowej, mikroskopii fluorescencyjnej i fluorymetrii. Na koniec, analiza genomowa zidentyfikowała konkretne miejsca, gdzie integracja fragmentów ludzkiego DNA z genomem dziecka ma największe prawdopodobieństwo wystąpienia.

Wyniki: Średni stopień zaszczepienia MMR dla tych trzech krajów, spadł poniżej 90% po słynnej publikacji dr. Wakefielda z 1998 roku. Po 2001 roku zaczął on powoli wzrastać, osiągając ponownie poziom powyżej 90% w 2004 r. W tym samym okresie średnia częstość występowania zaburzeń ze spektrum autyzmu w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji znacznie spadła po 1998 roku, a następnie ponownie stopniowo wzrastała po 2000 roku. Średnie występowanie jednoniciowego DNA i dwuniciowego DNA w Meruvax®II wynosiło odpowiednio 142,05 ng / fiolkę i 35,00 ng / fiolkę oraz odpowiednio 276,00 ng / fiolkę i 35,74 ng / fiolkę w Havrix®. Rozmiar fragmentów DNA płodu w Merusax® II wynosił około 215 par. Występowała spontaniczna absorpcja komórkowa i jądrowa DNA w komórkach HFF1 i NCCIT. Geny, które zostały powiązane z autyzmem (geny związane z autyzmem, AAG) mają bardziej skoncentrowaną podatność na urazy stabilności genomu w porównaniu z grupą wszystkich genów zawartych w ludzkim genomie. 15 z 19 genów chromosomu X należących do AAGs, ma motywy z przerwami dwuniciowymi w odległości mniejszej niż 100 kilozasad od centrum mejotycznego punktu rekombinacji znajdującego się w eksonie.

Wniosek: Szczepionki wytwarzane z użyciem ludzkich linii komórkowych,

pochodzących od płodu, zawierają niedopuszczalnie wysoki poziom zanieczyszczenia fragmentami ludzkiego DNA. Ludzki genom naturalnie zawiera obszary, które są podatne na tworzenie przerwy dwuniciowej i mutagenezę insercyjną DNA. Tzw. "Wakefield Scare", czyli popłoch wywołany przez sprawę dr Wakefilda, stworzył naturalny eksperyment, który może wykazać związek przyczynowo-skutkowy między produkowanymi szczepionkami linii komórkowej płodu a występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD).

Słowa kluczowe: autyzm, szczepionka, hotspoty rekombinacji mejotycznej, absorpcja DNA, płodowe linie komórkowe

---

Ogólnoświatowa epidemia autyzmu jest zasobnie stwierdzona poprzez liczbę recenzowanych artykułów naukowych na ten temat, zawierających obserwacje z wielu instytucji, że nowe insercje genetyczne i mutacje nadmiernie występują u dzieci z autyzmem[1].

Autyzm (AD), będący podkategorią zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD), jest zaburzeniem neurologicznym i rozwojowym, którego objawy zwykle pojawiają się w ciągu pierwszych trzech lat życia.[2] Jak wiadomo, epidemia autyzmu stanowi poważne obciążenie dla zdrowia publicznego i wymaga krytycznej oceny czynników środowiskowych, które mogą tę epidemię wywoływać.

Poprzednia publikacja naszej grupy skupiała się na pomijanych a powszechnie wprowadzonych czynnikach środowiskowych, wliczając zanieczyszczenia szczepionek wieku dziecięcego fragmentami ludzkich płodów i retrowirusów, zaawansowany wiek ojcowski oraz zmiany w kryteriach diagnostycznych. Jak wymaga amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA), odkrycie potencjalnych czynników środowiskowych wyzwalających autyzm, wymaga statystycznej oceny, aby zidentyfikować punkty powodujące powstawanie zmian w występowaniu zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Iteracyjne algorytmy dopasowania wychwyciły okresy 1980.8, 1988.4 i 1996.5 jako “lata-punkty zwrotne" dla występowania autyzmu w Stanach Zjednoczonych[3], w uzasadnieniu raportu Agencji Ochrony Środowiska (EPA), który wskazał rok 1988 jako przełomowy w autyzmie na całym świecie.[4] Ponadto, zmiany roku urodzenia dla autyzmu w Wielkiej Brytanii, Australii Zachodniej i Danii obliczono odpowiednio na lata 1987, 1990.4 i 1987.5[3]. Te statystycznie obliczone punkty zwrotne autyzmu nie odpowiadają punktom zmian, które byłyby przewidywane na podstawie aktualizacji harmonogramów do podręcznika diagnostycznego i statystycznego (DSM), a zatem aktualizacje DSM nie mogą być głównym środowiskowym lub socjologicznym czynnikiem, odpowiedzialnym za obecne występowanie autyzmu.

Zaawansowany wiek ojcowski jest obecnie preferowanym wytłumaczeniem światowej epidemii autyzmu. Jednak analiza regresji liniowej dla danych z USA i Australii Zachodniej, nie wykazała związku między wiekiem ojcowskim a autyzmem, dla żadnego konkretnego roku urodzenia.[3] W Wielkiej Brytanii i niektórych krajach skandynawskich zauważalne jest znaczące zmniejszenie stopnia zaszczepienia MMR w wyraźnych latach, hipotetycznie wywołane przez popłoch po publikacji Andrew Wakefielda z 1998 roku[5], która sugerowała, że szczepionka MMR i regresja autystyczna były ze sobą powiązane, ale wyraźnie nie wynikające z brak zgłoszenia szczepień.[6-8] Ponieważ w poprzednim badaniu wykryliśmy zależność między rozpowszechnieniem MMR a występowaniem autyzmu/spektrum autyzmu, obserwacja,

że wyszczepialność MMR gwałtownie spadła w Wielkiej Brytanii i w krajach skandynawskich podczas wyraźnych lat rodzi pytanie, czy stopień zaszczepienia MMR miał wpływ na rozpowszechnienie autyzmu/spektrum autyzmu w tych krajach podczas tego samego okres czasu.

Wykorzystanie ludzkich linii komórkowych do produkcji szczepionek wieku dziecięcego, pozostawia resztkowy ludzkiego DNA, jak również ludzkie fragmenty endogennego retrowirusa K (HERVK) w końcowych produktach szczepionki, które wstrzykujemy naszym dzieciom. Komórki ssaków absorbują zewnątrzkomórkowe fragmenty DNA tego samego gatunku poprzez endocytozę za pośrednictwem receptora. Absorpcja jest najbardziej skuteczna przy niskich stężeniach zewnątrzkomórkowego DNA[9] i osiąga maksimum 2 godziny po dodaniu fragmentów DNA do hodowli komórkowej.[10] W zakresie stężenia pozakomórkowego od 0,1 do 7 μM, oligonukleotydy (małe cząsteczki kwasów nukleinowych) łatwo wchodzą do hodowanych komórek poprzez absorpcję za pomocą receptora[11-13], osiągając stężenie wewnątrzkomórkowe i jądrowe[11],[14-16], które są równe lub przekraczają poziom pozakomórkowego medium w ciągu 2-4 godzin.[17]

Doświadczenia empiryczne wykazały, że dodanie fragmentów łożyskowego DNA o długości 500 par zasad przyczyniło się do około 4% zawartości genomowej komórki na godzinę inkubacji, w przybliżeniu 40-50% fragmentowanego DNA dodanego do kultury komórkowej zostanie pobrane przez komórkę i 10 -20% dodanego DNA zostanie dostarczone do jądra, co pokazuje szybkość, z jaką DNA może dostać się do komórki.[9],[18]. Obecne wytyczne FDA mówią, że poziom resztkowego DNA komórki-substratu powinien być mniejszy niż 10 ng na dawkę szczepionki przy medianie wielkości DNA równej 200 par zasad lub niższej.[19]

Indywidualna analiza genetyczna ASD wykazała setki różnych mutacji *de novo*, delecji i duplikacji obecnych w 48,4% do 63% przypadków autyzmu, w których tylko jedno dziecko z rodziny zostało dotknięte, zwane simpleks ASD.[20] Dane genomu, analizowane w większości publikacji na ten temat, pochodzą ze zbioru Simon's Simplex Collection (SSC), w której uwzględniono 73% eksomu. Dlatego ekstrapolując, na podstawie zgłoszonego odsetka dzieci ze szkodliwymi mutacjami, oczekuje się, że od 66% do 86% przypadków simplex ASD będzie mieć mutację de novo, jeśli cały eksom został zsekwencjonowany. Ponieważ 85% mutacji wywołujących chorobę występuje w eksomie, a 15% występuje w regionach regulatorowych, możemy zatem oszacować, że regiony regulatorowe także zostały zsekwencjonowane, 76% do 99% dzieci z simpleks ASD miałoby mutacje de novo.[21] Dzieci nie dotknięte chorobą oraz multipleksowe ASD, czyli mające wpływ na wiele dzieci w rodzinie, mają znacznie mniej mutacji de novo, jednak większość dzieci z ASD to przypadki simpleks (75% do 90%), [22],[23] demonstrujących istotną rolę mutacji genu de novo w światowej epidemii autyzmu. Innymi słowy, podatność na autyzm w przypadkach simpleks pochodzi ze źródła de novo, co wskazuje na wpływy środowiskowe jako główny czynnik ASD, aniżeli dziedziczenie.[24] W istocie, ostatnie publikacje pokazały, że wiele chorób u ludzi oprócz ASD wiąże się z translokacjami chromosomów de novo, megabase - sized deletions, wstawkami i duplikacjami DNA.[24] Chociaż ASD jest wysoce niejednorodne pod względem genów i mutacji, wykazano, że dotknięte nim geny współdziałają w obrębie kilku krytycznych sieci biologicznych, wyjaśniając wspólny fenotyp ASD pomimo różnych mutacji.[20],[25]

Jeszcze bardziej istotnym pytaniem jest: "Co powoduje powstanie setek różnorodnych mutacji de novo?" Podczas mejozy materiał genomowy jest wymieniany pomiędzy chromosomami pochodzącymi od matki

i od ojca, proces ten nazywa się rekombinacją mejotyczną (MR). Gorące punkty są miejscami w genomie o różnej długości, gdzie MR występuje najczęściej. Ten proces tworzy genetyczną różnorodność u naszego potomstwa i jest w tym sensie korzystny. Ludzki genom zawiera ponad 25 000 znanych gorących punktów rekombinacji.[26] Co ciekawe, wykazano, że regiony genomu, w których wystąpiła rekombinacja mejotyczna (gorące punkty) są wysoce predysponowane do kolejnych pęknięć dwuniciowych komórek somatycznych (DSB) i mutacji powodujących choroby, [27-29] w tym zmienność pojedynczego nukleotydu, zmienność liczby kopii, zdarzenia delecji genu oraz insercja / integracja obcego DNA podczas naprawy DSB.[30],[31]

Choroby, o których wiadomo, że podlegają wpływom delecji lub insercji genomowych obejmują raka, dziedziczną neuropatię, [32] zespoły mitochondrialne, [26] rybią łuskę, [26],[33] zespołu Nijmegena (NBS), [34] zaburzenia ze spektrum autyzmu, [24],[35] schizofrenię [36] i inne. W tym badaniu zapytaliśmy, czy gorące punkty MR, które predysponują do kolejnych mutacji somatycznych, są związane z mutacjami genów powiązanych z ASD.

