



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARININ
GENETİK ETİYOLOJİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Banu ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2014



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARININ
GENETİK ETİYOLOJİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Banu ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2014

ONAY SAYFASI

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Banu ÖZTÜRK’ün hazırladığı “OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ersan KALAY

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ersan KALAY

Prof. Dr. Sema TANRIÖVER KANDİL

Prof. Dr.Figen CELEP EYÜPOĞLU

Tarih:../../2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ../../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../...

Banu ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden sürekli istifade ettiğim, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı saydığım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ersan KALAY’a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için çalışmayı planlayan, örnek sağlayan ve hastaların klinik değerlendirmelerini yapan hocalarım başta sayın Prof. Dr. Sema TANRIÖVER KANDİL olmak üzere, Yrd. Doç. Dr. Selma HESAPÇIOĞLU’na çok teşekkür ederim. Ayrıca, Dr. Çilem BİLGİNER ve Dr. Zeynep GÖKER’e de teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU’na, Prof. Dr. Fahri Uçar’a ve Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER’e çok teşekkür ederim. Anabilim Dalımız emekli öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL’e de verdiği katkılardan dolayı teşekkür etmek isterim.

Tezimin araştırma süreci ve laboratuvar çalışmaları aşamasında büyük bir sabırla yardımcı olarak desteğini eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Dr. Bayram TORAMAN’a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tezimin kromozom analizi aşamalarının gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyip her zaman destek olan sayın Biyolog Tülay KÖSEAHMET ve Kimyager Fatmagül YENİSEY’e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim hayatını paylaştığım Anabilim Dalımız lisansüstü öğrencileri olan arkadaşlarım, Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK, Arş. Gör. Orhan Sezgin, Arş. Gör. Adem YILDIRIM, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU ve Arş. Gör. Burcu YÜCEL’e teşekkür ederim. Ayrıca, Figen SEYMEN ve Abide CANSIZ’a, ve diğer bölüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Son olarak, öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen anneme, kardeşime ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Banu ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

BEYAN

TEŞEKKÜR

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

4

4.1. Kromozomal Hastalıklar

4

4.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

4

4.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri

5

4.1.2.1. Dengesiz Yapısal Anomaliler:

5

4.1.2.2. Dengeli Yapısal Anomaliler

5

4.2. Tek-Gen Hastalıkları

6

4.2.1. Tek Gen Kalıtım Şekilleri

6

4.2.2. Otozomal Dominant Kalıtım

6

4.2.3. Otozomal Resesif Kalıtım

7

4.2.4. X'e Bağlı Resesif Kalıtım

7

4.2.5. X'e Bağlı Dominant Kalıtım

7

4.2.6. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar

8

4.3. Multifaktöriyel Hastalıklar

8

4.4. Otizm Spektrum Bozukluğu

8

4.4.1. Otizm Spektrum Bozukluğunun Etiyolojisi

9

4.4.1.1. Kromozomal Düzensizlikler

10

4.4.1.2. Submikroskobik Kopya Sayısı Değişiklikleri

10

4.4.1.3. Tek Gen Bozuklukları

12

4.4.1.4. Epigenetik Faktörler

15

4.4.1.5. Çevresel Faktörler

15

4.4.2. Otizm Spektrum Bozukluğunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılmasında Kullanılan

Yaklaşımlar

15

4.4.2.1. Konvansiyonel Karyotip Analizi Çalışmaları	16
4.4.2.2. Bağlantı Analizi Çalışmaları	16
4.4.2.3. Aday Gen Yaklaşımı Çalışmaları	16
4.4.2.4. Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları	17
4.4.3. Otizme Ait Güncel Kromozom, CNV, Gen Verileri Sağlayan Faydalı Siteler	17
5. GEREÇ VE YÖNTEM	18
5.1. Gereç	18
5.1.1. Çalışma Grubu	18
5.1.2. Kimyasallar	18
5.1.3. Cihazlar	19
5.1.4. Sarf Malzemeleri	20
5.1.5. Solüsyonlar	21
5.1.5.1. Kromozom Analizi Solüsyonları	21
5.1.5.2. DNA İzolasyon Solüsyonları	22
5.1.6. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Lamların Temizlenmesi	24
5.2. Yöntem	25
5.2.1. Kromozomların Elde Edilmesi	25
5.2.1.1. Periferik Kandan Lenfosit Kültürü ile Kromozomların Elde Edilmesi	25
5.2.1.2. GTG Bantlama Yöntemi ile Preparatların Boyanması	26
5.2.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	26
6. BULGULAR	29
6.1. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanısı Koyulan Hastaların Sitogenetik Analiz Sonuçları	29
6.1.1. del(22)q13.31-qter Düzensizliği	31
6.1.2. t(1;5)(p12;p15) Düzensizliği	32
6.1.3. t(1;9)(q22;q34) Düzensizliği	34
4.1.4. 46,XY,4(p14+?) Düzensizliği	35
4.1.5. 46,XYqh+,15p+,18p- Düzensizliği	36
4.1.6. 47,XY,+21 Trizomisi	37
4.1.7. Polimorfik Kromozomal Değişiklikler	38
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
9. KAYNAKLAR	53

EKLER	66
Ek 1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri	67
10. ETİK KURUL ONAYI	69
11. ÖZGEÇMİŞ	70

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Elde edilen kromozom analizi sonuçları	30
Tablo 2.	Çalışmaya dahil edilen hasta bilgileri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	CNV'lerin kromozomlar üzerindeki dağılımları	12
Şekil 2.	Otizm spektrum bozukluğunun genetik etiyolojisine katkısı olan genler	13
Şekil 3.	Otizmle ilişkili genlerin yer aldığı sinaps yapısı ve yer alan proteinler	14
Şekil 4.	OSB'de etkilenen temel beyin bölgeleri	14
Şekil 5.	OT_28 kodlu hastaya ait 46,XY,del(22)(q13.31-qter) karyotipi	31
Şekil 6.	OT_88 kodlu hastaya ait 46,XY,del(22)(q13.31-qter) karyotipi	32
Şekil 7.	OT_49 kodlu hastaya ait 46,XY,t(1;5)(p12;p15) karyotipi	33
Şekil 8.	t(1;5)(p12;p15) translokasyonunun ailede kalıtımı	33
Şekil 9.	OT_102 kodlu hastaya ait t(1;9)(q22;q34) karyotipi ve ailede kalıtımı	34
Şekil 10.	OT_97 kodlu hastaya ait 46,XY,4(p14+?) düzensizliği	35
Şekil 11.	OT_82 kodlu hastaya ait 46,XYqh+,15p+,18p- düzensizliği	36
Şekil 12.	OT_15 kodlu hastaya ait 47,XY,+21 karyotipi	37
Şekil 13.	OT_62 kodlu hastaya ait 46,XY,inv(9)(p13;q21) karyotipi	38

KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

ACRD	Otizm Kromozom Düzensizlik Veritabanı
Array-CGH	Array Tabanlı Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CARS	Çocukluk Otizmi Derecelendirme Örneği
CNV	Kopya Sayısı Değişikliği
DB	DNA Bankası
DEHB	Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
dH₂O	Distile Su
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
DSM-IV	Ruhsal Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel Kılavuzu, Dördüncü Baskısı
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik Asid
ELB	Eritrosit Lizis Tamponu
GWAS	Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları
NOR	Nukleolar Organizer Bölgeler
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
YGB	Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
YGB-BTA	Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk

1. ÖZET

Otizm Spektrum Bozukluklarının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB); sosyal, iletişimsel ve bilişsel gelişimde geriliklerin görüldüğü nöropsikiyatrik bir bozukluktur. OSB sık görülen genetik temelli nöropsikiyatrik bozukluklardan biri olup görülme sıklığı yaklaşık %1'dir. OSB etiyolojisinde kromozomal anomaliler, kopya sayısı değişiklikleri (CNV) ve tek gen mutasyonları önemli bir yer tutmaktadır. Kromozomal anomalilerin OSB olgularının %3-12'sinde tabloya eşlik ettiği gösterilmiştir. Kromozomal düzensizlik ve CNV'lerin etkilediği genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalardan yola çıkılarak bugüne kadar 10'dan fazla gen OSB ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada otizmin genetik etiolojisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, DSM-IV tanı kriterlerine göre OSB tanısı konulan ve Childhood Autism Rating Scale (CARS) ölçeğine göre şiddet değerlendirmesi yapılmış olan 185 hastada periferik kandan konvansiyonel sitogenetik analiz yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 185 hastadan 131'inin karyotipi belirlenirken 54'ünde kromozom analizi için yeterli metafaz edilemedi. Karyotip analizi sonucunda iki hastada, "22q13.31-qter" delesyonu gözlenmiş olup kromozomun bu bölgesi mutasyon ve delesyonlarının OSB'ye neden olduğu bilinen *SHANK3* genini içermektedir. İki hastada dengeli translokasyon 46,XY,t(1;5)(p12;p15) ve 46,XY,t(1;9)(q22;q34) gözlenirken bir hastada 46,XY,4(p14+?) karyotipi, bir hastada 46,XYqh+,15p+,18p- karyotipi ve bir hastada da sayısal anomali 47,XY,+21 görüldü. On dokuz hastada ise sağlıklı populasyonda da sıklıkla gözlenen ve herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiş olan çeşitli kromozomal polimorfik değişiklikler gözlendi.

Sonuç olarak, yedi hastada (%5.3) OSB ile ilişkili olabilecek kromozomal anomali gözlendi. Literatürle uyumlu olarak "22q13.31-qter" delesyonunun OSB'nin etiyolojisinde önemli bir yere sahip olduğu görüldü. Gözlenen dengeli kromozomal düzensizliklerin ise OSB ile ilişkili yeni genlerin tanımlanması sürecinde kritik öneme sahip olduğunu düşünmekteyiz ve bu düzensizliklerdeki kırık bölgelerini tanımlamaya yönelik çalışmalarımız devam etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Otizm Spektrum Bozukluğu, Otizm, Kromozomal Anomali

2. SUMMARY

Investigation Of The Genetic Etiology Of Autism Spectrum Disorders

Autism spectrum disorders (ASD) is a neuropsychiatric disorder characterized by social, communicative and cognitive developmental delays. ASD is one of the most frequent inherited neuropsychiatric disorder with prevalence of about 1 %. Chromosomal anomalies, copy number variations (CNV) and point mutations play important role in the etiology of ASD. In about 3-12% of ASD patients chromosomal rearrangements were shown and evaluation of these rearrangements revealed more than 10 genes associated with ASD.

In order to investigate the genetic etiology of ASD we applied conventional cytogenetic analysis to 185 ASD patients who were diagnosed as ASD and further ranked for the severity of disease according to DSM-IV diagnosis criteria and Childhood Autism Rating Scale (CARS) respectively.

Here, we karyotyped 131 of 185 ASD patients. In 54 patients appropriate metaphase plates for karyotyping could not be obtained. In two patients, deletion of 22q13.31-qter region including *SHANK3* gene were found. While in two patients, balanced translocation 46,XY,t(1;5)(p12;p15) and 46,XY,t(1;9)(q22;q34) were observed, in one patient 46,XY,4(p14+?) karyotype, in one patient 46,XYqh+,15p+,18p- karyotype and in one patient numerical rearrangement 47,XY,+21 were observed. In 19 patients various known polymorphic chromosomal changes which is frequently observed in healthy population were seen.

Consequently, here we found seven (5.3%) different chromosomal anomalies that might be related to ASD. Consistent with the literature, “22q13.31-qter” deletion has important contribution to the etiology of ASD in our study. Both balanced translocations were considered as critically important finding that might provide remarkable opportunity to identify new genes associated with ASD. Therefore, our studies that focus on determination of breakpoints of these rearrangements are still going on.

Key words: Autism Spectrum Disorder, Autism, Chromosomal Anomaly

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), üç yaşından önce ortaya çıkan tekrarlayıcı ve stereotipik davranışların eşlik ettiği, sosyal ve iletişimsel bozukluklarla karakterize, heterojen bir grup nörogelişimsel hastalıktır (1). OSB, etiyolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı kompleks bir hastalıktır (2). OSB gibi kompleks hastalıklar Mendeliyen hastalıklar gibi düzenli kalıtım göstermemektedir (2, 3). Hastalığın kompleks kalıtımı ve heterojenitesi genetik temelinin araştırılmasının önündeki en önemli sorundur. Bu nedenle OSB'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında çok fazla mesafe kaydedilememiştir. Kompleks hastalıklara yatkınlık oluşturan genlerin tanımlanmasında, düzenli kalıtım gösteren tek gen hastalıklarında olduğu gibi, bağlantı analizi yönteminin kullanılması verimli olmamaktadır (4). Bu hastalıkların genetik etiyolojisinin aydınlatılmasında karyotip analizleri ile tanımlanan kromozomal düzensizlikler, mikro-array tabanlı kopya sayısı değişiklikleri (copy number variations=CNV) çalışmaları ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) önemli yaklaşımlar olmuştur (4, 5). Bugüne kadar birçok gen bu yöntemlerle OSB ile ilişkilendirilmiştir ve ilişkilendirilmeye devam etmektedir (4). Kromozom analizi bu çalışmalar arasında en kolay uygulanabilen ve etkin sonuca ulaşılabilme şansı olan yöntemdir. OSB'nin gelişiminde rol aldığı gösterilen genlerin önemli bir kısmı kromozomal düzensizliklerden yola çıkılarak tanımlanmıştır (6). Günümüzde OSB'nin etiyolojisinde aydınlatılmayı bekleyen daha çok sayıda gen olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, uzun süreli tedavi ve özel eğitim gerektiren ve yaşam kalitesini şiddetli bir şekilde düşüren OSB'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılması sürecine katkı sağlamayı amaçlamıştır. Bu amaçla OSB tanısı koyulmuş hastalarda sorumlu genlerin tanımlanmasına katkı sağlayacak kromozomal düzensizliklerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma grubunda kromozomal düzensizlik bulunması durumunda bu düzensizliklerin hangi genleri etkilediğini belirlemek üzere ileri moleküler çalışmalar planlanacaktır. Ayrıca, konvansiyonel kromozom analizi yöntemi ile kromozomal düzensizlik görülen ve görülmeyen hastalardan ve bu hastaların anne-babasından, ileride planlanacak olan mikro array teknolojisine dayalı moleküler yöntemler ile kopya sayısı değişikliği çalışmalarına alt yapı sağlamak üzere DNA örneği arşivi oluşturulması planlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

Hastalıkların büyük bir kısmının etiyolojisini genetik faktörler oluşturmaktadır. Genetik faktörlerin rol oynadığı hastalıklar, genetik materyalin etkilenme şekline bağlı olarak; *i)* kromozomal hastalıklar, *ii)* tek-gen hastalıkları ve *iii)* multifaktoriyel hastalıklar olmak üzere üç grup altında değerlendirilmektedir (7).

4.1. Kromozomal Hastalıklar

Kromozom; genleri üzerinde taşıyan nükleik asit zincirlerinin proteinlerle paketlenmesi ile oluşan yapılardır. Normal bir insan somatik hücresinde $2n=46$ (diploid) kromozom bulunur. Bütün gebeliklerin yaklaşık %7.5'inde, canlı doğumların yaklaşık %0.6'sında ve erken spondan düşüklerin %50-60'ında kromozomal bozukluklar görülmektedir (8, 9). Kromozomal düzensizlikler, sayısal ve yapısal olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir (8).

4.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

Kromozomlarda sayısal düzensizlikler; bir hücre içindeki kromozomların sayısının normalde olması gereken diploid sayıdan ($2n=46$) farklı olması durumudur. Sayısal kromozom değişiklikleri, haploid sayının tam katları olarak artması (poliploidi) şeklinde olabildiği gibi, bir veya birkaç kromozomun artması ya da eksilmesi (anöploidi) şeklinde de olabilmektedir (9).

Poliploidilerin en sık görülen tipleri triploidi ($3n=69$) ve tetraploidi ($4n=96$) olup bu düzensizlikler genellikle erken dönem düşüklerle sonlanmaktadır (9).

Anöploidler, poliploidilere göre canlı doğumlarda daha sık görülmektedir. Kromozomların önemli bir kısmının anöploidik durumu yaşamla bağdaşmamaktadır. Canlı doğumlarda görülen anöploidler $47,XX,+21$ (Down Sendromu), $45,X$ (Turner sendromu), $47,XXY$ (Klinefelter sendromu), $47,XYY$, $47,XXX$ (Trizomi X), $47,XY,+18$ ve $47,XX,+13$, olarak saymak mümkündür. Trizomi 18 ve trizomi 13 canlı doğumlarda görülse bile ilk 1 yıl içinde çoklu konjenital anomaliler (MKA) nedeniyle kaybedilmektedirler. Trizomi 16 canlı doğumlarda gözükmemektedir (8).

4.1.2. Yapısal Kromozom Anomalileri

Yapısal kromozomal anomalileri, bir ya da daha fazla kromozomun yapısında meydana gelen düzensizlikleri ifade etmektedir. Yapısal anomaliler, genomik materyalde artma ya da azalmaya neden olunması durumunda *dengesiz yapısal anomaliler* olarak adlandırılırken, genetik materyalde artma ya da azalma olmaması durumunda *dengeli yapısal anomaliler* olarak adlandırılmaktadır. Dengesiz yapısal anomaliler; delesyon, duplikasyon, halka kromozom, izokromozom, disentrik kromozom başlıkları altında incelenmektedir. Dengeli yapısal anomaliler ise inversiyon, translokasyon başlıkları altında incelenmektedir (8).