W niniejszym opracowaniu dokonano oceny konsekwencji dla zdrowia publicznego szczepionek zanieczyszczonych resztkowymi ludzkimi fragmentami płodowymi DNA, wykorzystując metody laboratoryjne i ekologiczne, w tym statystyki, biologii molekularnej i genomiki. Korzystając z danych dostępnych na publicznych i rządowych stronach internetowych, prześledziliśmy wyszczepialność MMR i rozpowszechnienie występowania autyzmu (AD) / zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD) w Norwegii, Szwecji i Wielkiej Brytanii w celu ustalenia, czy zredukowane stosowanie MMR®II zgłoszone w latach 1999-2002, po tzw. "Wakefield Scare", wpłynęła na częstość występowania AD / ASD u dzieci urodzonych podczas tych lat. Przekazujemy tutaj również wielkość i ilość zanieczyszczenia fragmentami DNA w Meruvax®II i Havrix®, jak również skłonność różnych linii komórkowych do pobierania przez komórki i jądra prymitywnych ludzkich fragmentów DNA, podobnych pod względem wielkości i jakości do fragmentów DNA z Meruvax®II. Na koniec nasza analiza genomowa zidentyfikowała konkretne miejsca, w których najprawdopodobniej zajdzie integracja fragmentów DNA płodowego z genomem dziecka. Badanie to jest jednym z pierwszych przeprowadzonych badań laboratoryjnych i ekologicznych, które zbadały związek między ludzkimi komórkami płodowymi znajdującymi się w wyprodukowanych szczepionkach, uszkodzeniami DNA komórek i ogólnoświatową epidemią autyzmu.

Metodologia

Źródła danych dla wskaźników zaburzeń autystycznego spektrum i pokrycia szczepionką MMR

Krajowy zasięg MMR w Norwegii uzyskano z Norweskiego Instytutu Zdrowia Publicznego (Institute of Public Health), [37] dla Szwecji z Krajowej Rady Zdrowia i Opieki Społecznej (National Board of Health and Welfare) [38], a dla Wielkiej Brytanii z Public Health England (PHE), zasięg szczepionki [39] MMR określono jako procent maksymalnego zasięgu w każdym kraju.

Wskaźniki zaburzeń ze spektrum autyzmu dla Norwegii zebrano na podstawie danych z trzech artykułów: pierwszy to publikacja z 2012 roku autorstwa Isaksena [40] druga i trzecia to artykuły z 2012 i 2013 r., Oba autorstwa Suren [41], [42]. Dane o populacji norweskiej uzyskano z oficjalnej strony internetowej Centralnego Biura statystycznego Norwegii (Statistiska Centralbyran - Statistics Norway)

[43]. W Szwecji wskaźnik AD uzyskano z badania opublikowanego w 2012 r. "Rozpowszechnienie zaburzeń spektrum autyzmu u małych dzieci: badanie populacyjne 2-letnich dzieci szwedzkich" autorstwa Nygrena [44]. Dane o szwedzkiej populacji uzyskano z oficjalnej strony internetowej z Centralnego Biura Statystycznego Szwecji (Statistiska Centralbyran - Statistics Sweden) [45]. W Wielkiej Brytanii wskaźnik AD został zebrany z dwóch badań: pierwszej opublikowanej przez Lingam (2003) [46] i drugi przez Latif (2007) [47]. Dane dotyczące populacji w Wielkiej Brytanii uzyskano ze strony internetowej Urzędu Statystyk Krajowych (Office of National Statistics) [48].

Ujęcie ilościowe resztkowego DNA w Meruvax®II (szczepionka przeciw różyczce) i Havrix® (szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A)

Żywa szczepionka przeciwko wirusowi różyczki Meruvax®II (Merck & Co. Inc) rozpuszczono w 30 µl 1X Tris EDTA (TE, pH 8) i inkubowano w 60 ° C przez dwie godziny w celu inaktywacji żywego wirusa. Havrix® (GlaxoSmithKline Biologicals) w roztworze był również inaktywowany termicznie w temperaturze 60°C przez dwie godziny. Warto zauważyć, że wirus jednoniciowego RNA (ssRNA) w Meruvax®II jest hermetyzowany, a wirus ssRNA w Havrix® jest hermetyzowany po wniknięciu w ciało gospodarza [49], a zatem jest bardzo mało prawdopodobne, że będą występowały istotne ilości wolnego jednoniciowego wirusowego RNA w szczepionkach. W rzeczywistości, aby wykryć RNA wirusa różyczki z próbek doustnych, o których wiadomo, że zawierają wirusa różyczki, RNA należy wyekstrahować z hermetyzowanego wirusa przy użyciu zestawów do ekstrakcji wirusowego RNA Qiagena, [50],[51], który wymaga lizę kapsułki w warunkach denaturujących. Co więcej, nawet jeśli obecny był jakiś wolny wirus RNA, swoistość analizy ilościowej DNA PicoGreen® dla dsDNA jest 9-krotnie większa niż ssDNA i 31-krotnie większa niż dla RNA.

M13 Primer (Life Technologies) stosowano do wytwarzania wzorcowych roztworów jednoniciowego DNA (ssDNA), a ludzkie DNA (Paragon Dx, USA) stosowano do tworzenia wzorcowych roztworów dwunitkowych DNA (dsDNA) do analizy fluorymetrycznej. Quant-iTTM Oli-Green® (Life Technologies) zastosowano do oznaczenia ssDNA, a Quant-iT™ PicoGreen® (Life Technologies) zastosowano do oznaczenia dsDNA. Limit wykrywania PicoGreen® dla dsD-NA wynosi 100 pg / ml. Roztwory standardowego DNA OliGreen® zostały wykonane przez zmieszanie z Quant-iT™ OliGreen® or Quant-iT™ PicoGreen® dla końcowych stężeń 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml i 100 ng/ml. 200 µl każdego z seryjnych roztworów do rozcieńczania przeniesiono pipetą do 96-studzienkowej płytki. Szczepionki rozcieńczono 1, 2, 10 i 100-krotnie w mieszaninach 1X TE z Quant-iT™ OliGreen® lub Quant-iT™ PicoGreen® i 200 µl odpipetowano na 96-studzienkowe płytki. Intensywność fluorescencji analizowano za pomocą Gemini EM Microplate Reader (Urządzenie molekularne). Zawartość DNA w każdej szczepionce obliczono na podstawie standardowych krzywych.

Charakterystyka rozmiaru fragmentu resztkowego DNA w Meruvax®II i Havrix® przez elektroforezę żelową

5 ng resztkowego ludzkiego DNA z każdej szczepionki, jak określono uprzednio, zmieszano z barwnikiem obciążającym (Lonza) i 1X TE w całkowitej objętości mniejszej niż 40 µl. Pozostałe próbki płodowego ludzkiego DNA i roztwór markera wielkości molekularnej DNA (20 par zasad markera DNA o rozszerzonym zakresie (Lonza) w barwniku obciążającym i 1X TE dla końcowego stężenia 200 ng/µl w całkowitej objętości 15 µl) umieszczono w 4% żelu agarozowym i przepuszczono przez żel przy 210V przez 4 godziny. Po elektroforezie żel inkubowano z roztworem barwiącym SYBR Gold rozcieńczonym

w stosunku 1: 10000 z 1X TE przez noc w 4 ° C. Pasma DNA obrazowano w warunkach ekspozycji na światło UV.

Szczątkowe płodowe DNA w Havrix® nie migrowało ze studzienki, nawet po jednej godzinie traktowania 50 ° C proteinazą K, wykazując, że fragmenty płodowego DNA w Havrix® mają długość co najmniej 1000 par. Dalsze porównanie płodowych fragmentów DNA Havrix® z DNA faga lambda wskazuje, że płodowe fragmenty DNA są nawet większe niż 48 502 par.

Absorpcja i inkorporacja DNA do genomu gospodarza w różnych liniach komórkowych.

Ludzkie DNA Cot1 (Invitrogen) znakowano przy użyciu Mirus Label IT CyTM3 Label-Kit (Mirus) i utrzymywano w temperaturze -20°C do czasu użycia. DNA Cot1 został wykorzystany do wykrycia absorpcji fragmentów komórkowych i jądrowych DNA, ponieważ rozmiar fragmentu produktu Invitrogen ludzkiego DNA Cot1 jest podobny do rozmiaru płodowego DNA znalezionego w Meruvax®II, i ponieważ jako linia komórek nowotworowych powróciła epigenetycznie do niezróżnicowanych podstawowych komórek typu płodowego [52]

Komórki U937 (chłoniak histologiczny) hodowano w zmodyfikowanym Eagle Milium (DMEM) Dulbecco uzupełnionym 15% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1% roztworem antybiotyku i antybiotyku w 37 ° C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO2 / 95% powietrza. Komórki HL-60 (mieloblast) hodowano w zmodyfikowanej pożywce Dulbecco Iscove'a (IMDM) uzupełnionej 20% FBS i 1% roztworem antybiotyczno-antymikotycznym w temperaturze 37 ° C w tych samych warunkach. Luźno przylegające komórki NCCIT (potworniakorak) hodowano w RPMI-1640 uzupełnionym 10% FBS i 1% roztworem antybiotyko-antymikotycznym, o gęstości komórek 3 x 104 na studzienkę z 24-studzienkowej płytki, [...] którą umieszczono w każdej studzience w 37 ° C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO2 / 95% powietrza. Ludzkie komórki Fibroblast 1 z napletka (HFF1) hodowano w DMEM uzupełnionym 15% płodową surowicą bydlęcą (FBS), a jako pożywkę stosowano 1% roztwór antybiotyk-środek przeciwgrzybiczy. Komórki BE (2) -C (nerwiaka niedojrzałego) hodowano w mieszaninie 1:1 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) i pożywki F12 uzupełnionej 10% FBS i 1% roztworem antybiotyku-antymikoty. M059K (Glioblastoma-Double Stranded Break repair proficient) i M059J (defekt naprawy Glioblastoma-Double Stranded Break) również hodowano w mieszaninie 1:1 DMEM i pożywki Ham F12 uzupełnionej 10% FBS, 0,05 mM endogennymi aminokwasami, i 1% roztworu antybiotyku-antymikoty. Po hodowli komórek w każdym z warunków przez 2 do 3 dni dodano 500-750 ng oznaczonego Cy3 ludzkiego DNA Cot1 na 1,0 × 107 komórek i inkubowano w temperaturze 37° C w wilgotnej atmosferze **barwiono następnie zawierającym 5% barwnikiem Hoechst CO2 / 95% bejca**, wietrzone poprzez delikatne potrząsanie osłoną 24 do 48 godzin, umieszczono szkiełka na szkiełkach jądrowych, a pobór komórkowy i jądrowy DNA analizowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

W przypadku komórek U937 i NCCIT, genomowe DNA oczyszczono przez wytrącanie etanolem, co eliminuje fragmenty kwasów nukleinowych o krótkich fragmentach, w tym nie będące częścią znakowanego Cy3 ludzkiego DNA Cot1. Względne jednostki fluorescencyjne (RFU) znakowanego Cy3 ludzkiego DNA Cot1 wprowadzonego do chromosomów U937 lub NCCIT zmierzono przy użyciu Gemini EM Microplate Reader i ilość włączonego ludzkiego DNA Cot1 obliczono na podstawie standardowej znakowanej krzywej Cot1 DNA Cy3.

W celu modelowania stanu zapalnego wszystkie adherentne linie komórkowe aktywowano

lipopolisacharydami (LPS) przy 1, 10 i 100 ng na 104 komórki przez 24 do 48 godzin w obecności znakowanych fragmentów DNA Cot1 Cy3. Jądra barwiono barwnikiem Hoechst, a następnie określano pobór komórkowy i jądrowy DNA za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Dodatkowo, pobór DNA przez komórki HFF1 określono również po permeabilizacji saponiny. Komórki HFF1 inkubowano z 0,02% saponiny, 300 ng / ml DAPI i 500 ng znakowanego ludzkiego DNA Cot Cy3 1 przez 24, 48 i 72 godziny.

Zbieranie danych genomicznych

Wszystkie opublikowane na dzień dzisiejszy geny powiązane z autyzmem (z angielskiego AAGs) zostały skompilowane w pojedynczy plik poprzez połączenie baz danych AutDB i ACGMap. 53,54 Cała sekwencja nukleotydów ludzkiego genomu według chromosomów została pobrana z serwera FTP z Uniwersytetu Kalifornijskiego Santa Cruz (UCSC) i pozycje eksonów dla każdego genu zostały otrzymane z wyszukiwarki tabel USCS. 55 Lokalizacje typowych miejsc mejotycznej rekombinacji zostały otrzymane z Międzynarodowego Projektu HapMap 56 a ich współrzędne zostały zmienione z wersji 35 na wersję 37 za pomocą narzędzia LiftOver (https://genome.ucsc.edu/cgi - bin/hgLiftOver) Algorytm napisano aby wygenerować wszystkie 1024 ograniczone, specyficzne oligonukleotydy złożone z 13-stu nukleotydów i ich komplementarne nici.

Określenie motywów i punktów polimorfizmu

Użyto autonomicznego narzędzia BLAST Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej w wersji 2.2.24 aby zlokalizować pozycje wszystkich sekwencji punktów polimorfizmu oligonukleotydów, złożonych z 13-stu nukleotydów i ich nici komplementarnych na każdym chromosomie. Multiple overlaying programs were written to match the 13 mer locations from BLAST with MR hotspot locations on all genes and on the subset of AAGs at both the chromosomal and specific exon levels. These were further utilized to match the hotspot locations and then the 13 mer locations separately within all genes and within the subset of AAGs.

Wyniki

Relacja między wyszczepialnością MMR a występowaniem autyzmu w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji po "Popłochu Wakefielda"

Średnia wyszczepialność MMR dla tych trzech krajów spadła poniżej 90% po publikacji Wakefielda z 1998 r., ale zaczęła powoli wzrastać po 2001 r., by w 2004 r. osiągnąć ponownie poziom ponad 90%. Wyszczepialność MMR jest przedstawiana według roku urodzenia, a nie według wieku w momencie immunizacji, co wyjaśnia dlaczego spadek wyszczepialności według roku urodzenia poprzedzają publikację Wakefielda, ponieważ dzieci zazwyczaj otrzymywały szczepionkę MMR między 12 miesiącem a 3 rokiem życia. W tym samym okresie średnia częstość występowania zaburzeń autystycznych w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji spadła

znacząco dla roku urodzenia 1998 i ponownie wzrosła po 2000 roku. Do 2007 roku częstość występowania ASD była dwukrotnie większa niż częstość występowania w 1998 roku (rys. 1).

Częstość występowania autyzmu i dane dotyczące wyszczepialności MMR przedstawiono w Tabeli 1 i 2. Chociaż publicznie dostępne dane za ten okres, na temat występowania autyzmu w tych trzech krajach, są niestety ograniczone, wyraźna relacja pomiędzy przyczyną i skutkiem wymaga dalszego rozpatrzenia i badań naukowych.

Oznaczanie ilościowe pozostałości DNA płodu ludzkiego i wielkość fragmentów w Meruvax®II i Havrix®

Średnia ilość ssDNA i dsDNA w Meruvax®II wynosiła odpowiednio 142,05 ng / fiolkę i 35,00 ng / fiolkę oraz 276,00 ng / fiolkę i 35,74 ng / fiolkę w Havrix® (tabela 3). Ilości te są znacząco wyższe, niż limit pozostałości DNA wynoszący <10 ng / dawkę, omówiony w Wytycznych FDA dla przemysłu.[19]

Wielkość fragmentów DNA w Meruvax®II wynosiła w przybliżeniu 215 par zasad określonych za pomocą elektroforezy (Fig. 2A). DNA w Havrix® nie migrowało porzez żel i pozostało w pierwotnym pojemniku, nawet kiedy zastosowano bakteriofag lambda z DNA, co wskazuje, że płodowe fragmenty DNA są prawdopodobnie dłuższe niż 48 000 par zasad (Fig. 2B).

Absorpcja ludzkiego DNA i włączenie do różnych linii komórkowych

Spontaniczna absorpcja komórkowa i jądrowa DNA była widoczny w linii komórkowej HFF1 (rys. 3), NC-CIT (rys. 5) i U937 (rys. 9 i rys. 10). W przeciwieństwie do tego spontaniczna absorpcja Cy3 nie była widoczne w komórkach HL-60. Absorpcja DNA w BE (2) -C i M059K nie była mierzalna z powodu wysokiej autofluorescencji tych komórek (dane nie pokazane). Komórkową absorpcję DNA stymulowanego LPS obserwowano w HFF1 (rys. 4), NCCIT (rys. 6) oraz M059J (rys.7 i rys 8). Spontaniczne i zapalnie wzmocniona absorpcja komórki i DNA, charakteryzujące się ilościowym określeniem zakresu faktycznego inkorporacji genomowej zinternalizowanych fragmentów DNA. Wbudowana ilość oznakowanego Cy3 ludzkiego Cot1 DNA w genomowym DNA U937 wynosiła 0,0111 ± 0,0034 pg (n = 12) na komórkę w ciągu 24 godzin, w przybliżeniu 0,167% całkowitego genomu DNA U937 na komórkę. Wbudowanie DNA w komórkach NCCIT wynosiło 0,0026 pg / komórkę po 24 godzinach i 0,04 pg / komórkę po 48 godzinach, przy włączeniu wynoszącym 0,6% całkowitego genomowego DNA NCCIT (Tabela 4).

Sygnatury specyfikacji przerwy dwuniciowej genomu

Genomowe mapowanie gorących punktów MR doprowadziło do identyfikacji motywów sekwencji

DNA, które są nadreprezentowane w gorących punktach, w tym w sekwencji zdegenerowanych 13 merów [29]. Znaleźliśmy 280 000 wystąpień zidentyfikowanego 13-merowego zdegenerowanego motywu hotspotu DNA w ludzkim genomie, i z tych najbardziej obfitymi ograniczonymi sekwencjami były CCACCTTGGCCTC i jego odwrotny dopełniacz GAGGCCAAGGTGG. Oba miały współczynniki rekombinacji w zakresie 30 najwyższych spośród wszystkich 2048 możliwych ograniczonych 13 merów. Ta 13-punktowa sekwencja hotspotów została powiązana z 41% punktami aktywnych MR, jak również z chorobotwórczymi, nie-allelowymi, homologicznymi punktami rekombinacji oraz powszechnymi hotspotami delecji mitochondriów[29].

Z powodów niejasnych w tym czasie, punkty gorące koncentrują się w podgrupie genów związanych z autyzmem (AAG), a AAG mają dodatkowo najwyższe wskaźniki rekombinacji mejotycznej, w porównaniu do zestawu wszystkich genów w ludzkim genomie. W porównaniu do wszystkich genów, większa liczba AAG zawiera gorące punkty MR, AAG zawierają więcej gorących punktów MR na gen, a zdegenerowany motyw gorącej powierzchni 13 mer MR jest bardziej rozpowszechniony w hotspotach AAG niż w innych genach. Podczas gdy podzbiór AAGs w porównaniu do wszystkich genów w ludzkim genomie ma podobne ilości zdegenerowanych 13 merów na gen, 13 merów jest zdecydowanie więcej w gorących punktach MR w podgrupie AAG niż we wszystkich genach.