4.1.2.1. Dengesiz Yapısal Anomaliler:

Genomik materyalde artma veya azalmaya neden olan düzensizlikler dengesiz yapısal anomaliler olarak adlandırılır. Kromozomun bir kısmının kaybı dolayısıyla kromozom dengesizliği oluşuyorsa bu duruma *delesyon* denir. Eğer kaybın olduğu kırılma noktası kromozomun uç kısmında ise *terminal delesyondan*, kromozomda oluşan kırık sonucunda kopan parça aradan çıktıktan sonra geriye kalan yapışkan uçların yeniden kaynaşması ile bir delesyon oluşmuş ise *interstisiyel delesyondan* söz edilmektedir (8, 10). Bir başka dengesiz yapısal anomali olan *duplikasyonlarda* ise normalde tek kopya olan kromozomun belli bir bölgesinde kendini tekrar etme söz konusudur (8, 10). Kromozomun her iki kolunun uçlarında kopma meydana geldiğinde bu bölgelerin yapışkan hale geçerek birleşmesiyle *halka kromozomlar* meydana gelmektedirler (8, 10). Dengesiz yapısal anomalilerden olan diğer bir kromozomal düzensizlik, sentromerlerin boyuna bölünmek yerine enine bölünmesi sonucunda kalan parçanın kendini duplike etmesiyle meydana gelen *izokromozomlardır* (8, 10). Sentromeri bulunan iki kromozom parçasının sentromeri bulunmayan parçalarını kaybederek uç uca eklenmeleriyle oluşan, nadir görülen bir kromozom düzensizliği olan *disentrik kromozomlar* da dengesiz yapısal anomalilerdendir (8, 10).

4.1.2.2. Dengeli Yapısal Anomaliler

Dengeli yapısal anomaliler, kromozom üzerinde herhangi bir parça kaybına neden olmayan düzensizliklerdir. Dengeli yapısal anomalilerden olan *translokasyonlar*, bir kromozomdan kopan parçanın başka bir kromozoma yerleşmesi olayı olup bu süreçte genetik materyal kaybı yok ise dengeli, aksine parça kaybı var ise dengesiz

translokasyon söz konusudur (8, 10). *Dengeli translokasyonlar*, kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesi ile oluşmaktayken; *dengesiz translokasyonlar*, akrosentrik kromozomların kısa kollarının kaybolması, uzun kollarının birleşmesi sonucu meydana gelmektedirler (8, 10). Dengeli yapısal anomalilerin diğer türü olan *inversiyonlar*, bir kromozoma ait bir segmentin ters dönerek tekrar aynı kromozoma eklenmesiyle oluşan kromozom anomalileridir. (8). Etkilenen kromozom parçası sentromeri içeriyor ise *perisentrik*, sentromer içermiyor ise *parasentrik* olarak tanımlanmaktadırlar (10).

4.2. Tek-Gen Hastalıkları

Tek gen hastalıkları, mendeliyen kalıtım kalıbı gösteren hastalıklar olup, bu tip hastalıkların ortaya çıkması için tek bir genin bozulması yeterlidir. Farklı lokuslardaki genlerin aynı hastalığa neden olduğu durumlar da vardır. Bu durumda lokus heterojenitesi söz konusudur. Bununla birlikte aynı lokustaki farklı alleller aynı hastalığa da neden olabilmektedir ve bu durum da allelik heterojenite olarak adlandırılmaktadır (8, 11).

4.2.1. Tek Gen Kalıtım Şekilleri

Hücrelerde bir çift olarak bulunan genler bir sonraki kuşağa, anne ve babadan birer allel olacak şekilde aktarılır. Bir bireyin, birbirinin aynısı bir çift allele sahip olması durumu homozigotluk, bir normal bir mutant allele sahip olması durumu heterozigotluk, iki farklı mutant allel taşıması durumu da kompond (bileşik) heterozigotluk olarak adlandırılır. Bu terimler hem bireyler için hem de genotip için kullanılmaktadır (8, 11).

Tek gen hastalıklarının kalıtım kalıbı iki önemli faktöre bağlıdır. Bunlar; a) gen lokusunun otozomal veya cinsiyet kromozomlarında lokalize olması ve b) özelliğin dominant veya resesif olması. Buna bağlı olarak tek gen hastalıklarının kalıtımı; otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı dominant ve X'e bağlı resesif olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadır (8, 11).

4.2.2. Otozomal Dominant Kalıtım

Hastalığın ortaya çıkması için mutasyonun tek bir allelde taşınması yeterlidir. Hastalık cinsiyet ayrımı yapmaz ve hasta bir bireyin çocuğunun hasta olma olasılığı %50'dir. Hastalık kuşak atlamadan kalıtılır. Ancak mutant allelin taşınmasına rağmen

hastalığın fenotipe yansıtılmadığı halde hastalığın bir sonraki kuşakta ortaya çıktığı durumlar da vardır. Bu durum penetrans eksikliği olarak adlandırılır (8, 11).

4.2.3. Otozomal Resesif Kalıtım

Bu tip kalıtım kalıbı gösteren genetik özellikler hem anneden hem de babadan gelen mutant genin çocukta bir araya gelmesi sonucunda ortaya çıkar. Yani özelliğin fenotipe yansması için her iki allelin de mutant olması gerekmektedir. Akriba evliliklerinin sık olduğu toplumlarda bu tip özelliklerin ortaya çıkma ihtimali daha yüksektir. Hastalık cinsiyet ayrımı yapmaz. Taşıyıcı bir anne ve taşıyıcı bir babanın çocuklarının hasta olma olasılığı %25'dir. Aile ağacında, akrabalık hikâyesi ve tek bir kuşakta birden fazla hasta bireyin görülmesi otozomal resesif kalıtımı desteklemektedir (8, 11).

4.2.4. X'e Bağlı Resesif Kalıtım

Dişilerde iki adet X kromozomu olduğu için genetik özelliğin tek bir X kromozomunda taşınması fenotipe yansması için yeterli değildir. Ancak bu bireyler taşıyıcı olurlar. Fakat çok nadir de olsa dişilerde aktif olan X kromozomundaki bir gende mutasyon olması durumunda ortaya çıkan genetik özellikler de bulunmaktadır. Erkekler ise bir X ve bir de Y kromozomu taşımaktadırlar. Erkeklerde X kromozomunda mutant bir genin bulunması halinde, söz konusu genin fonksiyonunu dengeleyecek ikinci bir X kromozomu bulunmadığı için özellik fenotipe yansır. Böylelikle bu kalıtım kalıbında genellikle erkeklerde hastalık fenotipe yansırken, dişiler ise normal fakat taşıyıcıdır (8, 11).

4.2.5. X'e Bağlı Dominant Kalıtım

Bu şekilde kalıtılan özelliklerde X kromozomundaki allellerden sadece birinin mutant olması özelliğin ortaya çıkması için yeterlidir. X'e bağlı resesif kalıttan farklı olarak heterozigot dişilerde özellik fenotipe yansır. Özellik erkeklerde hemizigot durumda ortaya çıkarken, dişilerde heterozigot durumda ortaya çıkar. X inaktivasyonu dişilerde genetik özelliğin şiddetinin daha hafif olmasına neden olur. Özelliğin ailesel geçişi tamamen otozomal dominant kalıttan benzer, tek fark hasta erkeklerin erkek çocuklarında hastalığın görülmeyişidir. Hasta annenin çocuklarında hastalığın görülme riski %50 olmakla birlikte hastalık dişi ve erkek çocuklarda eşit dağılım gösterir (8, 11).

4.2.6. Tek Gen Hastalıklarına Neden Olan Mutasyonlar

DNA molekülündeki kalıcı değişiklikler mutasyon, bu değişiklikler sonucu oluşan ürünler mutant olarak adlandırılmaktadır. Tek gen hastalıklarına neden olan mutasyonlar oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Tek bir nükleotidin değişmesi sonucu oluşan mutasyonlar “nükleotid değişimleri”, bir veya daha fazla nükleotidin kaybolması “delesyon”, artması ise “insersiyon” olarak adlandırılmaktadır. Splicing mekanizmasını bozan mutasyon “splicing bölge mutasyonları” ve tekrar dizilerindeki artışı ifade eden “dinamik mutasyonlar” da tek gen mutasyonlarına örnek olarak verilebilir (11).

4.3. Multifaktöriyel Hastalıklar

Multifaktöriyel hastalıklar, genetik bozukluklar ile çevresel olumsuzlukların etkileşimi, birden fazla genetik bozukluğun birlikteliği veya birden fazla genetik bozukluk ile çevresel etkilerin bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır. Bu grup hastalıklarda düzenli bir kalıtım görülmezken, hasta bir bireyin bulunduğu bir ailede ikinci bir bireyin hasta olma riski genel popülasyona göre artış göstermektedir (11).

4.4. Otizm Spektrum Bozukluğu

Otizm Spektrum Bozukluğu, etkileşim ve iletişim alanında belirgin gecikme ve sapmalar görülen, kısıtlı ilgi alanı ile karakterize ve genetik faktörlerin önemli rol oynadığı kompleks bir etiyolojiye sahip bir grup nörogelişimsel bozukluktur (1).

1980’lerin başlarında yapılan çalışmalarla OSB’nin yüksek kalıtsallığı ve başka genetik sendromlarla birlikteliği farkedilmiştir (12). Otizm, 1980’de “infantil otizm”, 1987’de “otistik bozukluk” ve günümüzde ise genellikle “otizm” ya da şemsiye terim “Otizm Spektrum Bozukluğu” olarak yeniden adlandırılmıştır (13).

OSB, psikiyatrik sınıflandırma sistemleri içinde ilk kez DSM-III (third edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)’te yerini almıştır (1). DSM-IV’te “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar (YGB)” grubunda yer alan 5 nöropsikiyatrik bozukluktan biridir. Yaygın Gelişimsel Bozukluk (YGB), üç yaşından önce ortaya çıkan tekrarlayıcı ve stereotipik davranışların eşlik ettiği, sosyal ve iletişimsel bozukluklarla karakterize, heterojen bir grup nörogelişimsel hastalıktır (14, 15). YGB, ICD-10 (Hastalıkların Uluslararası Sınıflaması 10. baskısına) ve DSM-IV (Ruhsal Hastalıkların Tanısal ve İstatistiksel Kılavuzu, 4. baskısına) tanı kriterlerine göre; *Otistik Bozukluk*

(OMIM# 209850), *Asperger Sendromu* (OMIM# 608638), *Rett Sendromu* (OMIM# 312750) *Çocukluk Çağı Dezintegratif bozukluğu* ve *Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk (YGB-BTA)* olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır (14, 16). Otistik Bozukluk, Asperger Sendromu ve Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar birçok araştırmacı tarafından hastalığın şiddetine, entelektüel işlevselliğe ve tıbbi durumlara göre çeşitlilik gösteren aynı hastalığın devamı şeklinde kabul edilmekte ve OSB (Otizm Spektrum Bozuklukları) olarak adlandırılmaktadır (1, 17). 2013 Mayıs ayında güncellenerek yayınlanan DSM-V kriterlerinde yine YGB grubunda yer alan OSB, bünyesinde “Otistik Bozukluk”, “Asperger Sendromu” ve “Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar”ı (YGB-BTA) barındırmaktadır (18). Asperger sendromu, OSB’nin bir parçasıdır ancak, 3 yaşından önce gelişimsel bozukluk belirgin değildir, erken dönem dil gelişiminde otizmde görülen gecikme ve sapmalara rastlanmaz ve bilişsel işlevlerde otizme göre daha az bozulma olduğu bilinmektedir (1, 19). YGB-BTA da otizme benzer gelişimsel ve davranışsal sorunlarla karakterize olmakla birlikte, bilişsel ve iletişim becerileri, otizmi olan çocuklardan daha iyidir ve bilgi konuşma gibi Asperger sendromunu düşündüren bulgular içermemektedir (1, 19). Otizme göre 1,5 kat daha sık görülmektedir (1).

4.4.1. Otizm Spektrum Bozukluğunun Etiyolojisi

OSB, kompleks ve yaygın bir hastalık olup prevalansı yaklaşık olarak %1’dir ve erkek çocukları kız çocuklara oranla yaklaşık olarak 4 kat daha fazla etkilemektedir (4). İkiz çalışmaları monozigotik ikizlerde %60-90 arasında uyum olduğunu göstermektedir (20-22). Ayrıca otistik bir çocuğun kardeşinin de otistik olma riski %2-3 oranında olmaktadır (23). Bunun yanında, OSB kliniğinin ortaya çıkmasında birbirleriyle etkileşen birden fazla gen üzerindeki bozukluğun etkili olabileceği öngörülmüştür (24). Tek bir gendeki mutasyon veya mutasyonların eşlik ettiği OSB vakaları, tüm vakaların ancak %1-2’sini oluşturmaktadır (25). OSB ile ilişkilendirilmiş bazı genler ve lokuslar, zeka geriliği, epilepsi, şizofreni, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu gibi pek çok hastalıkla da ilişkilendirilmiştir (26). Bu çalışmalar OSB’nin genetik etiolojisinin çok karmaşık olduğunu, bağlantı gösterilen bölgelerdeki genlerin mutasyonlarının kişinin genetik yapısı dolayısıyla farklı klinik tabloları ortaya çıkarabileceğini göstermektedir (27).

4.4.1.1. Kromozomal Düzensizlikler

Konvansiyonel kromozom analizleri; translokasyon, inversiyon, delesyon ve duplikasyon gibi yapısal kromozom anomalilerinin OSB'li hastaların %3–12'sinde etkili olduğunu ve böylece kromozomal düzensizliklerin OSB'nin genetik etiyolojisinde önemli rol oynadığını göstermiştir (28-32). OSB'li hastalarda günümüze kadar gözlenmiş 1600 civarında yapısal kromozomal düzensizlik bulunmaktadır (ASD Chromosome Rearrangement Database, “<http://projects.tcag.ca/ASD/>”) (6). OSB'nin etiyolojisinde en sık gözlenen kromozomal düzensizlikler çoğunlukla maternal kalıtılan 15q11-q13 duplikasyonudur (33, 34). Bunu kromozom 2q37 ve 7q31'in delesyonları ve 22q13'ün delesyon ve duplikasyonları izlemektedir (35-38).

Kromozomal anomalilerden yola çıkılarak ikna edici bir biçimde en çok sorumlu bulunan genler kromozom 22q13'teki *SHANK3*, X kromozomun üzerinde yer alan *NLGN3* ve *NLGN4* genleri ve kromozom 2p16'daki *NRXN1* genidir (6, 39-41). Bağlantı analizi ve ilişkilendirme çalışmaları, 3q25-q27 bölgesinde *ASPG1* ve 3p24-p21 bölgesinde *ASPG3* lokuslarını Asperger sendromu ile ilişkilendirmiştir (42). Hastalık ile ilişkilendirilen *ASPG2* lokusu ise dengeli kromozomal düzensizliklerden yola çıkılarak 17p13 bölgesinde tanımlanmıştır (43, 44). Aday gen yaklaşımı çalışmaları, daha önce otizm ile ilişkilendirilmiş olan *NLGN3* ve *NLGN4* genlerinin Asperger sendromuna da neden olduğunu göstermiştir (39). Atipik otizm ile ilgili olarak da bir bireyde *RAB11FIP5* geninin dengeli bir translokasyon sonucu kırıldığı kromozom analizi ile gösterilmiştir (45). Ancak bulunan kromozomal düzensizliklerden çoğunun etkilemiş olduğu genler henüz tanımlanamamıştır.

4.4.1.2. Submikroskobik Kopya Sayısı Değişiklikleri

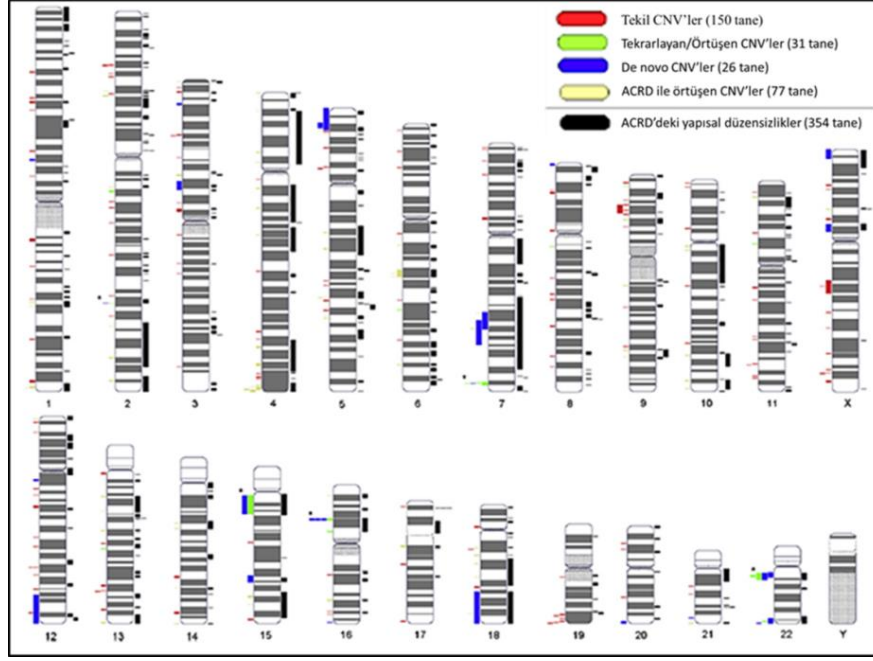
Konvansiyonel kromozom analizi ile 4Mb çözünürlüğündeki kromozomal düzensizlikler tespit edilebilmektedir ancak array-CGH (array-comparative genomic hybridization) teknolojisinin gelişmesiyle submikroskopik düzeydeki kopya sayısı değişikliklerinin (copy number variations = CNV) tespiti mümkün hale gelmiştir. Bir kopya sayısı değişikliği, referans genomla kıyaslandığında değişken bir kopya sayısı gösteren 1kb'dan daha uzun DNA segmentidir (46). Bir CNV; delesyon, insersiyon, duplikasyon ya da kompleks bir değişiklik olabilir. Kalıtsal olabildiği gibi maternal ya da paternal kalıtılan bir kromozomda *de novo* olarak da oluşabilir. *De novo* CNV'lerin

%7'den %28'e kadar değişen oranda OSB'de etkili olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (6, 47, 48)

Bir CNV'nin patolojik olabilmesi için, gelişimin önemli bir moleküler yolağındaki bir geni veya genleri etkiliyor olması gerekmektedir. CNV'ler delesyon olması durumunda artmış ya da azalmış transkripsiyondan dolayı bir gen ürünün transkripsiyon oranını değiştirebilir, resesif bir mutasyonun etkisini ortaya çıkarabilir ya da bir genin kodlayan dizisini değiştirebilir. Son yayınlar bazı CNV'lerin OSB'li hastalarda daha sıklıkla gözlendiğini göstermiştir. Daha sıklıkla gözlenen bu CNV'ler, 1q21, 2p16.3, 3p25-26, 7q36.2, 15q11-13, 16p11.2, 22q11.2 kromozom bölgelerinde lokalizedir ve bu bölgeler OSB'ye neden olduğu bilinen veya ilişkilendirilen *SHANK3*, *NLGN1*, *NLGN3*, *NLGN4*, *DPP10*, *ASTN1*, *BZRAP1*, *PCDH10*, *CNTNAP2*, *CNTN3*, *NRXN1*, *CNTN4*, *DPP6*, *UBE3A*, *OR4M2*, *OR4N4*, *MAPK3*, *MAZ*, *DOC2A*, *SEZ6L2*, *HIRIP3* ve *IL6* genlerini içermektedirler (37).