Konkretnie, wyższy odsetek AAG zawiera hotspoty, a AAG mają więcej hotspotów na gen, w porównaniu do wszystkich genów w ludzkim genomie (Tabela 5 i 6). Podsumowując, AAG mają bardziej skoncentrowaną podatność na urazy trwałości genomu w porównaniu z grupą wszystkich genów zawartych w ludzkim genomie. Wyniki te dodatkowo wspierają powiązanie choroby między MR, specyficznymi ograniczonymi motywami hotspotów 13 mer i ASD.

Szczególne znaczenie dla tendencji ASD u płci męskiej ma analiza sygnatur dwuniciowych przerw na chromosomie X. Istnieje 19 genów powiązanych z autyzmem na chromosomie X, które zawierają rekombinowane gorące punkty w transkrybowanych regionach. Jak zilustrowano w Tabeli 7, 15 z tych genów chromosomu X ma 13 merowych motywów w odległości mniejszej niż 100 kilozasad od centrum hotspotu znajdującego się w eksonie. Sugeruje to, że te szczególne geny chromosomowe X mogą być szczególnie podatne na przerwy dwuniciowe, insercyjną mutagenezę DNA i chorobę objawową, ponieważ 13 merów, które są związane z chorobą, znaleziono w pobliżu centrum eksonu zawierającego gorący punkt.[29].

Dyskusja

Bezpieczeństwo szczepień to kluczowa kwestia dla ogółu społeczeństwa, a w szczególności dla pracowników służby zdrowia, którzy zwykle muszą być w pełni przekonani co do szczepionki, a także dla rodziców, którzy muszą podejmować świadome decyzje dotyczące szczepień dla swoich dzieci. Pozyskiwanie, hodowanie lub wytwarzanie szczepionek wykorzystujących elektrycznie usuwaną ludzką tkankę płodową stwarza etyczne i filozoficzne dylematy. Ponadto, zastosowanie ludzkich linii komórek płodowych do wytwarzania szczepionek tworzy produkty końcowe, które zawierają resztkowe zanieczyszczenia DNA płodu, w tym szczątki komórek i płodowe fragmenty DNA. Stwarza to dodatkowe etyczne i filozoficzne dylematy, ponieważ te zanieczyszczenia będą wstrzykiwane do biorcy szczepionki wraz z antygenem wirusa. I na koniec, społeczeństwo nie było informowane o produkcji szczepionek na linii komórkowej płodu, po raz pierwszy wprowadzonej do Stanów Zjednoczonych w 1979 r., udaremniając wszelkie publiczne uwagi dotyczące kwestii etycznych i filozoficznych powiązanych z tą zmianą produkcyjną.

Oprócz płodowych szczątków komórkowych i płodowych fragmentów DNA, szczepionek, które zostały hodowane lub wyprodukowane przez Meruvax®II, MMR®II i Varivax®. są dodatkowo zanieczyszczone fragmentami ludzkich endogennych retrowirusów HERVK.[57] Najnowsze dowody wykazały, że ludzkie endogenne transkrypty retrowirusowe są podwyższone w mózgach pacjentów ze schizofrenią lub zaburzeniem dwubiegunowym, [58,59] w monocytarnych leukocytach krwi obwodowej pacjentów ze spektrum autyzmu [60] jako choroby autoimmunologiczne. [61-63] Nigdy nie badano konsekwencji dla zdrowia ludzkiego szczątkowych ludzkich płodowych fragmentów DNA i zanieczyszczeń retrowirusowych HERVK. Wcześniej informowaliśmy o ekologicznej korelacji pomiędzy wprowadzeniem szczepionek, produkowanych na komórkach płodowych a zaburzeniami autystycznymi, pierwsze badanie sugeruje rozważenie konsekwencji dla zdrowia publicznego hodowania szczepionek na ludzkich liniach komórkowych płodu. [3]

W tym artykule przeanalizowaliśmy molekularne i genomiczne konsekwencje występowania fragmentów płodowego DNA w szczepionkach, a przede wszystkim przedstawiono dodatkowe dane ekologiczne wskazujące na potencjalny związek przyczynowy pomiędzy szczepionkami wytwarzanymi przy użyciu komórek płodu a ogólnoświatową epidemią autyzmu [3]. Po opublikowaniu badań Andrew Wakefielda w prestiżowym wydaniu Czasopismo The Lancet z 1998 r. sugerujące, że MMR®II, szczepionka wytwarzana przy użyciu komórek płodowych, może być związana z nieprawidłowościami jelitowymi u dzieci autystycznych, debata znana jako "Wakefield Scare" została szybko rozpowszechniona w brytyjskich i skandynawskich mediach, prowadząc niektórych rodziców do rezygnacji z zaszczepienie ich dzieci szczepionką MMR. Pierwszym krajem dotkniętym przez "Wakefield Scare" była Wielka Brytania według dokumentu Nagaraja z 2006,[8], który stwierdził, że "wykorzystanie szczepionki zaczęło spadać po kontrowersyjnym badaniu łączącym szczepionkę MMR z autyzmem" prowadząc do bardzo małego pokrycia szczepionką MMR - zaledwie 50% w niektórych obszarach stanowiących poważne zagrożenie epidemiami odry. W Szwecji spadek pokrycia MMR u dzieci urodzonych po roku 1999 zgłosili Dannetun i in. (2004) [6], ponieważ "w 1999 i 2000 roku w Szwecji przeprowadzono powszechną dyskusję na temat działań niepożądanych związanych ze szczepionką przeciwko odrze". W 2002 i 2003 r. odnotowano podobny spadek w zakresie stosowania szczepionki MMR w Norwegii autorstwa Trogstad i innych. (2012).[7] Podobnie jak w Szwecji, Trogstad i in. (2012) stwierdzili, że "spadek ten zbiegał się z debatą wynikającą z fałszywych twierdzeń o związku między szczepionką MMR a autyzmem przedstawionych

przez Wakefield i in.". W niniejszej publikacji zilustrowaliśmy gwałtowny spadek średniego zasięgu MMR w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecja po publikacji Wakefielda i równie gwałtowny wzrost po roku 2001, kiedy publicznie zdyskredytowano Wakefielda.

Nagły spadek i powrót do normy w zakresie MMR zapewnia wyjątkową możliwość zbadania wszelkich związków przyczynowych między wytwarzanym przy użyciu komórek płodowych MMR, który został wprowadzony w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji odpowiednio w 1988, 1983 i 1982 roku, a występowaniem ASD. W celu udowodnienia przyczyny i skutku lub związku przyczynowo-skutkowego, a nie korelacji: 1) przyczyna musi wystąpić przed skutkiem, 2) usunięcie przyczyny musi skutkować usunięciem efektu, oraz 3) przywrócenie przyczyny musi ponownie wprowadź efekt. Nagły spadek i wzrost w zakresie pokrycia MMR zapewnia spontaniczny rzeczywisty eksperyment na skalę światową, pozwalający na zbadanie użycia szczepionki hodowanej na komórkach płodu oraz częstości występowania ASD.

Podczas okresu spadku i powrotu do MMR, częstość występowania ASD wykazała spadek po roku urodzenia 1998, po którym nastąpił wzrost, który rozpoczął się w roku urodzenia 2001 i później. Warto zauważyć, że istnieje intrygujące powiązanie między zmniejszeniem zasięgu MMR i zmniejszonym występowaniem AD / ASD w Norwegii, Szwecji i Wielkiej Brytanii wkrótce po opublikowaniu przez Wakefielda publikacji Lancet z 1998 r. [5] Podczas gdy publicznie dostępne dane na temat rozpowszechnienia ASD w tych trzech krajach są rozczarowująco skąpe w tym okresie, widoczna zależność przyczynowo-skutkowa przedstawiona tutaj wymaga dalszych badań i badań.

Jakie znane procesy biologiczne mogłyby wyjaśnić ten widoczny związek przyczynowo-skutkowy między produkowanymi w oparciu o komórki płodowe szczepionkami a występowaniem ASD? Sugerujemy, że zanieczyszczenia płodowymi resztkami komórkowymi i fragmentami DNA, jak również retrowirusowymi fragmentami HERVK może prowadzić do ataku autoimmunologicznego i / lub insercyjnej mutagenezy u dzieci. Artykuł koncentruje się na potencjale do mutagenezy insercyjnej.

W tym artykule przedstawiamy obecność fragmentów DNA w Meruvax®II i Havrix®. Jak pokazano na rysunku 2, reszty w Meruvax® II mają długość około 215 par zasad. Wielkość pozostałości DNA w Havrix® nie była mierzalna. Nasze wyniki wskazują na nadmierne poziomy ssDNA i dsDNA w Meruvax®II i Havrix®, które są znacznie wyższe niż sugerowane wytyczne FDA.[19] Te nadmierne pozostałości mogą być pobierane przez komórkę i dostarczane do jądra. Potencjał egzogennego DNA do wejścia w jądro komórki i wstawienia do genomu tej komórki jest dobrze ugruntowanym procesem biologicznym. Rzeczywiście, jak wspomniano wcześniej, przeniesienie jądrowe fragmentów mitochondrialnego DNA jest procesem ciągłym u ssaków, w tym ludzi. [64] Wysiłki mające na celu opracowanie terapii genowej udokumentowały, że krótkie fragmenty DNA można wstawić do genomu biorcy z wydajnością do 20%. Yakubov i in. (2007) wykorzystali ludzkie fragmenty łożyskowego DNA o długości od 200 do 3000 par zasad i wykazali spontaniczny wychwyt i insercję do genomu ludzkiej linii komórkowej MCF-7 o wydajności 1-4%, a także wykazali specyficzny dla gatunku charakter tej inkorporacji genomu, ponieważ fragmenty DNA spermy łososia nie były zintegrowane z ludzkimi komórkami MCF-7.[18]

W tym badaniu zgłaszamy podobne stopnie inkorporacji genomu od 0,2 do 0,6% genomu biorcy 24 do 48 godzin po dodaniu fragmentów DNA o długości w przybliżeniu 350 par do pożywki hodowlanej komórek U937 lub NCCIT. Pobieranie fragmentów DNA było spontaniczne i nie wymagało permeabilizacji lub transfekcji komórek. Bodźce zapalne (LPS) były zdolne do wzmocnienia internalizacji, co wskazuje na znaczenie ogólnego stanu zdrowia dziecka w momencie szczepienia względem podatności na internalizację wstrzykiwanych fragmentów płodowych i retrowirusowych.