Yapısal kromozomal düzensizliklerinin tarandığı bir çalışmada 427 OSB hastasında, sağlıklı bireylerde görülmeyen 227 (%44) kopya sayısı değişikliği tanımlanmıştır (6). Başka bir çalışmada ise 196 hastada 255 CNV tanımlamıştır (49). Bulunan bütün bu CNV'lerin genom boyunca dağılımları şekil 1'de gösterilmiştir (6).

Sonuç olarak, pek çok çalışma ile CNV'lerin de OSB'nin genetik etiyolojisinde belirgin rol oynadığı gösterilmiştir. Standart koryotipleme ve array-CGH analiz verileri birleştirildiğinde genomik düzensizliklerin OSB'nin genetik etiyolojisinde büyük oranda etkiye sahip olduğu görülmektedir (6, 32).

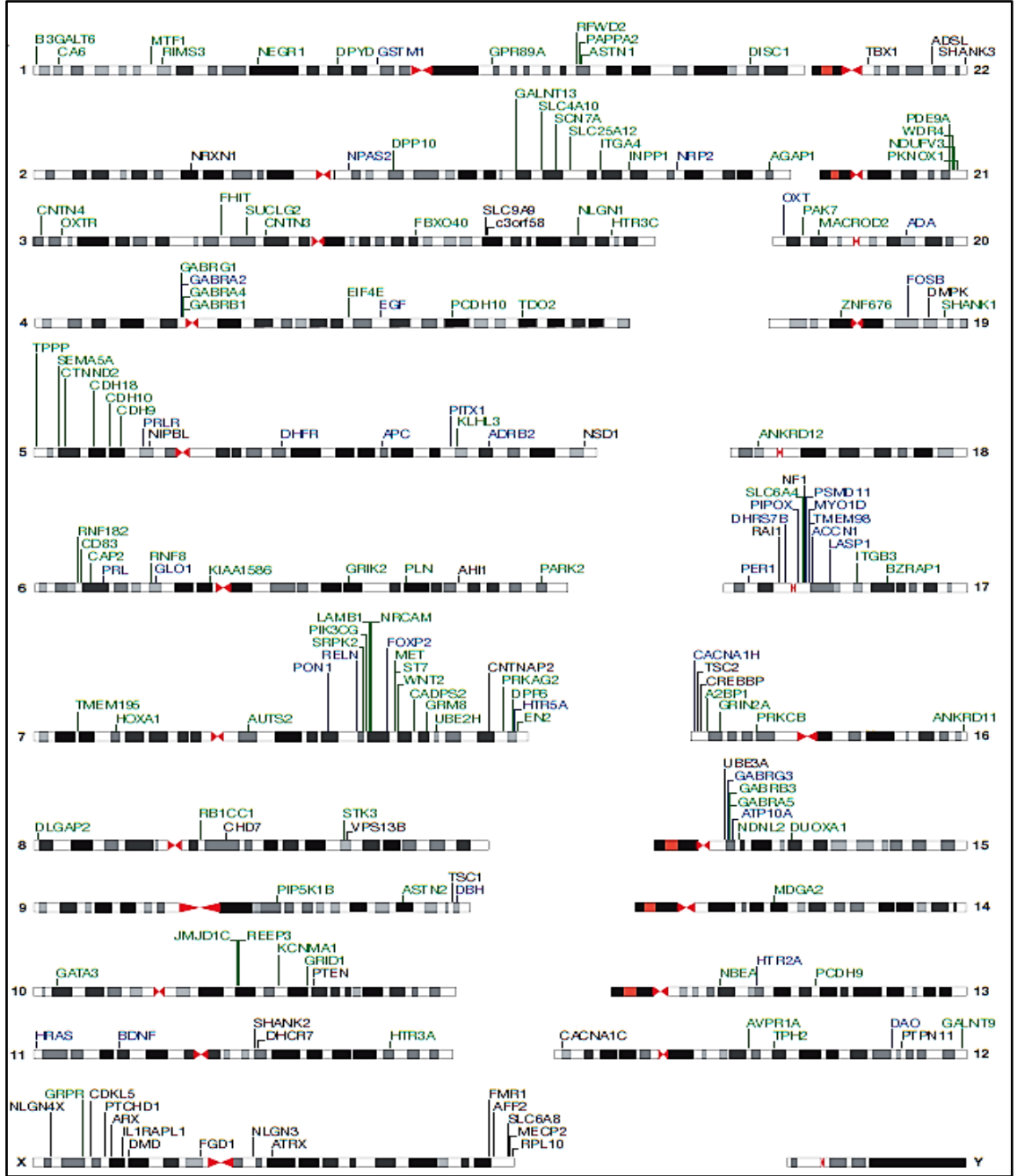


Şekil 1. CNV'lerin kromozomlar üzerindeki dağılımları: Otizm Kromozomal Düzensizlikler Veritabanı (Autism Chromosome Rearrangement Database=ACRD)'ndan elde edilen CNV'ler kromozomların sağ tarafına "siyah", OSB'ye spesifik CNV veritabanından elde edilen de novo CNV'ler her kromozomun sol tarafında "mavi", tekrarlayan/örtüşen CNV'ler "yeşil", ACRD ile örtüşen CNV'ler "sarı", tekil görülen CNV'ler "kırmızı" renk kullanılarak belirtilmiştir (Marshall'dan, 6).

4.4.1.3. Tek Gen Bozuklukları

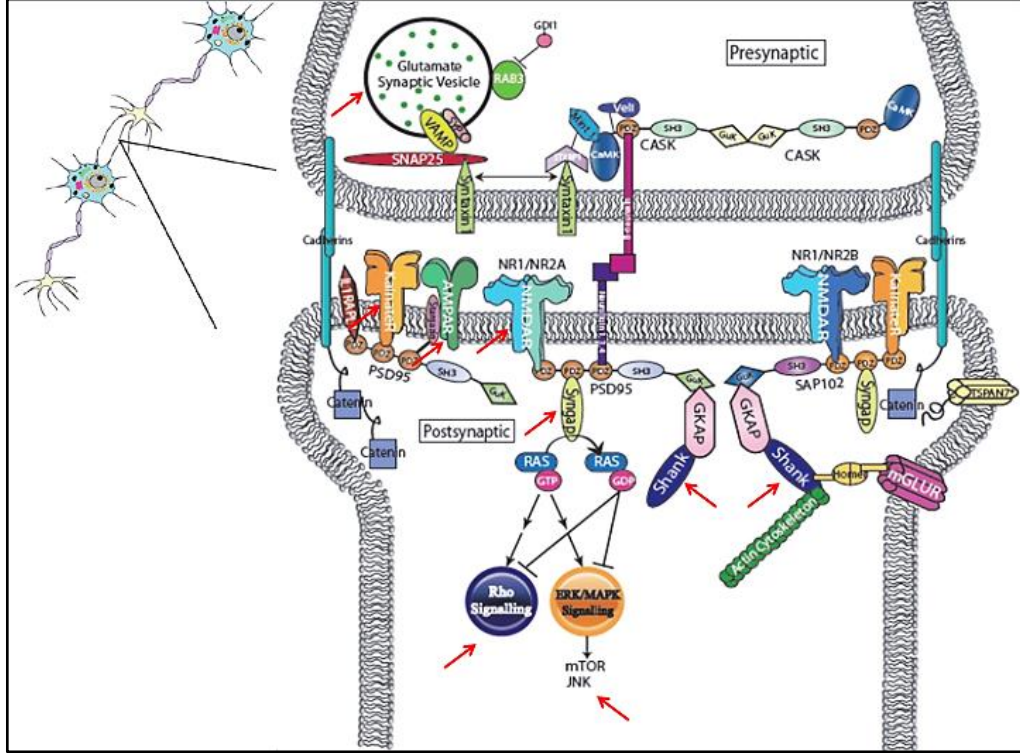
OSB ile tek gen bozukluklarının birlikteliği çok uzun zamandır bilinmektedir. OSB ile birlikte en sık görülen tek gen bozuklukları Tuberoz Sklerozis (*TSC1/TSC2*; %1) ve Frajil X Sendromudur (%3–5) (37). Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) çalışmalarında birçok kromozomal lokustaki genler OSB ile ilişkilendirilmiştir (4, 50). Bir çalışmada OSB'li hastalarda *SHANK3* geni üzerinde çerçeve kaymasıyla sonuçlanan bir tek nükleotid değişimi tespit edilmiştir (40). Başka bir çalışmada, OSB'li hastalarda belirgin bir şekilde *SHANK3* varyasyonları olduğu ve CNV'lerin yanında *SHANK3* üzerinde bir takım nokta mutasyonlarının da olduğu bildirilmiştir (41). Benzer bir şekilde, bir diğer çalışmada OSB'ye belirgin yatkınlık gösteren *SHANK2* geni üzerinde nadir nokta mutasyonları belirlenmiştir (51). OSB'li bireylerde diğer genlerin de detaylı sekanslanması yapıldığında X-linked genler olan *NLGN3*, *NLGN4* ve *NLGN4Y* üzerinde çerçeve kayması mutasyonu sonucu stop kodon oluşması durumuna ve farklı ailelerde *NLGN4* geni üzerinde bir missense mutasyon oluşumuna rastlanmıştır

(52). Bir başka çalışmada, *NRXN1* ve *NRXN2* genlerinde tespit edilen mutasyonların *LRRTM2* ve *NLGN2* genlerini de etkilediği bulunmuştur (53). *FOXP1*, *PCDH19*, *GRIP1* ve *Glu2A* genleri de nokta mutasyonları açısından OSB'nin etiyolojisine katkıda bulunan genlerdir (4). OSB ile ilişkilendirilmiş, aday gösterilmiş ya da doğrudan OSB'ye neden olduğu belirlenmiş bütün bu genlerin kromozomlar üzerindeki yerleşimleri Şekil 2'de gösterilmiştir (4).

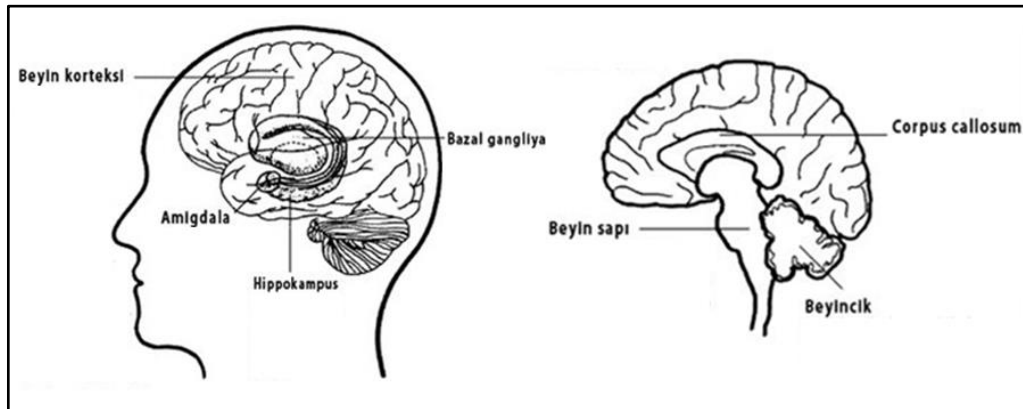


Şekil 2. Otizm spektrum bozukluğunun genetik etiyolojisine katkısı olan genler: Bilinen OSB genleri “siyah” renkle, aday OSB genleri “yeşil” renkle, ilişkilendirilmiş OSB genleri “mavi” renkle belirtilmiştir (Holt’tan, 4).

Bulunan bütün bu genler birbirleriyle ilişkili olarak sinaptik yolda bulunmaktadır (Şekil 3). Bu genler sinirsel gelişim, göç, büyüme ve olgunlaşma, hücre adezyonu, akson büyümesi ve farklılaşmasında fonksiyon gösterirken beyin beyincik, beyin sapı, korpus kallosum, bazal ganglia, hipokampus, amigdala ve beyin korteksinde eksprese olmaktadır (Şekil 4) (4, 54).



Şekil 3. Otizmle ilişkili genlerin yer aldığı sinaps yapısı ve yer alan proteinler (Urbano'dan, 54)



Şekil 4. OSB'de etkilenen temel beyin bölgeleri (Urbano'dan, 54)

4.4.1.4. Epigenetik Faktörler

Gen regülatör bölgelerindeki hipermetilasyon veya hipometilasyon gibi epigenetik modifikasyonlar gen regülasyonunu etkileyebilmektedirler. Epigenetik, çevresel faktörler ve genetik yatkınlık arasında ara bir yüzey sağlamaktadır. Pek çok çevresel faktör (antibiyotikler, kimyasallar gibi) CpG adalarının metilasyonunu etkilemektedir (55). Böylece epigenetik modifikasyonlarda ve gen ekspresyonunda değişiklikler meydana gelmektedir (56). Ayrıca, metil-CpG bağlayıcı proteinler olan MeCP2 and MBD2'nin mutasyonlarının Rett Sendromu ve OSB'ye yol açtığı tespit edilmiştir (57, 58). Bunlara ek olarak, OSB'nin etiolojisinde en sık gözlenen kromozomal düzensizlik olan 15q11–13 duplikasyonunda, etkilenmiş gen *GABA*'nın farklı metilasyonları görülmektedir. Epigenetik modifikasyonlar OSB'nin fenotipik modifikasyonları ile sonuçlanabilmektedir (37, 59, 60). Bütün bu sonuçlar epigenetik regülasyonların önemine işaret etmektedirler.

4.4.1.5. Çevresel Faktörler

OSB'nin başlangıcında ve yaşam boyu modülasyonundaki fizyolojik faktörlerin katkısı yakın geçmişte çok ilgi görmüştür. İlerlemiş ebeveyn yaşı, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon bunlara örnek olarak verilebilir (61). Bu kadar etkili olan diğer faktörler de çevre kirliliği (hava kirliliği, organofosfatlar, ağır metaller) ve biyokimyasal bozukluklardır (bir antioksidan olan glutatyon yetersizliği gibi) (62). Yakın bir çalışma, glutatyon peroksidazın (GPX1), GCG tekrar polimorfizmlerinin ve ALA6 alleli polialenin tekrarlarının OSB için koruyucu olduğunu iddia etmektedir (62). Bu hipotezler, OSB'nin patogeneğinde genetik ve çevresel faktörlerin katkısı olduğunu öne sürmektedirler. Ayrıca, beta-2 adrenerjik agonistlere prenatal maruz kalma gibi çevresel faktörlerin OSB'ye ve diğer psikiyatrik durumlara yol açabileceği savunulmuştur (63).

4.4.2. Otizm Spektrum Bozukluğunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılmasında Kullanılan Yaklaşımlar

Kompleks bir kalıtımı olan OSB'den sorumlu genlerin araştırılması sürecinde, tek gen hastalıklarında yüksek başarıya götüren bağlantı analizi çalışmalarından fazla başarı elde edilememiştir. Bunun yerine kromozom analizi, çok sayıda anne-baba çocuk üçlülerinin kullanıldığı ilişkilendirme (association) çalışmaları, kopya sayısı

değişikliklerini belirlemeyi hedefleyen array-CGH çalışmaları ve aday gen yaklaşımı yöntemleri tercih edilmektedir (64-66).

4.4.2.1. Konvansiyonel Karyotip Analizi Çalışmaları

Hastalıktan sorumlu genlerin araştırılmasında en önemli başarılar kromozomal düzensizliklerin etkilemiş olduğu genlerin tanımlaması ile ortaya konulmuştur (50, 67) . Bu süreçte büyük ölçekteki düzensizlikler için konvansiyonel kromozom analizi yöntemi tercih edilmektedir (44). OSB'nin genetik etiyolojisinin araştırılması sürecinde konvansiyonel kromozom analizi yöntemi kullanılarak çok sayıda kromozomal düzensizlik tespit edilmiştir (68). Bu kromozomal düzensizliklerden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3*, *CADM1*, *PTEN*, *CNTNAP2* ve *NRXN1* genleri otistik bozukluk ile ilişkilendirilmiştir (6, 39, 42, 69). Ancak bu genler üzerindeki mutasyonlar otistik bozukluğun çok küçük bir yüzdesinin sebebinin izah etmektedir.

4.4.2.2. Bağlantı Analizi Çalışmaları

Bağlantı çalışmaları, bireyler arasında fenotipik farklılığa neden olan genleri barındıran kromozomları saptamak için tasarlanmıştır. Sınırlı sayıda genetik marker kullanılarak birden fazla bireyin etkilendiği ailelerde bağlantı çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, 2q, 3p, 3q, 7q, 11p, 16p, 17q, 19p ve Xq gibi pek çok kromozomal bölge tespit edilmiş ve OSB ile ilişkilendirilmiştir (70-74) .

4.4.2.3. Aday Gen Yaklaşımı Çalışmaları

Bu yaklaşımda ilgili hastalıktan ya da malformasyondan sorumlu olduğu düşünülen aday genler saptanmaya çalışılır. Daha önce hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilen kromozom bölgeleri, fonksiyon açısından hastalığın oluşumunda rol alabileceği düşünülen gen bölgeleri, kromozom anomalileri ile birlikte hastalık fenotipinin gözlemlendiği bölgeler, farklı türlerde benzer fenotipin görülmesi ve fare-insan homoloji haritalarının kullanımı ile insanda ilgili geni barındıran bölgeler aday gen yaklaşımı altında seçilen bölgeleri oluşturmaktadır (75, 76). Otizm için yapılan aday gen çalışmalarıyla son 15 yılda 200'ün üzerinde gen test edilmiştir (77-79). Bu çalışmalar ile *CNTNAP2*, *LRR*, *RELN* ile bir protoonkogen olan ve sinirsel gelişimin biyolojik yollarında görev yapan *MET* geni otizm ile ilişkilendirilmiştir (4).

4.4.2.4. Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları

GWAS, polimorfik markır setleri kullanarak genomun tamamını araştırma işlemidir (80). Çeşitli genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ile, 3p25.3, 5p14.1, 5p15, 20p12.1, 16q13-21 bölgeleri otizmle ilişkili bulunmuştur (50, 65, 67, 81, 82). Sonraki yıllarda, 5p14.1 bölgesindeki *CDH9* ve *CDH10* genlerinin otizmle güçlü bağlantısı bulunmuştur (50). GWAS çalışmaları ile ayrıca *SEMA5A* ve *TAS2R1* genleri tespit edilmiştir (67).

4.4.3. Otizme Ait Güncel Kromozom, CNV, Gen Verileri Sağlayan Faydalı Siteler

Otizme ilgili yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerin kaydedildiği, otizmin etiyolojisini anlaşılır kılması ve araştırılmasına yardımcı olması açısından oldukça faydalı web siteleri bulunmaktadır. Bunlardan “Autism Chromosome Rearrangement Database” (<http://projects.tcag.ca/autism/>), bütün kromozomal düzensizlikleri ve yer aldığı makaleleri içermektedir. Diğer bir web sitesi olan “Autism Genetic Database” (<http://wren.bcf.ku.edu/>), otizme yatkınlık gösteren genlerin, CNV’lerin, fragil bölgelerin ve bilinen kodlamayan RNA’ların kapsamlı bir şekilde verilerinin oluşturulduğu bir sitedir. Otizmin etiyolojisine katkı sağlayan çok faydalı olan “A Modular Database for Autism Research” web sitesi (<https://gene.sfari.org/autdb/Welcome.do>), tanımlanmış gen ve CNV’leri, kullanılan hayvan modellerini ve yine referans makaleleri içeren bir veri bankasıdır (6, 83, 84).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı arasındaki işbirliği ile gerçekleştirildi.

Çalışmada, 13 farklı ilden Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk - Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvurarak, DSM-IV tanı kriterlerine (Ek 1) göre sınıflandırılan, nörolojik muayenesi yapılan ve iletişim bozukluklarının işitme bozukluğuna bağlı olup olmadığı yönünden değerlendirilen ve tüm bu klinik muayeneler sonucunda OSB tanısı koyulan 185 hasta değerlendirildi (Tablo 2). Hastalardan kromozom analizi için Lityum-Heparinli tüplere 2ml ve DNA izolasyonu için EDTA'lı tüplere 10ml periferik kan örnekleri alındı. Kromozom analiz sonuçları doğrultusunda gerek duyulan hastaların anne ve babalarından da kromozom analizi için Lityum-Heparinli tüplere 2ml kan örnekleri alındı.

Bu çalışma, 2010.114.001.7 nolu proje kapsamında KTÜ BAP tarafından desteklenmiş ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (2010/08) onaylanmıştır.

5.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler çeşitli firmalardan elde edildi.

PB Max Karyotyping Medium	Gibco, 12557-039
L-Glutamine	Bio Ind, 01-199-1B
Trypsin-EDTA solution A 0.25%	Bio Ind, 03-050-1B
Colcemid solution	Bio Ind, 12-004-1D
Giemsa	Merck, 9204
Methanol (p.a)	Merck, 1.0600

Immersion oil	Merck, 4699
Sodium dihydrojen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, 6345
Potassium dihidrogen phosphat (KH_2PO_4)	Merck, 4873
Potassium chlorid (KCl)	Merck, 4936
Ammonium chlorid (NH_4Cl)	AppliChem,
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO_3)	AppliChem, A2375.1000
EDTA disodyum dihidrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem, A2937.0500
Tris-Baz ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	AppliChem, A2264.1000
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merck, 1.01547.0.100
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Merck, 910TA654681
Proteinaz K	Promega, V3021
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Glacial asetik asit ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Merck, 1.00056.2500
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Mey, Türkiye

5.1.3. Cihazlar

Etüv (37°C)	Memmert
Buzdolabı ($+4^\circ\text{C}$)	BOSH, Arçelik
Vorteks	Labinco L-46
Santrifüj	Heraus

Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet)	Eppendorf 5804
Yüksek devirli santrifüj (2 adet)	Eppendorf 5810
pH metre	Hanna
Lamin air flow	Herause
Mikroskop	Nikon E800
Mikroskop Image analiz sistemi	Olympus BX 50
Su banyosu	Memmert
Otomatik pipet seti	Rainin
Dijital otomatik pipet	Socorex
Hassas terazi	AHAUS
Manyetik karıştırıcı	IKA
Buz makinesi	ICE TECH, CD90A
Distile su cihazı	GFL 2004
Derin dondurucu (-20)	BOSH, Arçelik
Derin dondurucu (-85)	Thermo
Buzdolabı	Arçelik
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV

5.1.4. Sarf Malzemeleri

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Muhtelif Firma
Mikrosantrifüj tüpler	Axygene
K3EDTA'lı tüpler (mor kapaklı)	Vacutainer
Falkon Tüpler (50 ml)	Greiner Bio-One

Steril disposable t p

Pastör pipeti (cam-2ml'lik, ucu kısa)

5.1.5. Solüsyonlar

5.1.5.1. Kromozom Analizi Solüsyonları

Colcemid

10 µg/ml olarak hazırlanmış liyofilize Colcemid solüsyonu +4 C'de saklandı.

Hipotonik Solüsyon (0,075 M KCl)

1,4 g KCL

250 ml Distile su

Fiksatif (Carnoy) Solüsyon

3 hacim Methanol

1 hacim Glasial Asetik Asid

Hazırlanışı:

3 hacim Methanol (Merck) / 1 hacim Glasial Asetik Asid (Merck) ilave edilerek kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

Giemsa (GTG Bantlama) Boya Solüsyonu

4 ml Giemsa

96 ml Tampon   zelti

Tampon Solüsyonu

- A solüsyonu

4.539 g KH₂PO₄

500 ml Distile su

- B solüsyonu

4.686 g Na₂HPO₄

500 ml Distile su

Trypsin Hazırlama

8 cc Trypsin

92 cc (% 0.9) Serum fizyolojik

5.1.5.2. DNA İzolasyon Solüsyonları

Eritrosit Lizis Tamponu (ELB) (10X) (pH 7.4)

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0.5 M Na₂EDTA

Hazırlanışı:

82.9 g NH₄Cl

10 g KHCO₃

20 ml 0,5 M Na₂EDTA 800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

IX çalışma solüsyonu hazırlanışı:

10X stok solüsyonundan 50 ml alınıp son hacim deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı. 121°C' de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

Nuclei Lizis Tamponu (NLB) (pH 8.2)

10 mM Tris-Base

400 mM NaCl

2 mM Na₂EDTA

Hazırlanışı:

1.21 g Tris-Base

23.4 g NaCl

0.74 g Na₂EDTA 800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.2'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris-HCl

1 mM CaCl₂

Hazırlanışı:

0.788 g Tris-HCl

0.011 g CaCl₂ 80 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)***Hazırlanışı:***

Proteinaz K çözeltisi buz üzerinde, 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda 100 mg Proteinaz K çözülerek hazırlandı. Proteinaz K çözeltisi 600 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere bölündükten sonra -20°C'de saklandı.

%10'luk (w/v) Sodyum Dododesil Sülfat (SDS) Solüsyonu***Hazırlanışı:***

10 g SDS tartıldıktan sonra son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68°C'de ısıtılarak çözüldü, 0.22 µm'lik mikrofiltre ile steril edildi.

Sodyum Klorür (6 M)***Hazırlanışı:***

58.4 g NaCl 30 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

0.1M Na₂EDTA (pH 8.0)

Hazırlanışı:

37,22 g Na₂EDTA 700 ml deiyonize su içinde çözüldü, 10M'lik NaOH ile pH 8.0'a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

1M Tris-HCl (pH 7.4)

Hazırlanışı:

157.6 g Tris-HCl 800 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

TE Tamponu (pH 7.5)

10 mM Tris HCl

1mM Na₂EDTA

Hazırlanışı:

0.394 g Tris-HCl

0.093 g Na₂EDTA 100 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.5'ye ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

5.1.6. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Lamların Temizlenmesi

Kutudan çıkarılan lamlar ışığa tutularak pürüzsüz olanlar seçildi. Temizleme aşamasından önce numaralandırma yapılmasına dikkat edildi.

Numaralandırılan lamlar musluk suyu altında iyice yıkandı. 250 ml'lik beher içine dizilerek üzeri bidistile su ile dolduruldu ve 10 dk bekletildi.

Methanol içinde 30 dk bekletildi.

Methanolden alınan lamlar gazlı bezle iyice silinerek yayma aşamasına hazır hale getirildi.

5.2. Yöntem

5.2.1. Kromozomların Elde Edilmesi

5.2.1.1. Periferik Kandan Lenfosit Kültürü ile Kromozomların Elde Edilmesi

1. Hastadan 2 cc periferik kan lityum heparinli tüplere alındı.
2. Ekim yapıldı. Ekim için önce hazır besiyerinden bir tüpe steril kabin ortamında, 5-6 ml kadar konuldu.
3. Üzerine yetişkin için 12-13, bebek için 9 damla kan örneği damlatıldı.
4. Kan ile besiyerinin karışması için tüp birkaç defa alt üst edildi.
5. 3 gün boyunca (72 saat) inkübasyon için 37 °C de etüve kaldırıldı.
6. 70. saatte colsemid iğ ipliklerini bloke etmek için eklendi.
7. 2 saat sonra (72. saat) harveste başlandı.
8. 1100 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı.
10. 8 cc hipotonik solüsyon hücrelerin şişmesini sağlamak için pipetaj yapılarak eklendi.
11. 1 saat süreyle 37°C etüve bırakıldı.
12. Daha sonra yarım pipet fiksatif ile pipetaj yapıldı.
13. 1300 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
14. Süpernatant atıldı.
15. Pellet üzerine 6 cc carnoy fiksatif eklenerek vortekslendi.
16. 1100 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
17. Fiksatif işlemi 4 kez tekrarlandı.
18. Pellet hafifçe pipetaj yapıldıktan sonra pipete alındı.

19. Daha önceden temizlenmiş lamlara fiks materyal belli yükseklikten ve 45°'lik açıyla damlatıldı.

20. Lamlar oda ısısında kurutuldu.

5.2.1.2. GTG Bantlama Yöntemi ile Preparatların Boyanması

1. Oda ısısında yaşlandırılmış preparatlar tripsin solüsyonunda 1 dk bekletildi.
2. Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirilerek yıkandı.
3. Giemsa boyasında 7 dk bekletildi.
4. Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirilerek yıkandı ve oda ısısında kurutuldu.
5. Hazır hale getirilen preparatlar mikroskopta incelendi.
6. Sitogenetik değerlendirme ISCN (2005) kriterlerine göre yapılmıştır. Karyotip analizinde her hastadan en az 20 metafaz değerlendirmeye alınmıştır.

5.2.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerin periferik kan örneği 10 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere alındı. DNA izolasyonu “yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme” (Salting Out) standart protokolü ile aşağıdaki gibi yapıldı (85);

I. Gün

1. 10 ml'lik K₃EDTA'lı steril tüplerdeki periferik kan, 50 ml'lik steril falkon tüplere aktarıldı.
2. Steril falkon tüplerdeki kan üzerine 40 ml ELB eklendikten sonra tüpler hafifçe çalkalandı.
3. Falkon tüpler buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
4. Santrifüjün sıcaklığı 4°C'ye ayarlandı.
5. Falkon tüplerde bulunan, üzerine ELB eklenmiş kanlar 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.

6. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant %10'luk çamaşır suyu konulmuş behere döküldü. Bu şekilde bir gece bekletilerek dezenfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra atık uzaklaştırıldı.
7. Tüpte kalan pellet üzerine 40 ml ELB eklendi ve kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı.
8. İyice çalkalanan falkon tüpler 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
9. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
10. Falkon tüpte kalan pellet üzerine 25 ml ELB eklendikten sonra tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı ve 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
11. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü.
12. Eğer pellet temizlenmemiş ve tüpün dibinde halen fazla miktarda eritrosit var ise 10. ve 11. basamaklar tekrarlandı.
13. Süpernatantı uzaklaştırılmış pellet üzerine 4 ml NLB ve 120 µl proteinaz K eklendi.
14. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak pellet dağılana kadar tüpler çalkalandı.
15. Son olarak tüplere 425 µl SDS eklendi.
16. Falkon tüplerin kapakları kapatılarak birkaç kez köpürtülmeden alt-üst edilerek 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

II. Gün

17. Falkon tüpler etüvden çıkartıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
18. Genomik DNA'ların -80°C'de saklanabilmesi için 2 ml'lik contalı kriyotüplerin üzerlerine DNA banka numaraları yazıldı.
19. Her bir falkon tüpe 1.4 ml 6M NaCl eklendi, kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra 15 saniye çok hızlı bir şekilde çalkalandı.
20. Örnekler 20°C'de 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi.

21. Süpernatant yavaşça yeni 50 ml'lik temiz falkon tüplere aktarıldı. Altta kalan pelletin (tuz + protein) temiz tüpe alınan süpernatant ile karışmamasına dikkat edildi.
22. Temiz tüpe alınan süpernatant 20°C'de 15 dakika 6000 rpm'de tekrar santrifüj edildi.
23. Süpernatant tekrar temiz falkon tüpe aktarıldı.
24. Yeni falkon tüpe alınmış süpernatantların üzerine 3 katı kadar % 96'lık etil alkol eklendi.
25. Kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler 1-2 dakika bekletildikten ve yavaş bir şekilde alt-üst edildikten sonra görünür hale gelen genomik DNA bir araya getirildi.
26. Falkon tüp içinde bir araya gelmiş olan genomik DNA pipet yardımıyla 1.5 ml'lik eppendorf tüpe alınarak üzerine 500 µl %70'lik etil alkol eklendi.
27. 1.5 ml'lik eppendorf tüpün kapağı kapatıldıktan sonra alt-üst edildi ve mikrosantrifüjde 45 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edilerek DNA pelletinin çöktürülmesi sağlandı.
28. Eppendorf tüplerde kalan %70'lik etil alkol pipetle uzaklaştırıldı.
29. Eppendorf tüpler, kapaklarındaki kalıntı alkol uçana kadar açık tutularak kurumaya bırakıldı. Alkol uçtukten sonra genomik DNA'nın üzerine 500 µl TE buffer ilave edildi.
30. TE buffer eklendikten sonra tüpler genomik DNA'nın homojen hale gelmesi için 2 gün +4°C'de bekletildi. Tüpler aralıklarla alt-üst edildi.
31. Elde edilen genomik DNA'lar moleküler analizlerde kullanılmaya kadar -20°C'lik veya -80°C'lik derin dondurucularda saklandı.

6. BULGULAR

Bu çalışma, uzun süreli tedavi ve özel eğitim gerektiren ve yaşam kalitesini şiddetli bir şekilde düşüren Otizm Spektrum Bozukluğunun genetik etiyolojisinin aydınlatılması sürecine katkı sağlamayı amaçlamıştır. Bu kapsamda Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniklerine müracaat eden ve DSM-IV tanı kriterlerine göre değerlendirilerek Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı koyulmuş olan hastalarda genetik etiyolojinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilecek kromozomal düzensizlikler araştırıldı. Çalışma kapsamında Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı koyulmuş 36'sı kız 149'u erkek toplam 185 hasta çalışıldı.

6.1. Otizm Spektrum Bozukluğu Tanısı Koyulan Hastaların Sitogenetik Analiz Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 185 hastadan kromozom analizi için alınan heparinize periferik kandan yapılan 72 saatlik lenfosit kültürlerden elde edilen metafaz plakları GTG bantlama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Çalışma grubundaki hastalardan 131'inin analiz edilebilecek metafaz plakları elde edilebilirken 54 hastada kromozom analizi için uygun metafaz plağı elde edilemedi. Kromozom analizi sonucunda herhangi bir kromozomal düzensizlik gözlenen hastaların çalışmaya katılmayı kabul eden anne ve babalarında da karyotip analizi yapılarak düzensizliğin *de novo* olup olmadığı araştırıldı.

Karyotipleri belirlenen OSB tanısı koyulmuş 131 hastanın 22'si kız ve 83'ü erkek olup 105 (%80.1) hastada normal karyotip görülürken, yedi hastada otizm için patolojik olarak değerlendirilebilecek kromozomal değişiklikler gözlemlendi (Tablo 1). Ayrıca 19 hastada normal bireylerde de sıklıkla karşılaşılan ve polimorfizm olarak tanımlanan değişiklikler gözlemlendi (Tablo 1).