Co najważniejsze, wykazano również, że małe fragmenty DNA integrują się efektywnie z genomem in vivo. Jensen i in. (2011) z powodzeniem dostarczyli i zintegrowali małe fragmenty DNA z wątrobą myszy przy użyciu wstrzyknięć do żyły ogonowej jako metody podania. [65] Badania Colosimo w 2001 i 2007 r. wykazały również 1-10% integracji genowej in vivo małych fragmentów homologicznych w 4% zmutowanych CFTR komórek nabłonka. [66,67] McNeer i in. (2013) dostarczyli myszom fragmenty DNA o długości do 60 par za pomocą wstrzyknięcia do żyły ogonowej i wykazali 0,01 do 0,04% integracji genomowej z samym DNA, która została zwiększona do 1,2% dla potrójnego PNA. Integracja genomu była najwyższa w komórkach znalezionych w szpiku kostnym, śledzionie i grasicy.[68] Ponadto, stosując te same techniki, McNeer i in. (2013) wykazali również skuteczność przekazywania DNA in vivo, stosując ogólnoustrojową iniekcję dożylną, pomiędzy 0,05% i 0,43%, stosując odpowiednio głębokie sekwencjonowanie genów komórek szpiku kostnego i śledziony. McNeer i in. (2013) również wykazali specyficzną gatunkowo naturę integracji DNA u mysz chimerycznych dla ludzkich komórek macierzystych CD34+ zawierających mutację CCR5 wykazały wychwyt wstrzykniętego fragmentu tylko w ludzkich komórkach macierzystych CD34+, ale nie w mysich komórkach macierzystych CD34 + u tych zwierząt chimerycznych. [68]

Fragmenty cf-DNA mogą być wychwytywane przez zdrowe komórki poprzez wychwyt za pośrednictwem receptora lub mogą spontanicznie penetrować błony komórkowe, które zmieniły przepuszczalność, na przykład podczas reakcji zapalnych. Uważa się, że wychwyt nuklearny fragmentów cf-DNA zapewnia źródło utrzymania integralności DNA podczas ratowania rozerwanych rozgałęzień replikacyjnych lub podstawowej naprawy uszkodzeń. Spontaniczne wychwytywanie pozakomórkowego DNA zostało również wykorzystane do terapii genowej, a także do korekcji genu komórkowego. [9, 18,69-72] Chociaż korzystny był swobodny pobór DNA, proces ten był również związany z generowaniem mutacji i aberracji chromosomowych. [73] Nasze zmierzone inkorporowanie genomowe (0,003 do 0,04 pikogramów) 0,2% - 0,6% całego genomu w ciągu 24 do 48 godzin wydaje się na pierwszy rzut oka wysokie. Jednak nasze liczby są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wykazującymi, że egzogenny DNA zastąpił do 1% całego genomu w ciągu 30 minut.[9] Chociaż komórki HL-60 w naszych doświadczeniach nie pobierały spontanicznie DNA egzogennego, linia komórkowa była stosowana w przeszłość jako model spontanicznego wychwytu DNA. [72] Komórkowy i jądrowy pobór DNA w komórkach HFF1 i w komórkach NCCIT sugeruje, że komórki embrionalne i noworodkowe są bardziej podatne na wychwyt DNA niż komórki z bardziej dojrzałego źródła. Wyniki te wskazują na potrzebę dalszych badań nad włączeniem DNA ze źródeł egzogennych w celu porównania podatności niemowląt i małych dzieci z nastolatkami i dorosłymi. Ponadto, zwiększony wychwyt DNA po aktywacji LPS sugeruje, że zapalenie ogólnoustrojowe lub odpowiedź immunologiczne mogą zwiększać podatność na egzogenny wychwyt DNA. Szczepionki, które są wytwarzane z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych płodu są zanieczyszczone egzogennym DNA i fragmentami retrowirusowymi [57], i szczepionki wywołują ogólnoustrojowe zapalenie i aktywację immunologiczną, kombinację, która może być szczególnie wrażliwa na insercyjną mutagenezę u biorców szczepionek.

Oprócz potwierdzenia poprzednich doniesień na temat wbudowania DNA w komórki ludzkie, analiza genomowa w niniejszym artykule wskazuje, że w genotypie wolnym od choroby istnieją regiony, w których prawdopodobnie występują mutacje, które mogą wywoływać ASD (tabele 5 i 6) przy rozważaniu podatności genomowej na rozwój ASD wyłącznie w zakresie podpisów specyfikacji DSB. Co może wyjaśnić wyższy wskaźnik 13 merów (podpisy specyfikacji DSB) w AAG? Inni badacze wykazali, że AAG są charakterystycznie hipermutowane [74], co może wynikać z dużej koncentracji sygnatur specyfikacji DSB w tych genach. Jeśli chodzi o rzeczywiste objawowe ASD, niektóre czynniki oprócz zaprogramowanego tworzenia DSB mogą łatwo się ujawnić i prowadzić do mutacji de novo, takich jak indukowane DSB w komórkach somatycznych, to badanie sugeruje, że fragmenty płodowego DNA w szczepionkach mogą być takim środowiskowym czynnikiem. W podobnym scenariuszu, jak w przypadku różnych chłoniaków, na przykład, dodanie toksyny lub chemioterapeutycznej DSB do zaprogramowanych DSB do przełączania klas prowadzi do raka.[30]

Podsumowując, szczepionki wytwarzane w ludzkich liniach komórek płodowych zawierają niedopuszczalnie wysokie poziomy zanieczyszczeń fragmentami płodowego DNA. Ludzkie fragmenty DNA o podobnej długości i sygnaturze epigenetycznej spontanicznie integrują się z genomem z prymitywnymi liniami komórkowymi, proces, który można wzmocnić w stanach zapalnych. Ludzki genom naturalnie zawiera regiony, które są podatne na tworzenie dwuniciowej przerwy i mutagenezę

insercyjną DNA, regiony szczególnie skoncentrowane w eksonach genów, które okazały się przyczynowe lub związane z fenotypem ASD. "Wakefield Scare" stworzył naturalny eksperyment, który wskazuje na związek przyczynowo-skutkowy między produkowanymi szczepionkami linii komórkowej płodu a zapadalnością na ASD. Nasz artykuł wzywa do dodatkowego badania i badania tego potencjalnego związku. Rozwiązanie tego przerażającego problemu zdrowia publicznego jest łatwo dostępne: szczepionki można bezpiecznie i skutecznie wytwarzać w liniach komórkowych zwierzęcych, owadzich lub roślinnych, 75-77 eliminując zagrożenia związane z resztkowym ludzkim DNA i zanieczyszczeniami retrowirusowymi.

References

1 Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong associations of de novo copy number mutations with autism. Science. 2007;316(5823):445.

2 Landa RJ. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. Nature Clinical Practice Neurology. 2008;4(3):138.

3 Deisher T, Koyama K, Bwabye S, Doan N. Impact of environmental factors on the prevalence of au - tistic disorder after 1979. Journal of Public Health and Epidemiology. 2014:271.

4 McDonald ME, Paul JF. Timing of increased autistic disorder cumulative incidence. Environ Sci Tech- nol. 2010;44(6):2112.

5 Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, et al. Ileal - lymphoid - nodular hyperplasia, non - specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. Lancet. 1998;351(9103):637.

6 Dannetun E, Tegnell A, Hermansson G, Törner A, Giesecke J. Timeliness of MMR vaccination—in - fluence on vaccination coverage. Vaccine. 2004;22(31):4228.

7 Trogstad L, Ung G, Hagerup - Jenssen M, Cappelen I, Haugen IL, Feiring B. The norwegian immu - nisation register—SYSVAK. Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2012;17(16).

8 Nagaraj A. Does qualitative synthesis of anecdotal evidence with that from scientific research help in understanding public health issues: A review of low MMR uptake. Eur J Public Health. 2006;16(1):85.

9 Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, et al. Mechanisms of oligonucleotide uptake by cells : Involve - ment of specific receptors? Proc Nat'l Acad Sci. 1989:6454 - 6458.

10 Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. Biochim Biophys Acta. 1994;1197(2):95.

11 Orson FM, Thomas DW, McShan WM, Kessler DJ, Hogan ME. Oligonucleotide inhibition of IL2R alpha mRNA transcription by promoter region collinear triplex formation in lymphocytes. Nucleic Acids Res. 1991;19(12):3435.

12 Zamecnik PC, Goodchild J, Taguchi Y, Sarin PS. Inhibition of replication and expression of human T - cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complemen - tary to viral RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(12):4143.

13 Stein S, Ott MG, Schultze - Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with mono - somy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. Nat Med. 2010;16(2):198.

14 Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME. Evidence that a triplex - forming oligodeoxyribonucleo - tide binds to the c - myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c - myc mRNA levels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(18):8227.

15 Clarenc JP, Lebleu B, Léonetti JP. Characterization of the nuclear binding sites of oligodeoxyribonu - cleotides and their analogs. Journal of Biological Chemistry. 1993;268(8):5600.

16 Leonetti JP, Degols G, Clarenc JP, Mechti N, Lebleu B. Cell delivery and mechanisms of action of antisense oligonucleotides. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1993;44:143.

17 Zendegui JG, Vasquez KM, Tinsley JH, Kessler DJ, Hogan ME. In vivo stability and kinetics of ab - sorption and disposition of 3' phosphopropyl amine oligonucleotides. Nucleic Acids Res. 1992;20(2):307. 18 Yakubov LA, Rogachev VA, Likhacheva AC, et al. Natural human gene correction by small extracel - lular genomic DNA fragments. Cell Cycle (Georgetown, Tex.). 2007;6(18):2293.

19 FDA briefing document vaccines and related biological products advisory committee meeting - Cell lines derived from human tumors for vaccine manufacture. September 19, 2012.

20 O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. Nature. 2012;485(7397):246.

21 Cooper D, Krawczak M, Antonorakis S. The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. McGraw - Hill; 1995:259.

22 Ozonoff S, Young GS, Carter A, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. Pediatrics. 2011;128(3):e488.

23 Constantino JN, Zhang Y, Frazier T, Abbacchi AM, Law P. Sibling recurrence and the genetic epide - miology of autism. Am J Psychiatry. 2010;167(11):1349.