Gözlenen yapısal ve sayısal değişiklikler; iki hastada (OT_28 ve OT_88) 46,XY,del(22)(q13.31-qter) delesyonu (Şekil 5, 6), bir hastada (OT_49) 1. ve 5. kromozomlar arasında dengeli translokasyon [46,XY,t(1;5)(p12;p15)] (Şekil 7), bir hastada (OT_102) 1. ve 9. kromozomlar arasında dengeli translokasyon [46,XY,t(1;9)(q22;q34)] (Şekil 9A), bir hastada (OT_97) 4. kromozomun kısa kolunda [46,XY,4(p14+?)] yapısal düzensizliği (Şekil 10), bir hastada (OT_82) Y

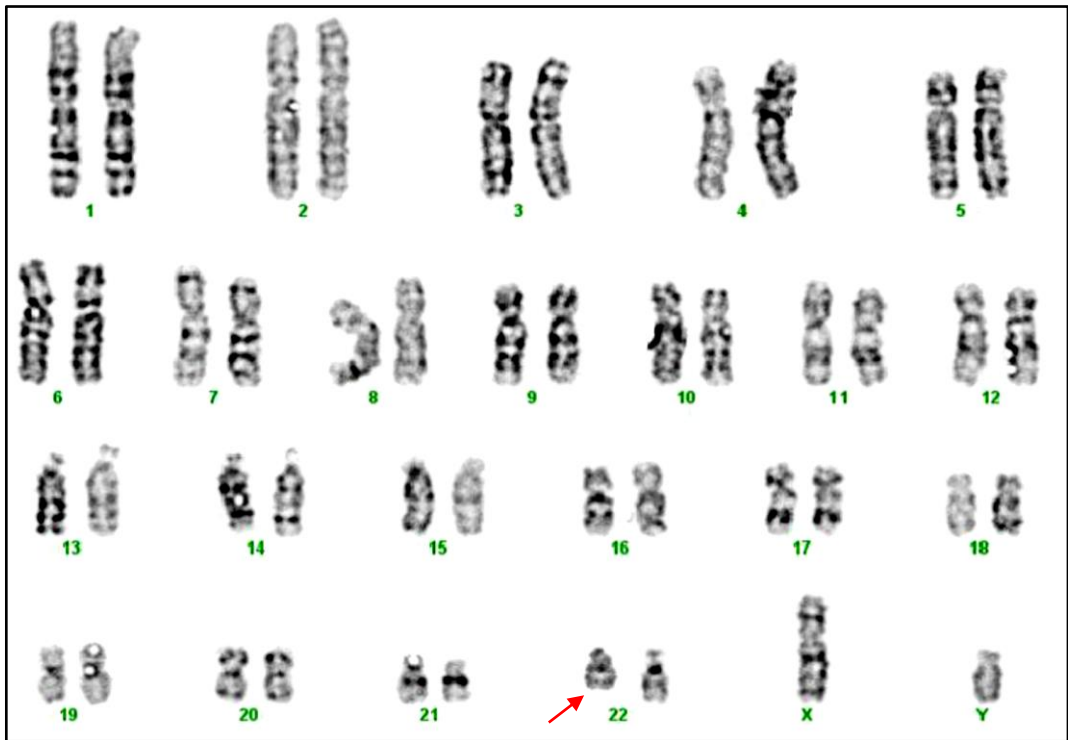
kromozomunun heterokromatin bölgesinde ve 15. kromozomun kısa kolunda artış olmakla birlikte 18. kromozomun kısa kolunda kısalma ile karakterize [46,XYqh+,15p+,18p-] yapısal düzensizliği (Şekil 11), bir hastada (OT_15) da Down sendromu ile uyumlu 21. kromozomun trizomisi [47,XY,+21] (Şekil 12) ve bir hastada (OT_62) idi (Tablo 1).

Tablo 1. Elde edilen kromozom analizi sonuçları

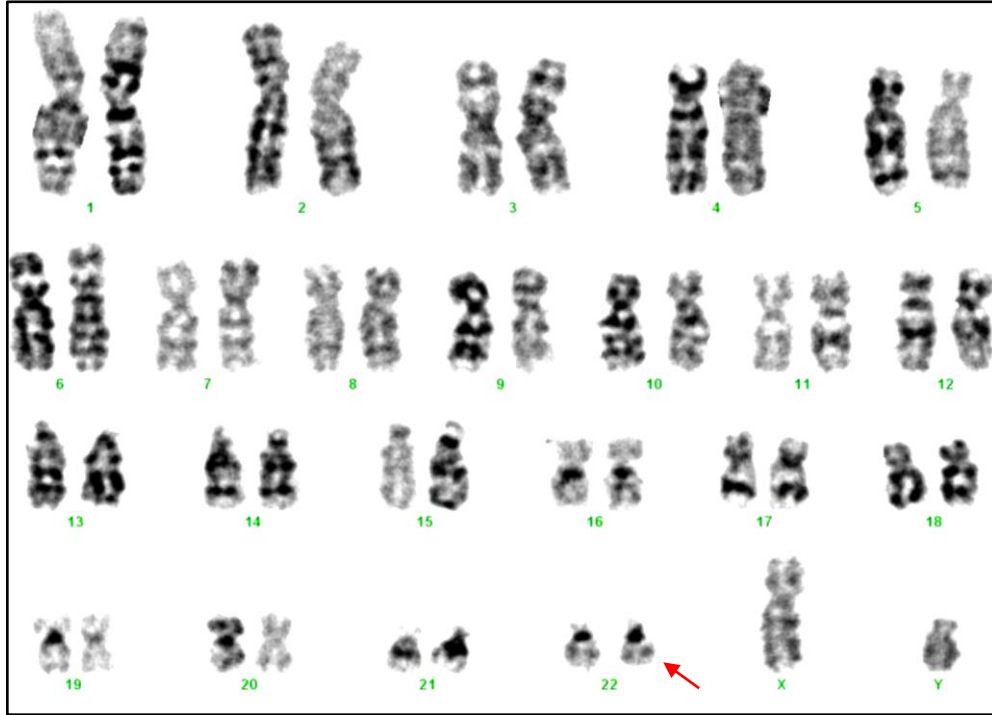
	Karyotip Analizi Sonucu	Kişi Sayısı	Sayı (Yüzde)
Patolojik Olabilecek Yapısal Değişiklikler	46,XY,del(22)(q13.31-qter)	2 (OT_28,OT_88)	6 (4.5)
	46,XY,t(1;5)(p12;p15)	1 (OT_49)	
	46,XY,t(1;9)(q22;q34)	1 (OT_102)	
	46,XY,4(p14+?)	1 (OT_97)	
	46,XYqh+,15p+,18p-	1 (OT_82)	
Patolojik Olabilecek Sayısal Değişiklikler	47,XY,+21	1 (OT_15)	1 (0.8)
Polimorfik Değişiklikler	46,XY,16qh+	2 (OT_29, OT_153)	19 (14.5)
	46,XY,1qh+	1 (OT_126)	
	46,XY,21ps+	1 (OT_31)	
	46,XY,22ps+	3 (OT_20, OT_55, OT_115)	
	46,XY,22p+	1 (OT_46)	
	46,XX,22p-	1 (OT_58)	
	46,XY,9qh+	3 (OT_12, OT_41, OT_116)	
	46,XYqh-	1 (OT_67)	
	46,XYqh+	5 (OT_77, OT_80, OT_81, OT_90, OT_95)	
	46,XY,inv(9)(p13q21)	1 (OT_62)	
Normal Karyotip	46,XY	83	105 (80.1)
	46,XX	22	
	TOPLAM	131	100%

6.1.1. del(22)q13.31-qter Düzensizliği

Çalışma kapsamında değerdendirilen birbirinden bağımsız OT_28 ve OT_88 nolu iki erkek hastada 22. kromozomun uzun kolunda “q13.31-qter” bölgesini tutan heterozigot delesyon gözlandı (Şekil 5, 6). 22. kromozomun q kolunun terminalinde bulunan *SHANK3* geninin tek allelinin eksikliği veya mutasyonunun otizme neden olduğu bilindiğinden hasta bireyin anne ve babasının da kontrol edilmesine gerek görölmedi.



Şekil 5. OT_28 kodlu hastaya ait 46,XY,del(22)(q13.31-qter) karyotipi. Kırmızı ok q13.31-qter bölgesi delesyona uğrayan 22. kromozomu göstermektedir.

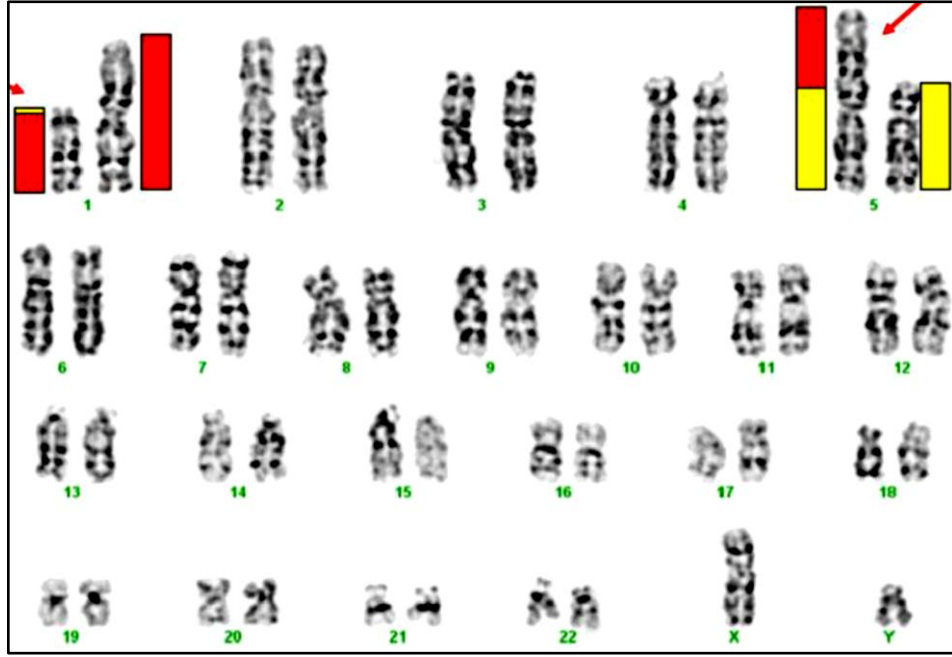


Şekil 6. OT_88 kodlu hastaya ait 46,XY,del(22)(q13.31-qter) karyotipi. Kırmızı ok q13.31-qter bölgesi delesyona uğrayan 22. kromozomu göstermektedir.

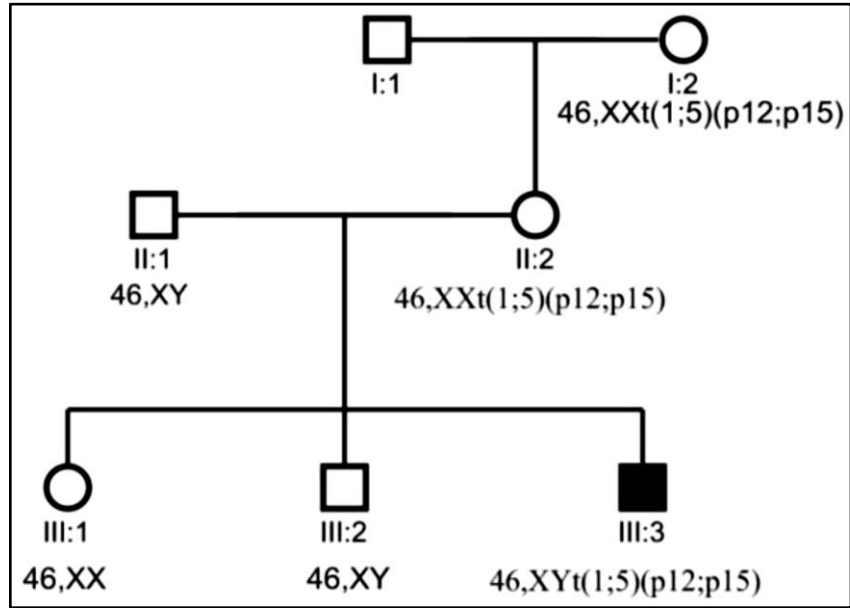
6.1.2. t(1;5)(p12;p15) Düzensizliği

Çalışma kapsamında değerlendirilen OT_49 kodlu erkek bir hastada 1. kromozomun p kolunun 1. bölgesi ile 5. kromozomun p kolunun 1. bölgesi arasında dengeli bir translokasyon “46,XY,t(1;5)(p12;p15)” gözlemlendi (Şekil 7).

Hastada gözlenen translokasyonun *de novo* mu yoksa ailesel kalıtım mı gösterdiğini belirlemek için, hasta bireyin biri kız, biri erkek iki sağlıklı kardeşinden, babasından, annesinden ve anneannesinden alınan periferik kan örneklerinden kromozom analizi gerçekleştirildi. Bu çalışma sonucunda; translokasyonun *de novo* olmadığı, hastanın anneannesinde ve annesinde de varlığı gözlemlendi. İndeks vakanın kız kardeşinde, erkek kardeşinde ve babasında normal karyotip gözlemlendi (Şekil 8).



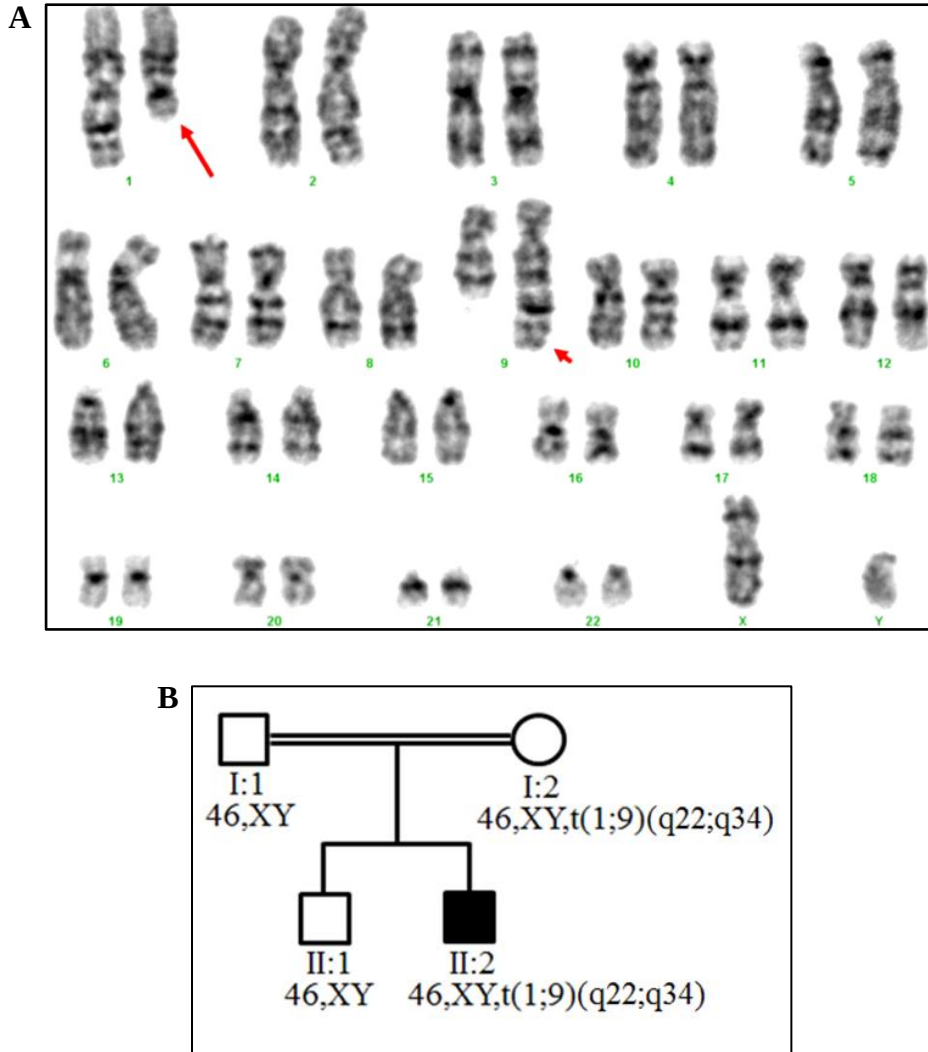
Şekil 7. OT_49 kodlu hastaya ait 46,XY,t(1;5)(p12;p15) karyotipi. Kromozomlar üzerinde gözlenen parça değişimleri sarı ve kırmızı bloklarla şematize edilmiştir.



Şekil 8. t(1;5)(p12;p15) translokasyonunun ailede kalıtımı

6.1.3. t(1;9)(q22;q34) Düzensizliği

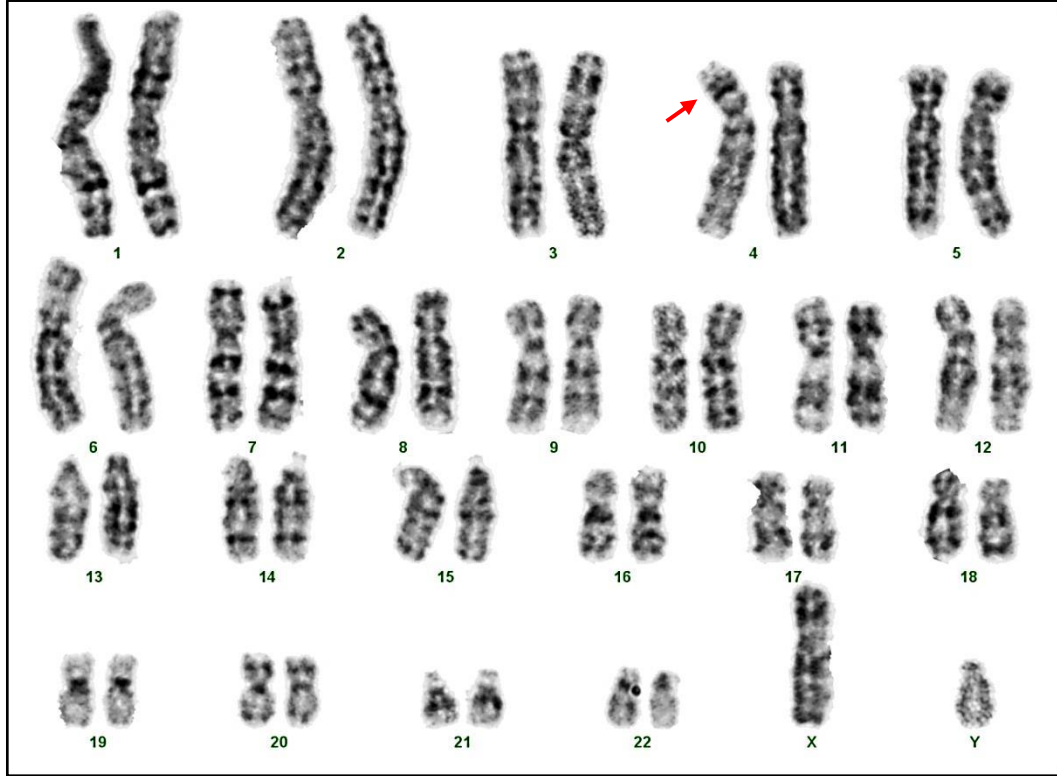
Çalışmaya katılan OT_102 kodlu erkek bir hastada 1. kromozomun q kolunun 2. bölgesi ile 9. kromozom q kolunun 3. bölgesi arasında gerçekleşen dengeli translokasyon 46,XY,t(1;9)(q22;q34) gözlemlendi (Şekil 9A). Düzensizliğin *de novo* olup olmadığını araştırmak için hastanın anne ve babasından alınan periferik kan örneklerinden kromozom analizi yapıldı ve t(1;9)(q22;q34) dengeli translokasyonunun *de novo* olmadığı, aynı translokasyonu hastanın annesinin de taşıdığı gözlemlenirken babasında ve sağlıklı kardeşinde normal karyotip gözlemlendi (Şekil 9B).



Şekil 9. OT_102 kodlu hastaya ait,t(1;9)(q22;q34) karyotipi ve ailede kalıtımı. **A.** OT_102 kodlu hastaya ait 46,XY,t(1;9)(q22;q34) karyotipi. Translokasyon sonucu oluşan derivatif kromozom 1 uzun ok ile, derivatif kromozom 9 kısa ok ile gösterilmiştir. **B.** Kromozom 1 ve 9 arasında gerçekleşen t(1;9)(q22;q34) translokasyonunun karyotip analizine göre ailede kalıtımı.

4.1.4. 46,XY,4(p14+?) Dzensizliği

OT_97 kodlu Asperger sendromlu bir erkek hastada 4. kromozomun kısa kolunda artışla karakterize 46,XY,4(p14+?) yapısal dzensizliği gözlendi (şekil 10).



şekil 10. OT_97 kodlu hastaya ait 46,XY,4(p14+?) dzensizliği. Kırmızı ok 4. Kromozomun p kolunda artış olan bölgeyi işaret etmektedir.

4.1.5. 46,XYqh+,15p+,18p- Düzensizliği

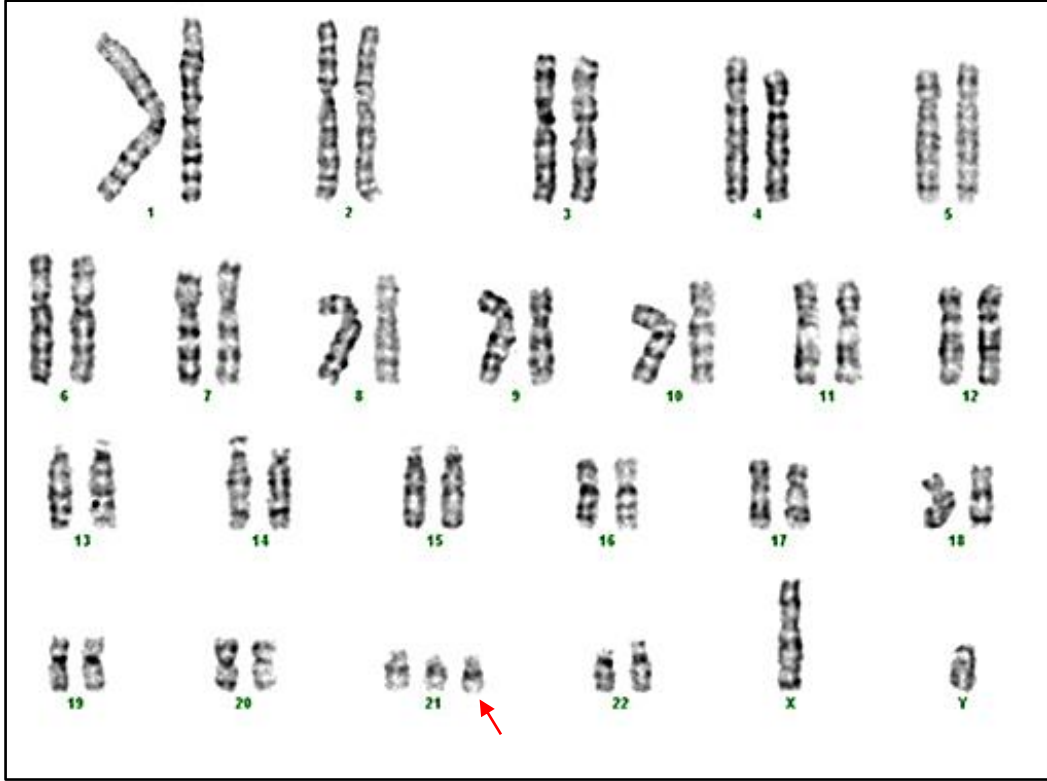
OT_82 kodlu bir erkek hastada, Y kromozomunun heterokromatin bölgesinde ve 15. kromozomun kısa kolunda artış olmakla birlikte 18. kromozomun kısa kolunda kısalma ile karakterize 46,XYqh+,15p+,18p- karyotipi gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. OT_82 kodlu hastaya ait 46,XYqh+,15p+,18p- düzensizliği. Kırmızı oklar, 15. kromozomun p kolundaki artışı ve 18. kromozomun p kolundaki kısalmayı işaret etmektedir.

4.1.6. 47,XY,+21 Trizomisi

Çalışmaya katılan Down sendromlu olup ve OSB tanısı koyulmuş OT_15 kodlu erkek hastada 47,XY,+21 trizomisi gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 12. OT_15 kodlu hastaya ait 47,XY,+21 karyotipi. Kırmızı ok, fazla 21. kromozomu göstermektedir.

4.1.7. Polimorfik Kromozomal Değişiklikler

Çalışma kapsamında değerlendirilen 131 hastadan 19’unda, sağlıklı bireylerde sıklıkla gözlenebilen, polimorfik düzensizlikler gözlemlendi. Bunlar; OT_29 ve OT_153 kodlu hastalarda gözlenen 46,XY,16qh+, OT_126 kodlu hastada gözlenen 46,XY,1qh+, OT_31 kodlu hastada 46,XY,21ps+, OT_20, OT_55, OT_115 kodlu hastalarda gözlenen 46,XY,22ps+, OT_46 kodlu hastada gözlenen 46,XY,22p+, OT_58 kodlu hastada gözlenen 46,XX,22p-, OT_12, OT_41, OT_116 kodlu hastalarda gözlenen 46,XY,9qh+, OT_67 kodlu hastada gözlenen 46,XYqh-, OT_77, OT_80, OT_81, OT_90 ve OT_95 kodlu beş hastada gözlenen 46,XYqh+ ve OT_62 kodlu hastada gözlenen 46,XY,inv(9)(p13q21)] (Şekil 13) polimorfik değişiklikleri idi (86-89).



Şekil 13. OT_62 kodlu hastaya ait 46,XY,inv(9)(p13;q21) karyotipi. Kırmızı halka ve ok 9. kromozoma ait inversiyonu göstermektedir.

Çalışmaya katılan OT_77, OT_80, OT_81, OT_90 ve OT_95 kodlu 5 hastada, sağlıklı bireylerde de sıklıkla görülebilen, Y kromozomunun heterokromatin bölgesinde artışla karakterize 46,XYqh+ düzensizliği gözlemlendi .

Kromozomlar üzerinde oluşan ve 4 Mb'dan daha küçük boyutlarda olan delesyon ve insersiyonları ışık mikroskobu ile yapılacak olan karyotip analizinde belirlemek mümkün olamamaktadır. 4Mb'dan daha küçük boyutlardaki delesyonları ve insersiyonları belirlemek için tercih edilen yaklaşım mikroarray tabanlı kopya sayısı değişikli (CNV) çalışmalarıdır. Araştırmanın ileri aşamasında planlanan mikroarray tabanlı kopya sayısı değişikliklerini belirlemeye yönelik araştırmalarda kullanılmak üzere, çalışmalara katılmayı kabul eden 185 aileden genomik DNA örneği için 7-8 ml EDTA'lı periferik kan örneği alındı. Ailelerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak her bir DNA örneği DB-XXXX şeklinde kodlanıp -80°C'de DNA bankasında muhafaza altına alındı (Tablo 2).

Tablo 2: Çalışmaya dahil edilen hasta bilgileri (MPG: Metafaz Plağı Görülemedi)

Hasta Kodu	Cinsiyet	Hasta DNA No	Baba DNA No	Anne DNA No	Doğ. Yılı	Tanı	Karyotip Analizi Sonucu
OT_1	K				2000	OSB	MPG
OT_2	E				1995	OSB	MPG
OT_3	E	DB-522	DB-523	DB-524		OSB	46,XY
OT_4	E				2000	OSB + Epilepsi	46,XY
OT_5	E	DB-525	DB-526	DB-527	1997	OSB	46,XY
OT_6	E				2004	OSB	MPG
OT_7	E	DB-574	DB-644	DB-573	2003	OSB + DEHB	46,XY
OT_8	E	DB-623		DB-622	1997	OSB	46,XY
OT_9	K				2004	OSB	46,XX
OT_10	K	DB-672	DB-670	DB-671	1994	OSB	46,XX
OT_11	E				2003	Asperger Send.	46,XY
OT_12	E	DB-515	DB-516	DB-517	2000	OSB	46,XY,9qh+
OT_13	E				1999	OSB	46,XY
OT_14	E	DB-880	DB-878	DB-879	2003	OSB	46,XY
OT_15	E	DB-482	DB-497	DB-481	1997	OSB + Down Send.	47,XY,+21
OT_16	E	DB-643		DB-642	1998	OSB	46,XY
OT_17	E	DB-519	DB-520	DB-521	2005	OSB	46,XY
OT_18	E	DB-529	DB-530	DB-531	1998	OSB	46,XY
OT_19	K	DB-495		DB-496	2004	OSB	46,XX
OT_20	E	DB-542	DB-538	DB-539	2000	OSB	46,XY,22ps+
OT_21	E	DB-637	DB-635	DB-636	2002	OSB	46,XY

OT_22	K				1997	OSB	46,XX
OT_23	E	DB-534	DB-532	DB-533	2004	OSB	46,XY
OT_24	E				1991	OSB	MPG
OT_25	E	DB-615		DB-614	1997	OSB	46,XY
OT_26	E	DB-551	DB-549	DB-550	2001	Atipik Otizm	46,XY
OT_27	E	DB-547	DB-647	DB-548	1997	OSB	MPG
OT_28	E	DB-545	DB-543	DB-544	2000	OSB	46,XY,del(22)(q13.31-qter)
OT_29	E	DB-578	DB-596	DB-579	2003	OSB	46,XY,16qh+
OT_30	E	DB-461	DB-480	DB-462	2000	OSB + DEHB	46,XY
OT_31	E	DB-555	DB-557	DB-556	1995	OSB	46,XY,21ps+
OT_32	K	DB-572	DB-570	DB-571	1999	OSB + Epilepsi	46,XX
OT_33	E				2002	Asperger Send.	MPG
OT_34	E	DB-577	DB-575	DB-576	1997	OSB	46,XY
OT_35	E	DB-685	DB-683	DB-684	2005	OSB	46,XY
OT_36	E	DB-737	DB-738		2000	OSB	46,XY
OT_37	E	DB-613	DB-612		2004	OSB	46,XY
OT_38	E	DB-528				OSB	46,XY
OT_39	E	DB-1455	DB-1453	DB-1454	2005	OSB + Epilepsi	46,XY
OT_40	K	DB-605		DB-604	2002	OSB	46,XX
OT_41	E	DB-640	DB-638	DB-639	1997	OSB	46,XY,9qh+
OT_42	E	DB-625	DB-629	DB-626	2002	OSB	46,XY
OT_43	E	DB-711	DB-821	DB-710	2003	OSB	46,XY
OT_44	E	DB-653		DB-652	2001	OSB	46,XY
OT_45	E	DB-668		DB-669	2005	OSB	46,XY
OT_46	E	DB-688	DB-712	DB-687	2004	OSB	46,XY,22p+
OT_47	E	DB-704	DB-702	DB-703	2003	OSB	46,XY
OT_48	E	DB-707	DB-705	DB-706	1999	OSB	46,XY
OT_49	E	DB-709	DB-717	DB-708	1996	Atipik Otizm	46,XY,t(1;5)(p12;p15)
OT_50	E	DB-754	DB-787	DB-753	2000	OSB	46,XY
OT_51	K	DB-759	DB-757	DB-758	1992	Rett Send.	MPG
OT_52	E	DB-775	DB-839	DB-774	2004	OSB	46,XY
OT_53	K				2001	OSB + Epilepsi	MPG
OT_54	E	DB-828	DB-826	DB-827	2003	OSB	46,XY
OT_55	E	DB-831	DB-829	DB-830	2001	OSB	46,XY,22ps+
OT_56	E	DB-859	DB-857	DB-858	2000	OSB	MPG
OT_57	E	DB-864	DB-862	DB-863	1996	OSB + Epilepsi	46,XY
OT_58	K	DB-867	DB-865	DB-866	2003	OSB	46,XX,22p-
OT_59	E	DB-917	DB-915	DB-916	1997	OSB	46,XY
OT_60	E	DB-921	DB-955	DB-920	1999	OSB	MPG
OT_61	E	DB-938	DB-936	DB-937	1996	OSB	46,XY
OT_62	E	DB-940	DB-939		2002	OSB + DEHB	46,XY,inv(9)(p13q21)

OT_63	E	DB-947	DB-945	DB-946	2001	OSB	MPG
OT_64	E	DB-952	DB-953	DB-954	2002	OSB	MPG
OT_65	E	DB-958	DB-956	DB-957	2003	OSB	MPG
OT_66	E	DB-973	DB-1070	DB-974	2003	OSB	46,XY
OT_67	E	DB-979	DB-980	DB-981	2005	OSB + Epilepsi	46,XYqh-
OT_68	K	DB-987	DB-985	DB-986	2003	OSB	MPG
OT_69	E	DB-989	DB-1130	DB-988	2006	OSB	46,XY
OT_70	E	DB-1019		DB-1018	2005	OSB	MPG
OT_71	E	DB-1026		DB-1025	2004	OSB	MPG
OT_72	K	DB-1034	DB-1033	DB-1035	2003	OSB	MPG
OT_73	E	DB-1036	DB-1037	DB-1038	2003	Atipik Otizm	46,XY
OT_74	E	DB-1085	DB-1083	DB-1084	1993	OSB	46,XY
OT_75	K	DB-1089	DB-1087	DB-1088	2003	OSB	46,XX
OT_76	K	DB-1093	DB-1094	DB-1095	2004	OSB	46,XX
OT_77	E	DB-1247	DB-1245	DB-1246	2006	OSB	46,XYqh+
OT_78	E	DB-1252	DB-1588	DB-1251	2002	OSB	46,XY
OT_79	E	DB-1373	DB-1371	DB-1372	2006	OSB	46,XY
OT_80	E	DB-1379	DB-1377	DB-1378	1999	OSB	46,XYqh+
OT_81	E	DB-1399	DB-1397	DB-1398	2004	OSB	46,XYqh+
OT_82	E	DB-1400	DB-1401	DB-1402	2004	OSB	46,XYqh+,15p+,18p-
OT_83	E	DB-1403	DB-1404	DB-1405	2003	Atipik Otizm	46,XY
OT_84	E	DB-1489	DB-1490		2003	OSB	46,XY
OT_85	E	DB-1518	DB-1520	DB-1519	2007	OSB	46,XY
OT_86	E	DB-1524	DB-1525	DB-1526	2006	OSB	46,XY
OT_87	K	DB-1533	DB-1531	DB-1532	2006	OSB	46,XX
OT_88	E	DB-1537			2000	OSB	46,XY,del(22)(q13-qter)
OT_89	K	DB-1542	DB-1540	DB-1541	1994	OSB	46,XX
OT_90	E	DB-1543	DB-1545	DB-1544	2004	OSB	46,XYqh+
OT_91	E	DB-1552		DB-1553	2006	OSB	MPG
OT_92	E	DB-1554	DB-1555	DB-1556	2006	OSB + Epilepsi	46,XY
OT_93	E	DB-	DB-	DB-	2007	OSB	MPG