24 Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong associations of de novo copy number mutations with autism. Science. 2007;316(5823):445.

25 O'Roak BJ, Vives L, Fu W, et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. Science. 2012;338(6114):1619.

26 Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly P. A fine - scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. Science (New York, N.Y.). 2005;310(5746):321.

27 Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two - hit model for severe developmental delay. Nat Genet. 2010;42(3):203.

28 Hicks WM, Kim M, Haber JE. Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion. Science (New York, N.Y.). 2010;329(5987):82.

29 Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G. A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. Nat Genet. 2008;40(9):1124.

30 Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. BMC Ge- nomics. 2010;11:1.

31 Baudat F, Buard J, Grey C, et al. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. Science (New York, N.Y.). 2010;327(5967):836.

32 Bradley WE, Raelson JV, Dubois DY, et al. Hotspots of large rare deletions in the human genome. PLoS ONE. 2010;5(2):1.

33 Choate KA, Lu Y, Zhou J, et al. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. Science (New York, N.Y.). 2010;330(6000):94.

34 Van der Burg M, Pac M, Berkowska MA, et al. Loss of juxtaposition of RAG - induced immuno - globulin DNA ends is implicated in the precursor B - cell differentiation defect in NBS patients. Blood. 2010;115(23):4770.

35 Huang XL, Zou YS, Maher TA, Newton S, Milunsky JM. A de novo balanced translocation break - point truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. Am J Med Genetics.Part A. 2010;152A(8):2112.

36 Smith CL, Bolton A, Nguyen G. Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism. Curr Genomics. 2010;11(6):447.

37 The Norwegian Institute of Public Health. 38 The National Board of Health and Welfare. 39 The Public Health England. 40 Isaksen J, Diseth TH, Schjølberg S, Skjeldal OH. Observed prevalence of autism spectrum disorders in two norwegian counties. European Journal Of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society. 2012;16(6):592.

41 Surén P, Bakken IJ, Aase H, et al. Autism spectrum disorder, ADHD, epilepsy, and cerebral palsy in norwegian children. Pediatrics. 2012;130(1):e152.

42 Surén P, Stoltenberg C, Bresnahan M, et al. Early growth patterns in children with autism. Epidemi- ology. 2013;24(5):660.

43 Statistiska centralbyran - Statistics Norway - Population. 44 Nygren G, Cederlund M, Sandberg E, et al. The prevalence of autism spectrum disorders in toddlers: A population study of 2 - year - old swedish children... corrected] published erratum appears in J Autism Dev Disord 2012; 42(7):1498]. Journal of Autism & Developmental Disorders. 2012;42(7):1491.

45 Statistiska centralbyran - Statistics Sweden - Population. 46 Lingam R, Simmons A, Andrews N, Miller E, Stowe J, Taylor B. Prevalence of autism and parentally reported triggers in a north east london population. Arch Dis Child. 2003;88(8):666.

47 Latif AHA, Williams WR. Diagnostic trends in autistic spectrum disorders in the south wales valleys. Autism: The International Journal of Research and Practice. 2007;11(6):479.

48 Population estimates for England and Wales. Office of National Statistics. 49 Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature. 2013;496(7445):367.

50 Namuwulya P, Abernathy E, Bukenya H, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses identified in uganda, 2003 - 2012. J Med Virol. 2014;86(12):2107.

51 Qiagen. QIAamp viral RNA mini kit. 52 Strizzi L, Hardy KM, Seftor EA, et al. Development and cancer: At the crossroads of nodal and notch signaling. Cancer Res. 2009;69(18):7131.

53 Churbanov A, Voøechovský I, Hicks C. A method of predicting changes in human gene splicing induced by genetic variants in context of cis - acting elements. BMC Bioinformatics. 2010;11:1.

54 Basu SN, Kollu R, Banerjee - Basu S. AutDB: A gene reference resource for autism research. Nucleic Acids Res. 2009;37:D832.

55 The UCSC genome browser. https://genome.ucsc.edu/cgi - bin/hgTables?command=start2013. 56 International hapmap project. http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/2013. 57 Victoria JG, Wang C, Jones MS, et al. Viral nucleic acids in live - attenuated vaccines: Detection of minority variants and an adventitious virus. J Virol. 2010;84(12):6033.

58 Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib - Mösch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. J Virol. 2005;79(17):10890.

59 Diem O, Schäffner M, Seifarth W, Leib - Mösch C. Influence of antipsychotic drugs on human endog - enous retrovirus (HERV) transcription in brain cells. PLoS ONE. 2012;7(1):1.

60 Balestrieri E, Arpino C, Matteucci C, et al. HERVs expression in autism spectrum disorders. PLoS ONE. 2012;7(11).

61 Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, et al. Human endogenous retrovirus - K18 env as a risk factor in mul - tiple sclerosis. Multiple Sclerosis (13524585). 2008;14(9):1175 - 1180.

62 Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, et al. A role for human endogenous retrovirus - K (HML - 2) in rheumatoid arthritis: Investigating mechanisms of pathogenesis. Clinical & Experimental Immunology. 2010;160(3):340.

63 Dickerson F, Rubalcaba E, Viscidi R, et al. Polymorphisms in human endogenous retrovirus K - 18 and risk of type 2 diabetes in individuals with schizophrenia. Schizophr Res. 2008;104(1 - 3):121.

64 Chatre L, Ricchetti M. Nuclear mitochondrial DNA activates replication in saccharomyces cerevisi - ae. PLoS ONE. 2011;6(3):1.

65 Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, et al. An update on targeted gene repair in mammalian cells: Methods and mechanisms. J Biomed Sci. 2011;18(1):10.

66 Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B, Gruenert DC. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 2001;3(2):178.

67 Colosimo A, Guida V, Antonucci I, Bonfini , Stuppia L, Dallapiccola B. Sequence - specific modifica - tion of a beta - thalassemia locus by small DNA fragments in human erythroid progenitor cells. Haemato- logica. 2007;92(1):129.

68 McNeer NA. Schleifman EB, Cuthbert A. et al. Systemic delivery of triplex - forming PNA and donor DNA by nanoparticles mediates site - specific genome editing of human hematopoietic cells in vivo. Gene Ther. 2013;20(6):658 - 669.

69 Filaci G. Gerloni M, Rizzi M, et al. Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes. Gene Ther. 2004;11(1):42.

70 Lehmann MJ, Sczakiel G. Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mamma - lian cells via a selected DNA segment. Gene Ther. 2005;12(5):446.

71 Rogachev VA, Likhacheva A, Vratskikh O, et al. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. Cancer Cell International. 2006;6:23.

72 Yakubov LA, Petrova NA, Popova NA, Semenov DV, Nikolin VP, Os'kina IN. The role of extracellular DNA in the stability and variability of cell genomes. Doklady.Biochemistry And Biophysics. 2002;382:31.

73 Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID - X1 patients. J Clin Invest. 2008;118(9):3143.

74 Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, et al. Whole - genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. Cell. 2012;151(7):1431.

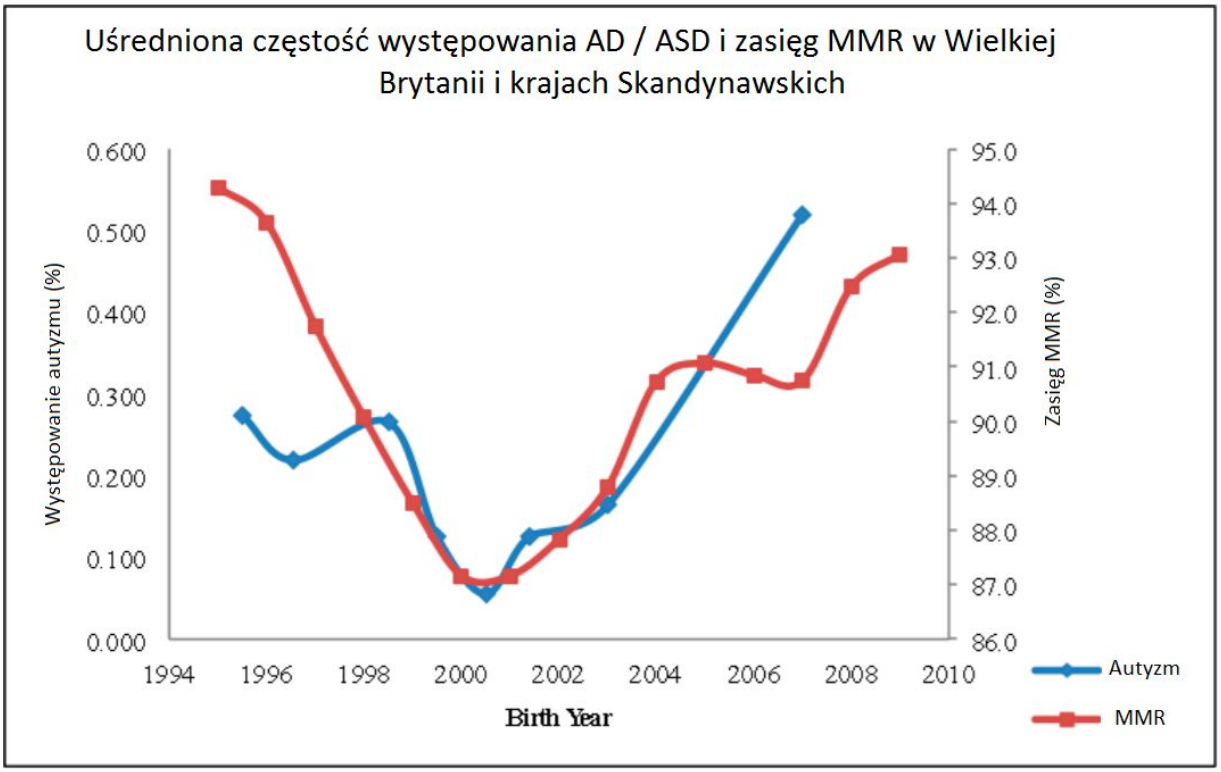
75 Orenstein W, Reef SE. Rubella virus. In: Kaslow RA, Stanberry LR, Le Duc JW, eds. Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control. Fifth ed. Springer; 2014:733 - 744

76 Shiraki K, Hayakawa Y, Mori H, et al. Development of immunogenic recombinant oka varicella vaccine expressing hepatitis B virus surface antigen J Gen Virol. 1991;72 (Pt 6):1393.