		1557	1558	1559			
OT_94	K	DB-1560		DB-1561	2003	Rett Send. + Epilepsi	MPG
OT_95	E	DB-1617	DB-1630	DB-1618	2007	OSB	46,XYqh+
OT_96	E	DB-1621	DB-1619	DB-1620	2002	OSB	46,XY
OT_97	E	DB-1654	DB-1643	DB-1666	2005	Asperger Send.	46,XY,4(p14+?)
OT_98	E				2006	OSB + Epilepsi	46,XY
OT_99	E	DB-1675		DB-1676	2008	OSB	MPG
OT_100	E	DB-1693		DB-1694	1997	Asperger Send.	MPG
OT_101	E	DB-1705		DB-1706	2003	OSB	46,XY
OT_102	E	DB-1713	DB-1715	DB-1714	2007	Asperger Send.	46,XY,t(1;9)(q22;q34)
OT_103	E	DB-1732	DB-1734	DB-1733	2004	Atipik Otizm + DEHB	46,XY
OT_104	K	DB-1757	DB-1755	DB-1756	1999	OSB + Epilepsi	46,XX
OT_105	K	DB-1758		DB-1759	2001	OSB	46,XX
OT_106	E	DB-1762	DB-1760	DB-1761	2004	OSB	46,XY
OT_107	E	DB-1781	DB-1782	DB-1783	2008	OSB	46,XY
OT_108	E	DB-1788	DB-1786	DB-1787	2001	OSB + DEHB	46,XY
OT_109	E	DB-1791	DB-1789	DB-1790	2007	OSB	46,XY
OT_110	E	DB-1797	DB-1795	DB-1796	2005	Atipik Otizm	46,XY
OT_111	E	DB-1836		DB-1826	2000	OSB	46,XY
OT_112	E	DB-1835		DB-1834	2005	OSB	46,XY
OT_113	E	DB-1839		DB-1840	2003	Asperger Send. + DEHB	46,XY
OT_114	E	DB-1836	DB-1838	DB-1837	2006	Atipik Otizm	46,XY
OT_115	E	DB-1848	DB-1849	DB-1850	2006	OSB	46,XY,22ps+
OT_116	E	DB-1851	DB1867	DB-1852	2004	OSB	46,XY,9qh+
OT_117	E	DB-1869		DB-1868	2008	OSB	MPG
OT_118	E	DB-1873	DB-1875	DB-1874	1995	OSB	MPG
OT_119	K	DB-1879	DB-1877	DB-1878	2007	YGB-BTA	46,XX
OT_120	E	DB-1891	DB-1889	DB-1894	2008	OSB	MPG
OT_121	E	DB-1893	DB-1892		2005	OSB	MPG

OT_122	K	DB-1895	DB-1894		1999	OSB	MPG
OT_123	K	DB-1901	DB-1900	DB-1899	2006	OSB	MPG
OT_124	K	DB-1937			2001	OSB	MPG
OT_125	E	DB-1940	DB-1938	DB-1939	2007	OSB	MPG
OT_126	E	DB-1976	DB-1974	DB-1975	2005	OSB	46,XY,1qh+
OT_127	E	DB-1978		DB-1977	1994	Atipik Otizm + DEHB	46,XY
OT_128	E	DB-1988	DB-1990	DB-1989	2008	Atipik Otizm	46,XY
OT_129	E	DB-1991	DB-2096	DB-1992	2006	OSB	46,XY
OT_130	E	DB-2007	DB-2005	DB-2006	2002	Asperger Send.	46,XY
OT_131	K	DB-2064	DB-2065	DB-2066	2007	Rett Send.	46,XX
OT_132	K	DB-2085	DB-2086	DB-2084	2007	OSB	46,XX
OT_133	E	DB-2135	DB-2137	DB-2136	2004	OSB	MPG
OT_134	E	DB-2144	DB-2145	DB-2146	2006	OSB	46,XY
OT_135	E					OSB	MPG
OT_136	E					OSB	MPG
OT_137	K	DB-2285			2008	OSB	46,XX
OT_138	E	DB-2289	DB-2287	DB-2288	2006	OSB	46,XY
OT_139	E	DB-2294	DB-2292	DB-2293	2009	OSB	46,XY
OT_140	E	DB-2298	DB-2299	DB-2297		OSB	46,XY
OT_141	E	DB-2302	DB-2304	DB-2303		OSB	MPG
OT_142	E	DB-2305	DB-	DB-2306	2006	Atipik Otizm	46,XY
OT_143	E	DB-2317		DB-2318		OSB	MPG
OT_144	K	DB-2383		DB-2384		OSB	46,XX
OT_145	E	DB-2397	DB-2398	DB-		OSB	MPG
OT_146	K	DB-2406	DB-2404	DB-2405	2001	OSB	MPG
OT_147	E	DB-2433	DB-2434	DB-2435	2010	OSB	46,XY
OT_148	E	DB-2483	DB-2484	DB-2485	2006	OSB	46,XY
OT_149	E	DB-2511	DB-2512		2005	OSB	46,XY
OT_150	E	DB-2513	DB-2514		2002	OSB	MPG

OT_151	K	DB-2521		DB-2522		OSB	MPG
OT_152	E	DB-2532	DB-2530	DB-2531		OSB	46,XY
OT_153	E	DB-2533	DB-2534	DB2535		OSB	46,XY,16qh+
OT_154	E	DB-2536		DB-2537		OSB	46,XY
OT_155	E	DB-2528			2005	Atipik Otizm	MPG
OT_156	E	DB-2525	DB-2526	DB-2527	2007	Asperger Send.+ Epilepsi	MPG
OT_157	K	DB-2559	DB-2561	DB-2560		OSB	46,XX
OT_158	E	DB-2563		DB-2564	1999	OSB	46,XY
OT_159	E	DB-2571	DB-2572	DB-2573	2008	OSB	46,XY
OT_160	E	DB-2597	DB-2598	DB-2599		OSB	MPG
OT_161	E	DB-2605	DB-2607	DB-2606	2012	OSB	MPG
OT_162	K	DB-2623	DB-2625	DB-2624	1999	OSB	MPG
OT_163	E	DB-2617		DB-2618	2009	OSB	MPG
OT_164	E	DB-2631	DB-2629	DB-2630		OSB	MPG
OT_165	E	DB-2632	DB-2633	DB-2634		OSB	MPG
OT_166	E	DB-2635	DB-2636	DB-2637		OSB	MPG
OT_167	E	DB-2645		DB-2646	2009	OSB	46,XY
OT_168	K	DB-2647	DB-2649	DB-2648	2009	OSB	46,XX
OT_169	E	DB-2653	DB-2655	DB-2654	2012	OSB	MPG
OT_170	E	DB-2674	DB-2675	DB-2676	2008	OSB	46,XY
OT_171	K	DB-2678	DB-2680	DB-2679	2010	OSB	46,XX
OT_172	K	DB-2681	DB-2699	DB-2682	2010	OSB	46,XX
OT_173	E	DB-2620	DB-2622	DB-2621	2005	OSB	46,XY
OT_174	E	DB-2659	DB-2661	DB-2660		OSB	46,XY
OT_175	E	DB-2666	DB-2667		2006	OSB	MPG
OT_176	E	DB-2668	DB-2703	DB-2669	2008	OSB	MPG
OT_177	K	DB-2678	DB-2680	DB-2679	2010	OSB	46,XX
OT_178	E	DB-2687	DB-2714	DB-2715		OSB	46,XY
OT_179	E	DB-2688	DB-2689	DB-2690	2008	OSB	MPG

OT_180	E	DB-2691	DB-2693	DB-2692	2011	OSB	46,XY
OT_181	K	DB-2696	DB-2697	DB-2698	2009	OSB	MPG
OT_182	E	DB-2700	DB-2701	DB-2702	2010	OSB	MPG
OT_183	E	DB-2706	DB-2707		2002	OSB	46,XY
OT_184	E	DB-2708		DB-2709	1997	OSB	46,XY
OT_185	E	DB-2711	DB-2712	DB-2713	2009	OSB	46,XY

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), 3 yaşından önce ortaya çıkan tekrarlayıcı ve stereotipik davranışların eşlik ettiği, sosyal ve iletişimsel bozukluklarla karakterize bir grup nörogelişimsel hastalıktır (1). Klinik tanımlamasında sürekli gelişmeler yaşanan OSB, Mayıs 2013'te güncellenen tanı kriterleri ile 1) Otistik Bozukluk, 2) Asperger Sendromu ve 3) Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk başlıkları altında incelenmektedir (1, 17).

OSB'nin prevalansı yaklaşık %1 olup erkek çocuklarda, kız çocuklara oranla yaklaşık 4 kat daha fazla görülmektedir (4). Mutasyonları otizm ile ilişkilendirilmiş genlerin yanında bugüne kadar yaklaşık 225 gen ve 743 CNV'nin OSB'ye yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir (83). Ayrıca OSB'nin etiyolojisinde epigenetik faktörlerin de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (27, 90). Diğer taraftan konvansiyonel karyotip analizi çalışmaları ile OSB'li hastaların yaklaşık %3-12'sinde translokasyon, inversiyon ve duplikasyon gibi kromozomal düzensizliklerin belirleyici olduğu gösterilmiştir (28-31). Tanımlanan kromozomal düzensizlikler OSB ile ilişkilendirilmiş genlerin (*SHANK3*, *CNTNAP2*, *NLGN1*, *NRXN1*) tanımlanması sürecinde başlangıç noktası olarak değerlendirilmiştir (4).

Bu çalışma kapsamında OSB'nin genetik etiyolojisini aydınlatma sürecine katkı sağlamaya yönelik olarak 36'sı kız 149'u erkek toplam 185 hastada konvansiyonel karyotip analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 2). Çalışmaya dahil edilen hastalardan 131'inden analiz edilebilecek kalitede metafaz plağı elde edilmiş ve bu hastaların 105'inde normal karyotip (46,XX/46,XY) gözlenirken 7'sinde (%5.3) otizme neden olabilecek kromozomal düzensizlikler [46,XY,t(1;5)(p12;p15)], [46,XY,t(1;9)(q22;q34)], [46,XY,4p+?], [46,XYqh+,15p+,18p-], [47,XY,+21] gözlendi (Tablo 1). Patolojik olabilecek düzensizliklere ek olarak 19 hastada, sağlıklı bireylerde sıklıkla gözlenen, polimorfik düzensizlikler [iki hastada 46,XY,16qh+, bir hastada 46,XY,1qh+, bir hastada 46,XY,21ps+, üç hastada 46,XY,22ps+, bir hastada 46,XY,22p+, bir hastada 46,XX,22p-, üç hastada 46,XY,9qh+, bir hastada 46,XYqh-, beş hastada 46,XYqh+, bir hastada 46,XY,inv(9)(p13q21)] gözlendi (Tablo 1).

Delesyonlar genomik kayba neden olan dengesiz kromozomal düzensizliklerdir. Genellikle büyük boyutlu delesyonlar, küçük boyutlu delesyonlara kıyasla fenotip ve

yaşam kalitesi üzerinde daha belirgin olumsuz etki oluşturlar (10, 91). Delesyonlar çok sayıda geni etkilediklerinde ortaya çıkan ağır fenotip, gen-hastalık ilişkisi kurulması sürecine katkı sağlamazken, tekrarlayan tipik fenotipik bulgular gen-hastalık ilişkisi kurulması sürecine önemli katkılar sağlayabilmektedir.

Çalışma kapsamında iki hastada delesyon [46,XY,del22(q13.31-q13.33)] gözlenmiştir (Şekil 5, 6). 22q13-qter delesyonu otizmle ilişkilendirilmiş bir kromozomal düzensizlik olup bölge içinde yer alan *SHANK3* geninin heterozigot nokta mutasyonları da tek başlarına otizme neden olmaktadır (40). Bir çalışmada *SHANK3* mikro delesyonlarının otizmin %2'sini açıklayabildiği gösterilirken, farklı bir çalışmada *SHANK3* nokta mutasyonu ve *SHANK3*'ü tutan delesyonların otizmin %0.75'inin sebebini açıkladığı gösterilmiştir (41, 92). Bizim çalışmamızda ise konvansiyonel karyotip ile 131 hastadan 2'sinde (%1.5) *SHANK3*'ü etkileyen delesyon gösterilmiştir. Çalışmada kullandığımız konvansiyonel karyotip analizi ile 4 Mb üzerindeki delesyonları gözlemleyebilmek mümkün olmaktadır. *SHANK3* ise 22. kromozomun terminaline yalnızca 128.4 kb uzaklıktadır ve bu boyuttan daha büyük bütün delesyonlar *SHANK3*'ü etkilemektedir (64). Bu durum kullandığımız yöntemin sahip olduğu çözünürlüğün *SHANK3*'ü etkileyebilecek birçok delesyonu belirleme gücüne sahip olmadığını göstermektedir. Bu veriler, yüksek çözünürlüklü bir yaklaşımın (CNV, dizileme) *SHANK3*'ün bizim çalışma grubumuzdaki katkısını yükseltebileceğini göstermektedir.

Kromozomlar arasında gerçekleşen dengeli translokasyonlar her zaman fenotipik bir patolojiye neden olmamaktadır. Ancak, ebeveynlerde fenotipik patolojiye neden olmayan bu düzensizlikler mayoz bölünme sonucu oluşan gametlere geçiş olasılıklarına göre fetusta dengesiz olabilmekte ve sıklıkla düşüklere neden olmaktadır (86, 87). Kritik bir geni etkilemesi durumunda dengeli translokasyonlar, etkilenen gene bağlı olarak çok geniş bir spektrumda dismorfolojiye neden olabilmektedir (86, 93, 94). Bu durum, dengeli traslokasyonları hastalıklardan sorumlu genlerin tanımlanmasında etkin bir başlangıç noktası haline getirmektedir (93). OSB ile ilişkilendirilmiş olan *CNTNAP2* geni de dengeli bir düzensizlikten yola çıkılarak tanımlanmıştır (69). Bu noktadan bakıldığında OT_49 ve OT_102 kodlu hastalarda görülen dengeli traslokasyonlar [t(1;5)(p12;p15) ve t(1;9)(q22;q34)] OSB'nin patolojisinde rol oynayan genlerin tanımlanması için kritik düzensizlikler olarak görülmektedir (Şekil 7, 9). Fakat

t(1;5)(p12;p15) düzensizliğinin, etkilenmiş hastanın hem annesinde hem de anneannesinde görülmesi, t(1;9)(q22;q34) düzensizliğinin ise etkilenmiş hastanın annesinde görülmesi, bu düzensizliklerin hastalarda görülen otistik fenotipten sorumlu olmayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, her iki translokasyonda da etkilenmiş hastaların erkek olması ve düzensizliğin fenotipi olumsuz etkilemediği bireylerin kadın olması dikkat çekmektedir ve bu durum OSB'nin erkeklerde kadınlara oranla dört kat daha sık görülmesini hatırlatmaktadır (4). Erkeklerde, kadınlara göre OSB'nin daha sık görülüyor olması, süreçte epigenetik faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Tanımlamış olduğumuz düzensizliklerin ailelerdeki sağlıklı erkeklerde görülmemesi, sadece kadınlarda görülmesi epigenetik etkilerin var olabileceğini destekleyen bir bulgu olarak gözükmektedir. Ayrıca, aynı kromozomal düzensizliği taşıyan bir ailenin farklı bireylerinde otistik fenotipin farklılık gösterdiği, özellikle kadınların erkeklere oranla daha hafif bulgular gösterdiği, hatta kadınların düzensizliği taşımasına rağmen otistik bulgular göstermemesi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (95-98). Bununla birlikte bir genin anneden veya babadan kalıtılmasına göre farklı seviyelerde eksprese olması (genomik imprinting) her ne kadar mekanizması bilinmiyor olsa da epigenetik çalışmaların ilgi odağı olarak günümüzde popülerliğini korumaktadır ve kompleks hastalıkların etiyopatogenezinde önemli rolünün olduğu düşünülmektedir (99, 100). Daha net bir sonuca varabilmek için gözlemlediğimiz dengeli düzensizliklerin kırılma bölgelerinin belirlenmesi, kırılma sonucunda etkilenmiş olan genlerin veya kontrol bölgelerinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu yönü ile çalışma kapsamında tanımlamış olduğumuz bu düzensizliklerin otizmin etiyolojisinde rol oynayan genetik ve epigenetik mekanizmaların aydınlatılması sürecine katkı sağlayabilecek potansiyele sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışma grubumuzda bir hastada trizomi 21 (47,XY,+21) gözlenmiştir (Şekil 12). Down sendromu olarak da adlandırılan trizomi 21, orta derecede mental retartasyonda en sık görülen kromozomal bozukluktur. Down sendromu yaklaşık 800 doğumda bir görülür ve ileri anne yaşına bağlı olarak görülme sıklığı artar (8). Down sendromlu hastaların yaklaşık %10'unda otistik bulgular da görülmektedir (101). OSB'nin prevalansının genel toplumda %1 olmasına karşın Down sendromlu hastaların %10'unda görülmesi, trizomi 21 karyotipinin otizme yatkınlık oluşturduğunu göstermektedir (4, 101). Bu durumun, 47,XY,+21 karyotipi görülen OT_15 kodlu

hastadaki otistik bulguların nedenini açıkladığını düşünmekteyiz. Ancak, bütün Down sendromlu hastalarda otizmin görülmeyişi bu hastalarda ilave genetik, epigenetik veya çevresel faktörlerin de önemli rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, 47,XY,+21 karyotipi görülen hasta bireyde de ileri düzeyde çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışma grubumuzda Asperger sendromu tanısı koyulmuş bir hastada 46,XY,(4p14+?) karyotipi gözlenmiştir (Şekil 10). DSM-IV tanı kriterlerine göre OSB'nin içinde yer alan Asperger sendromu yüksek bilişsel yetenek ve iletişimde nitel bir bozukluğun olmaması ile otizmden ayrılmaktadır (102). Bugüne kadar Asperger sendromunun etiolojisini aydınlatmaya yönelik bağlantı analizi çalışmaları ile ASPG1 (kromozom 3q25-q27) (42), ASPG2 (kromozom 17p13) (44), ASPG3 (kromozom 1q21-q22) (103) ve ASPG4 (kromozom 3p24-p21) (104, 105) lokusları hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Ancak, bu lokuslardaki ilişkili genler henüz tanımlanamamıştır. Diğer taraftan, X kromozomu üzerinde bulunan *NLGN3* ve *NLGN4* genleri üzerindeki mutasyonların otizmin yanında Asperger sendromuna da neden olduğu gösterilmiştir (39). Bu çalışma kapsamında tanımlamış olduğumuz düzensizlik ise, daha önce Asperger sendromu ile ilişkilendirilen lokuslardan farklı olarak 4. kromozomun p14 lokusunda yer almaktadır ve ışık mikroskopu ile ayırt edilir boyutlarda bir artıştır. Gözlenen bu artışın hangi kromozomdan köken aldığını ayırt etmek mümkün olmamıştır (Şekil 10). Buradaki artışın nereden kaynaklandığının CNV gibi daha ileri seviyedeki analiz yöntemleri ile araştırılması gerekmektedir. Otistik hastalarda gerçekleştirilen kopya sayısı değişikliğini belirlemeye yönelik çalışmalarda 4. kromozomun p14 ve p14-p13 lokuslarını etkileyen çok sayıda duplikasyon ve duplikasyon-delesyon düzensizlikleri rapor edilmiştir (106). Bu durum, ilgili hastada gözlenen etkilenmiş bölge içinde OSB ile ilişkili bir genin olduğunu işaret etmektedir.