77 Diaz - Mitoma F, Le T, Anderson DE. Compositions and methods for treating hepatitis a.

http://www.google.com/patents/WO2010033812A1?cl=en.

Rycina 1. Występowanie autyzmu i zasięg MMR w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji przed i po artykule Wakefielda z 1998 r. Sugerującym, że MMR był powiązany z chorobą jelit i autyzmem



Rycina 1 - Uśredniona częstość występowania AD / ASD i zasięg MMR w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji. Zarówno dane MMR, jak i AD / ASD są znormalizowane do maksymalnego zasięgu / prewencyjności w czasie trwania tej analizy.

Tabela 1 Występowanie autyzmu w Norwegii, Wielkiej Brytanii i Szwecji

Rok urodzenia	Występowanie	
	Norwegia	
1999	0.14	Isaksen et al. 2012 Suren 2012 & 2013
2000	0.05	
2001	0.17	
2002	0.26	
2003	0.29	
	Wielka Brytania	
1995.5	0.274	Latif et al. 2007 Lingam et al. 2003
1996.5	0.219	
1998.5	0.265	
1999.5	0.110	
2000.5	0.061	
2001.4	0.082	
	Szwecja	
1998	0.12	Nygren et al. 2012
2003	0.038	
2007	0.52	

Tabela 2

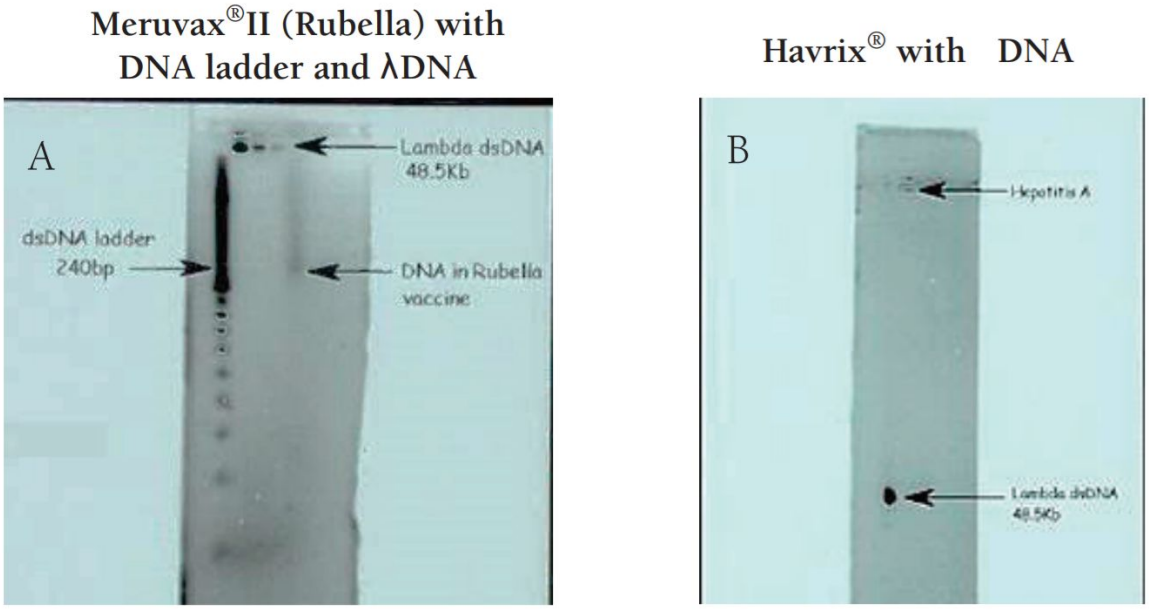
Uśrednione pokrycie MMR w Wielkiej Brytanii, Norwegii i Szwecji

Rok urodzenia	Zasięg MMR (%)
1995	94.3
1996	93.7
1997	91.8
1998	90.1
1999	88.5
2000	87.2
2001	87.2
2002	87.8
2003	88.8
2004	90.7
2005	91.1
2006	90.9
2007	90.8
2008	92.5
2009	93.1

Tabela 3 Poziomy szczątkowego ludzkiego jednoniciowego DNA (test PicoGreen®) i ludzkiego dwuniciowego DNA (test OliGreen®) w szczepionce przeciwko różyczce (Meruvax®II) i szczepionce przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A (Havrix®).

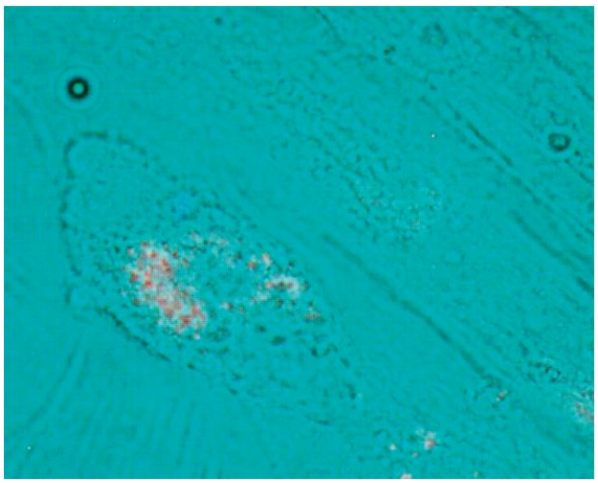
	MERUVAX®II (szczepienie przeciwko różyczce)		HAVRIX ® (szczepionka przeciwko wzw A)	
	Merck & Co. Inc.		***GlaxoSmithKline Biologicals***	
	DNA jednoniciowe (ng/fiolka)	DNA dwuniciowe (ng/fiolka)	DNA jednoniciowe (ng/fiolka)	DNA dwuniciowe (ng/fiolka)
Fiolka 1	135.66	59.34	844.58	112.69
Fiolka 2	145.82	24.54	104.88	10.69
Fiolka 3	-	36.052	213.6	15.32
Fiolka 4	-	20.064	213.6	15.32
Fiolka 5	118.54	-	213.6	15.32
Fiolka 6	164.40	-	165.43	73.33
Fiolka 7	145.82	-	176.31	7.49
Średnio	142.05	35.00	276.00	35.74

Rysunek 2 Oczyszczone DNA po elektroforezie żelowej. Reprezentatywne żele przedstawiające pozostałości ludzkie. Wielkość fragmentów DNA dla Meruvax®II (A) i Havrix® (B).

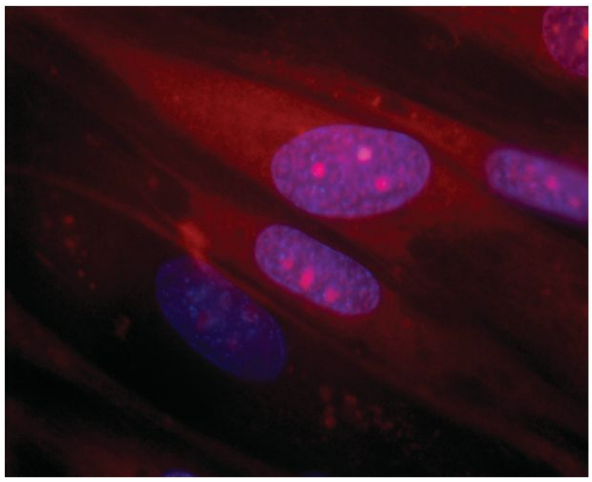


Rysunek 2 - Wielkość fragmentu ludzkiego płodowego DNA w Meruvax®II wynosiła średnio 215 par zasad, ale waha się od 700 par zasad do długości 200 par zasad (2A). Przy prowadzeniu w identycznych warunkach jak w przypadku 2A, ludzkie płodowe fragmenty DNA w Havrix® nie wypłynęły ze studzienki. Dodatkowe żele były prowadzone przez dłuższy okres czasu, po migracji lambda DNA przez żele, a wciąż ludzkie płodowe fragmenty DNA w Havrix® nie wypłynęły ze studzienki (2B).

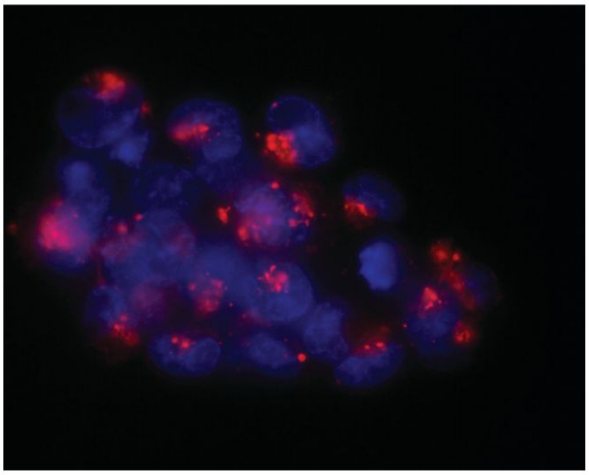
Tabela 4 Cy3 z oznaczeniem ludzkiego Cot1 DNA pobranego w różnych liniach komórkowych.



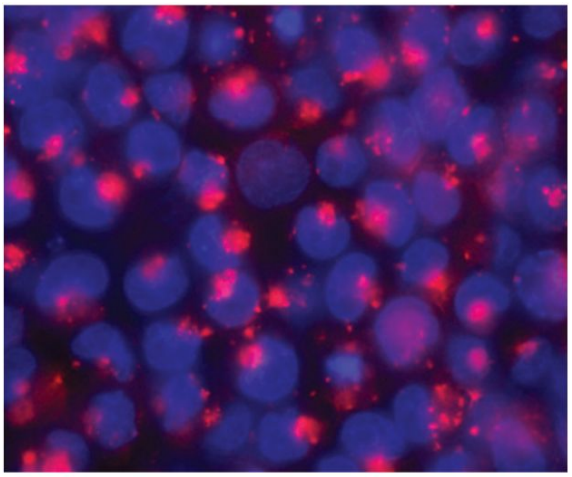
Rysunek 3 - HFF1 - spontaniczna komórkowa i jądrowa absorpcja DNA (jasne pole i czerwona nakładka fluorescencyjna Cy3).



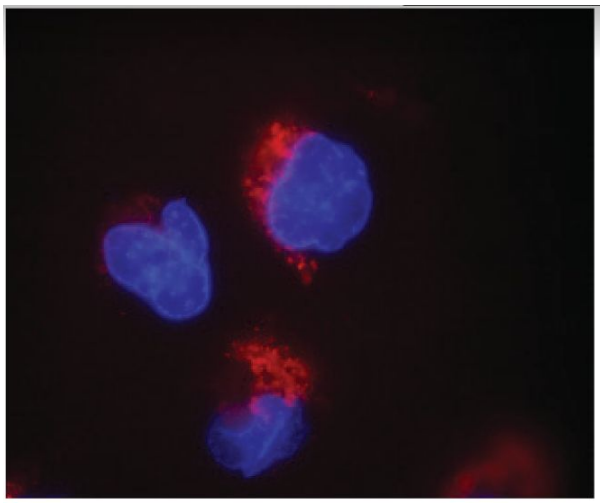
Rysunek 4 - HFF1 - komórkowy i jądrowy pobór DNA po permeabilizacji saponiny. (Cy3 czerwony i jądrowa niebieska nakładka fluorescencyjna Hoechst)



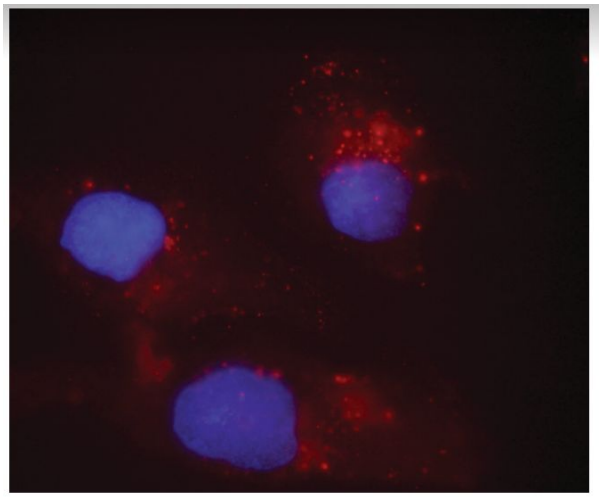
Rysunek 5 - Spontaniczny wychwyt komórkowy DNA przez NCCIT (nakładka fluorescencji błękitnego cyjonu i jądra niebieskiego)



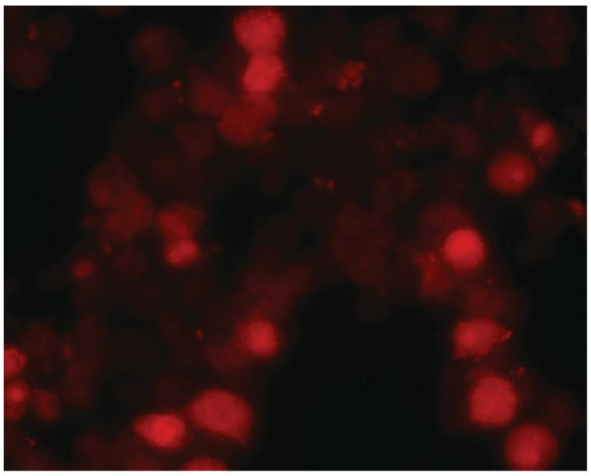
Rysunek 6 - komórkowy pobór DNA NCCIT po aktywacji lipopolisacharydów (Cy3 czerwony i jądrowa niebieska nakładka fluorescencyjna Hoechst)



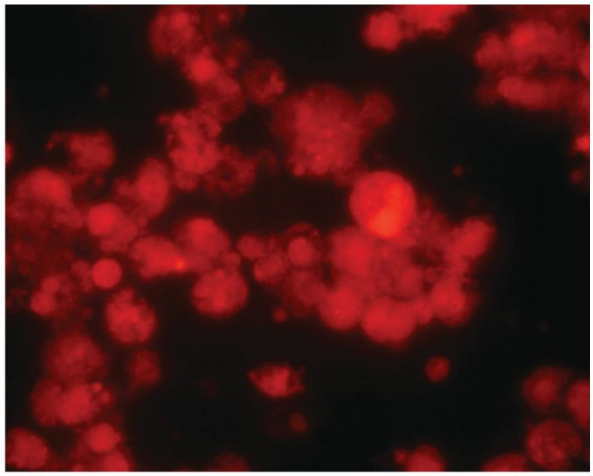
Rysunek 7 - komórkowy pobór DNA M059J po aktywacji lipopolisacharydów (10 ng/104 komórek) (Cy3 czerwony i jądro Hoechst niebieski nakładka fluorescencyjna).



Rysunek 8 - komórkowy pobór DNA M059J po aktywacji lipopolisacharydów (100 ng/104 komórek). (Cy3 czerwony i jądrowa niebieska nakładka fluorescencyjna Hoechst).



Rysunek 9 - U937 - spontaniczny komórkowy/ pobór jądrowego DNA (Cy3 czerwony)



Rysunek 10 - Oczyszczone jądra U937 zawierające DNA oznaczone Cy3 przed oczyszczeniem DNA (Cy3 Red)

Tabela 6

Porównanie 13-merowej obecności we wszystkich genach i genach związanych z autyzmem

Chromosom	% genów zawierających HS		% genów zawierających 13 mer w HS		% genów zawierających 13 mer	
	Wszystkie	AAGS	Wszystkie	AAGS	Wszystkie	AAGS
1	23.42%	50.00%	13.05%	27.78%	72.97%	72.22%
2	16.97%	62.50%	16.97%	45.83%	78.14%	95.83%
3	27.56%	60.87%	14.99%	52.17%	79.94%	86.96%
4	35.24%	50.00%	17.62%	32.14%	72.17%	78.57%
5	28.68%	36.67%	16.32%	20.00%	75.27%	83.33%
6	26.15%	33.33%	12.70%	23.33%	71.85%	83.33%
7	25.52%	63.00%	18.78%	54.00%	77.00%	97.00%
8	28.95%	53.85%	16.42%	30.77%	74.70%	92.31%
9	23.20%	75.00%	14.42%	62.50%	72.10%	75.00%
10	31.63%	60.00%	17.28%	40.00%	79.78%	90.00%
11	17.85%	36.00%	9.38%	24.00%	65.83%	92.00%
12	20.12%	37.50%	12.59%	37.50%	77.40%	100.00%
13	37.65%	77.78%	20.05%	66.67%	74.57%	88.89%
14	26.49%	66.67%	16.41%	66.67%	64.34%	100.00%
15	23.57%	46.67%	11.79%	46.67%	68.04%	86.67%
16	17.81%	46.15%	10.75%	38.46%	76.61%	92.31%
17	17.10%	26.67%	12.51%	20.00%	74.24%	100.00%
18	32.53%	0.00%	19.88%	0.00%	79.52%	100.00%
19	10.11%	0.00%	8.06%	0.00%	76.38%	100.00%
20	23.88%	44.44%	15.25%	33.33%	74.58%	77.78%
21	25.00%	100.00%	20.42%	100.00%	69.00%	100.00%
22	17.65%	11.11%	13.24%	11.11%	79.78%	100.00%
X	14.00%	45.00%	13.45%	39.00%	65.00%	95.00%
Średnio	**24.43%**	**47.10%**	**14.95%**	**37.91%**	**74.28%**	**90.75%**

Table 7

X Chromosome AAGs with 13 mers in exons and their distance from the closest hotspot (HS) start

Gene	Gene Start	Gene End	Motif Start	Motif End	Motif	Strand	Exon Start	Exon End	HS Start	HS End	Distance
NLGN4X	5808062	6146706	5821352	5821364	gtggccacggggg	-	5821117	5821907	5811910	5813910	7442
AFF2	147582138	148082193	148048477	148048489	ccaccatcacctc	+	148048319	148048609	148036319	148040319	8158
NLGN3	70364680	70391051	70386983	70386995	gtggatatggtgg	+	70386860	70387650	70371089	70377089	9894
MECP2	153267263	153363188	153296166	153296178	gtggtgatggtgg	-	153295685	153296901	153306976	153308976	10798
FRMPD4	12156584	12742642	12739916	12739928	ccaccatggccgc	+	12738647	12742642	12721454	12727454	12462
PHF8	53963112	54071569	54012352	54012364	ccacccatgtcctc	-	54012339	54012382	54025089	54033089	12725
RAB39B	154467525	154493852	154493567	154493579	cctccatggccgc	-	154493358	154493852	154478566	154480566	13001
FRMPD4	12156584	12742642	12736309	12736321	gaggcaaggtggg	+	12735619	12736909	12721454	12727454	14867
GRPR	16141423	16171641	16170710	16170722	cctccgtggccac	+	16170378	16171641	16208454	16211454	37732
AFF2	147582138	148082193	148079262	148079274	cccccgtcaccac	+	148072740	148082193	148036319	148040319	38943
SH3KBP1	19552082	19905744	19564111	19564123	cctcctatcctc	-	19564039	19564168	19610454	19614454	46331
PDZD4	153067622	153096003	153070331	153070343	cccccttctcctc	-	153067622	153070355	153013976	153018976	51355
SLC6A8	152953751	152962048	152960611	152960623	ccacccctgaccccc	+	152960528	152962048	153013976	153018976	53353
FMR1	146993468	147032647	147026533	147026545	gaggacaaggggg	+	147026463	147026571	147083193	147085193	56648
HNRNPH2	100663120	100669128	100668241	100668253	gtggttatggtgg	+	100666923	100669128	100725023	100727023	56770
HNRNPH2	100663120	100669128	100668229	100668241	gtggttatggtgg	+	100666923	100669128	100725023	100727023	56782
HNRNPH2	100663120	100669128	100667689	100667701	gaggcatggtggg	+	100666923	100669128	100725023	100727023	57322
FMR1	146993468	147032647	146993528	146993540	gcggtgcggtgcg	+	146990948	146993748	147083193	147085193	89653
CXCR3	70835765	70838367	70837189	70837201	gtggcaggccgg	-	70835765	70837309	71057089	71064089	219888
AR	66763873	66944119	66765398	66765410	ccgccgtggccgc	+	66763873	66766604	68319089	68321089	1553679