Çalışma grubumuzdaki diğer bir hasta bireyde 46,XYqh+,15p+,18p- yapısal değişikliği gözlenmiştir (Şekil 11). Bu düzensizlik Y kromozomunun heterokromatin bölgesinde artış, 18. kromozomun kısa kolunun terminalinde kayıp ve 15. kromozomun kısa kolunun terminalinde artış ile karakterizedir. Bu karyotipte gözlenen 15. kromozomdaki artışın 18. kromozomdan translokasyon sonucu gelmiş olma olasılığı bulunmakla birlikte, teorik olarak bu değişikliklerin birbirinden bağımsız duplikasyon ve delesyon olması da mümkün gözükmemektedir. Gözlenen kayıp ve kazanımların

oldukça küçük olması nedeniyle konvansiyonel karyotipleme ile düzensizliğin temeli açıklanamamıştır. Ancak, her iki kromozomda da kırılma gerçekleştiğini ve bu durumun ilgili bölgelerde genleri etkileme potansiyeline sahip olduğunu ifade etmek mümkündür. Bu yöndeki sorulara cevap bulmak için C bantlama (CBG-Sentromer Bantlama), NOR (Nuclear Organizer Regions) bantlama, FISH (Fluoresan In Situ Hybridization) ya da CNV gibi daha ileri seviyedeki analiz yöntemleri kullanılarak araştırılması, sonuca gitme yönünde katkı sağlayabilecek yaklaşımlardır.

Bütün bunların yanında, 18. kromozomun p11.22 lokusunda bulunan Ankyrin repeat domain 12 (*ANKRD12*) geni OSB'ye yatkınlık ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte bu genin kolorektal kanserlerde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (4, 107). Diğer taraftan, 18. kromozomun p11.31-p11.22 lokuslarını tutan çok sayıda duplikasyon, delesyon ve delesyon-duplikasyon tarzı kopya sayısı değişiklikleri otistik hastalarda gösterilmiştir (106). Aynı şekilde 15. kromozomun p13-p11.2 bölgelerini tutan çok sayıda duplikasyon, delesyon ve delesyon-duplikasyon tarzı kopya sayısı değişiklikleri otistik hastalarda rapor edilmiştir (106). Bu veriler ilgili bölgelerde otizm ile ilişkili genlerin olabileceğini göstermektedir. Buna paralel olarak, gözlenen karyotipin ilgili hastadaki otistik fenotipinin sebebi olduğu fikrini desteklemektedir.

Çalışma kapsamında gözlenen heterokromatin bölge artışı ve azalmaları (16qh+, 1qh+, 9qh+, Yqh-, Yqh+) sıklıkla sağlıklı toplumda da gözlenen polimorfik yapılarıdır (86, 87). Bu örneklerde heterokromatin bölgeleri belirlemeye yönelik olarak geliştirilmiş olan C-bandlama tekniğinin uygulanması gerekmektedir (108-110). Benzer şekilde, 6 hastanın akrosentrik kromozomlarının kısa kolunda artış ve azalmalar (21ps+, 22ps+, 22p+, 22p-) gözlenmiştir. Akrosentrik kromozomların kısa kolunda, NOR (nucleolar organizing regions) olarak adlandırılan ve rRNA'ların öncülünün sentezlendiği bölgede sağlıklı bireylerde sıklıkla boyut değişikliği görülmektedir ve bu değişim polimorfizm olarak değerlendirilmektedir (10, 86, 87). Bu polimorfik değişikliklerin otizmle ilişkili olduğu düşünülmesine de OSB gibi genetik heterojenitesi yüksek olan kompleks hastalıklar, genom üzerinde yaygın olarak görülen polimorfizmler ile karakterizedir (111). Bu polimorfizmler tek başlarına hastalık oluşturmak için yeterli değildir, ancak hastalık riskini arttırarak, kümülatif etki ile hastalık oluşturmaktadırlar (111). Polimorfizmler gen dozajının anlatımını olumsuz etkileyebilmektedirler (111). Bu etkileşim sonucunda, tek başlarına ya da başka genetik

ve çevresel faktörlerle birlikte hastalık nedeni olabilmektedirler (2, 111). Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda gözlenen polimorfik değişikliklerin OSB'nin etiyolojisine katkısının olma olasılığı düşünülmektedir. Ancak bu yapıların gerçekten polimorfizm olup olmadığının belirlenmesi NOR bandlama veya CNV çalışması ile mümkündür. Aksi halde bu bölgelerdeki artışın farklı bir kromozoma ait bir bölge olmadığını söylemek mümkün değildir.

Çalışma kapsamında bir hastada da 9. kromozomda oluşan perisentrik inversiyon karyotipi 46,XY,inv(9)(p13q21) gözlenmiştir (Şekil 13). 46,XY,inv(9)(p13q21) karyotipi sağlıklı bireylerde de sıklıkla gözlenen ve polimorfik yeniden yapılanma olarak değerlendirilen dengeli bir düzensizliktir (86, 87, 112, 113). Bu nedenle inv(9)(p13q21) bizim çalışma grubumuz içinde otizmle ilişkili bir düzensizlik olarak değerlendirilmemiştir.

Sonuç olarak, OSB'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılması sürecine katkı sağlayabilecek kromozomal düzensizlikleri tanımlamayı amaçlayan tez çalışmamız kapsamında 131 hastada konvansiyonel karyotip analizi gerçekleştirildi ve iki hastada daha önce otizm ile ilişkilendirilmiş olmak üzere toplam 7 (% 5.3) hastada OSB ile ilişkili olabilecek kromozomal düzensizlik gözlenmiştir. İlk kez bu çalışma kapsamında tanımlanan 4 kromozomal düzensizlik [46,XY,t(1;5)(p12;p15), 46,XY,t(1;9)(q22;q34), 46,XY,4p14+?, 46,XYqh+,15p+,18p-] OSB ile ilişkili yeni genlerin tanımlanması sürecine katkı sağlayabilecek potansiyele sahiptir. Diğer taraftan, çalışma kapsamında OSB'li 185 hastaya ait genomik DNA örneği toplanmıştır. Bu arşiv konvansiyonel karyotip analizi ile herhangi bir anomali gözlenmeyen hastalarda OSB'nin etiyolojisinde önemli bulgular sağlayabilecek potansiyele sahiptir. Konvansiyonel kromozom analizi, 4 Mb ve bunun üzerindeki büyüklüklerdeki yapısal düzensizlikleri tespit etmemize izin vermektedir (9). Bu nedenle 4 Mb'dan daha küçük yapısal düzensizlikler bu yöntem ile belirlenememektedir. Ancak yapılan CNV analizi çalışmaları kromozomlardaki 4Mb'dan daha küçük yapısal değişikliklerde pek çok gen bölgesinin etkilendiğini ve bu genlerden bazılarının OSB ile ilişkili olabildiğini göstermiştir (6). Bu nedenle çalışmamızda normal karyotip gözlenen hastaların daha ileri moleküler yaklaşımlarla analizlerinin yapılmasının OSB'nin etiyolojisini araştırma yönünden gerekli olduğu görülmektedir. Çalışmamız Türkiye genelinde yürütülmüş en geniş çalışma olup, ilave hastaların çalışmaya dahil edilmesine devam edilmektedir.

Ayrıca, tanımlanan kromozomal yeniden yapılanmalarda etkilenen genlerin belirlenmesine yönelik projeler geliştirilme aşamasındadır.

9. KAYNAKLAR

1. Soykan DA and Taner DYI (2007). Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları. 1030.
2. Haines JL and Pericak-Vance MA (2006). Genetic analysis of complex diseases. 2nd. Wiley-Liss, Hoboken, N.J., xx, 485 p.
3. Amaral D, Dawson G and Geschwind DH (2011). Autism spectrum disorders. Oxford University Press, Oxford, xxviii, 1416 p.
4. Holt R and Monaco AP (2011). Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. EMBO Mol Med 3: 438-450.
5. Eapen V (2011). Genetic basis of autism: is there a way forward? Curr Opin Psychiatry 24: 226-236.
6. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P and Scherer SW (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. Am J Hum Genet 82: 477-488.
7. Pritchard DJ and Korf BR (2003). Medical genetics at a glance. Blackwell Science, Oxford ; Malden, MA, 115 p.
8. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Hamosh A and Thompson MW (2007). Thompson & Thompson genetics in medicine. 7th. Saunders/Elsevier, Philadelphia, xi, 585 p.
9. Connor JM and Ferguson-Smith MA (1997). Essential medical genetics. 5th. Blackwell Science, Oxford, x, 236 p.
10. Gersen SL (2012). The principles of clinical cytogenetics. Springer, New York.
11. Strachan T, Read AP and Strachan T (2011). Human molecular genetics. 4th. Garland Science, New York, xxv, 781 p.
12. Gillberg C and Wahlstrom J (1985). Chromosome abnormalities in infantile autism and other childhood psychoses: a population study of 66 cases. Dev Med Child Neurol 27: 293-304.

13. Won H, Mah W and Kim E (2013). Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. *Front Mol Neurosci* 6: 19.
14. American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic criteria from DSM-IV-TR. The Association, Washington, D.C.
15. DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J and Young LJ (2006). The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J Neurosci* 26: 6897-6906.
16. Janca A, Ustun TB, Early TS and Sartorius N (1993). The ICD-10 symptom checklist: a companion to the ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 28: 239-242.
17. Volkmar FR, Lord C, Bailey A, Schultz RT and Klin A (2004). Autism and pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 45: 135-170.
18. Coury DL (2013). DSM-5 and autism spectrum disorders: implications for families and clinicians. *J Dev Behav Pediatr* 34: 494-496.
19. American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV. 4th. American Psychiatric Association, Washington, DC, xxvii, 886 p.
20. Folstein S and Rutter M (1977). Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 18: 297-321.
21. Ritvo ER, Freeman BJ, Mason-Brothers A, Mo A and Ritvo AM (1985). Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. *Am J Psychiatry* 142: 74-77.
22. Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G and Bohman M (1989). A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry* 30: 405-416.
23. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E and Rutter M (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25: 63-77.
24. Bacchelli E and Maestrini E (2006). Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C: 13-23.
25. Abrahams BS and Geschwind DH (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9: 341-355.

26. Betancur C (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 1380: 42-77.
27. El-Fishawy P and State MW (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am* 33: 83-105.
28. Martin CL and Ledbetter DH (2007). Autism and cytogenetic abnormalities: solving autism one chromosome at a time. *Curr Psychiatry Rep* 9: 141-147.
29. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF and Franke L (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11: 1, 18-28.
30. Reddy KS (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet* 6: 3.
31. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brondum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K and Tommerup N (2000). Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet* 37: 858-865.
32. Chien WH, Gau SS, Wu YY, Huang YS, Fang JS, Chen YJ, Soong WT, Chiu YN and Chen CH (2010). Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. *Clin Genet* 78: 449-456.
33. Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, Chaste P, Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Benyahia B, Trouillard O, Nygren G, Kopp S, Johansson M, Rastam M, Burglen L, Leguern E, Verloes A, Leboyer M, Brice A, Gillberg C and Betancur C (2009). Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 66: 349-359.
34. Freitag CM (2007). The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 12: 2-22.
35. van Rijn S, Swaab H, Aleman A and Kahn RS (2008). Social behavior and autism traits in a sex chromosomal disorder: Klinefelter (47XXY) syndrome. *J Autism Dev Disord* 38: 1634-1641.
36. Berg JS, Brunetti-Pierri N, Peters SU, Kang SH, Fong CT, Salamone J, Freedenberg D, Hannig VL, Prock LA, Miller DT, Raffalli P, Harris DJ, Erickson

- RP, Cunniff C, Clark GD, Blazo MA, Peiffer DA, Gunderson KL, Sahoo T, Patel A, Lupski JR, Beaudet AL and Cheung SW (2007). Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genet Med* 9: 427-441.
37. Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E and Waltes R (2010). Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19: 169-178.
 38. Vorstman JA, Morcus ME, Duijff SN, Klaassen PW, Heineman-de Boer JA, Beemer FA, Swaab H, Kahn RS and van Engeland H (2006). The 22q11.2 deletion in children: high rate of autistic disorders and early onset of psychotic symptoms. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45: 1104-1113.
 39. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T and Paris Autism Research International Sibpair S (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34: 27-29.
 40. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M and Bourgeron T (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39: 25-27.
 41. Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P and Scherer SW (2007). Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 81: 1289-1297.
 42. Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L and Jarvela I (2002). A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet* 71: 777-790.
 43. Tentler D, Johannesson T, Johansson M, Rastam M, Gillberg C, Orsmark C, Carlsson B, Wahlstrom J and Dahl N (2003). A candidate region for Asperger syndrome defined by two 17p breakpoints. *Eur J Hum Genet* 11: 189-195.

44. Anneren G, Dahl N, Uddenfeldt U and Janols LO (1995). Asperger syndrome in a boy with a balanced de novo translocation: t(17;19)(p13.3;p11). *Am J Med Genet* 56: 330-331.
45. Roohi J, Tegay DH, Pomeroy JC, Burkett S, Stone G, Stanyon R and Hatchwell E (2008). A de novo apparently balanced translocation [46,XY,t(2;9)(p13;p24)] interrupting RAB11FIP5 identifies a potential candidate gene for autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 411-417.
46. Feuk L, Carson AR and Scherer SW (2006). Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7: 85-97.
47. Devlin B and Scherer SW (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 22: 229-237.
48. Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM and Butler MG (2014). Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* 535: 70-78.
49. Autism Genome Project C, Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Vieland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM, Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Roge B, Mantoulan C, Wittemeyer K, Poustka A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bolte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmotzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, de Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijmans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T,

- McConachie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E, Shih A and Meyer KJ (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39: 319-328.
50. Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD and Hakonarson H (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459: 528-533.
 51. Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW and Rappold GA (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet* 42: 489-491.
 52. Zhang C, Milunsky JM, Newton S, Ko J, Zhao G, Maher TA, Tager-Flusberg H, Bolliger MF, Carter AS, Boucard AA, Powell CM and Sudhof TC (2009). A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *J Neurosci* 29: 10843-10854.
 53. Gauthier J, Siddiqui TJ, Huashan P, Yokomaku D, Hamdan FF, Champagne N, Lapointe M, Spiegelman D, Noreau A, Lafreniere RG, Fathalli F, Joobar R, Krebs MO, DeLisi LE, Mottron L, Fombonne E, Michaud JL, Drapeau P, Carbonetto S, Craig AM and Rouleau GA (2011). Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Hum Genet* 130: 563-573.
 54. Urbano SIDaMR (2011). Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment. InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.

55. Villar-Garea A and Esteller M (2003). DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why? *Curr Drug Metab* 4: 11-31.
56. Bjornsson HT, Fallin MD and Feinberg AP (2004). An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet* 20: 350-358.
57. Li H, Yamagata T, Mori M, Yasuhara A and Momoi MY (2005). Mutation analysis of methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients. *Brain Dev* 27: 321-325.
58. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U and Zoghbi HY (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23: 185-188.
59. Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA, Yasui DH and Lasalle JM (2007). 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 16: 691-703.
60. Meguro M, Mitsuya K, Sui H, Shigenami K, Kugoh H, Nakao M and Oshimura M (1997). Evidence for uniparental, paternal expression of the human GABAA receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer. *Hum Mol Genet* 6: 2127-2133.
61. Herbert MR (2010). Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 23: 103-110.
62. Ming X, Johnson WG, Stenroos ES, Mars A, Lambert GH and Buyske S (2010). Genetic variant of glutathione peroxidase 1 in autism. *Brain Dev* 32: 105-109.
63. Witter FR, Zimmerman AW, Reichmann JP and Connors SL (2009). In utero beta 2 adrenergic agonist exposure and adverse neurophysiologic and behavioral outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 201: 553-559.
64. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR and Boehnke M (2006). Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 38: 209-213.
65. Lauritsen MB, Als TD, Dahl HA, Flint TJ, Wang AG, Vang M, Kruse TA, Ewald H and Mors O (2006). A genome-wide search for alleles and haplotypes associated with autism and related pervasive developmental disorders on the Faroe Islands. *Mol Psychiatry* 11: 37-46.

66. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA and Visscher PM (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-753.
67. Weiss LA, Arking DE, Gene Discovery Project of Johns H, the Autism C, Daly MJ and Chakravarti A (2009). A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* 461: 802-808.
68. Marshall CR NA, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Autism Chromosome Rearrangement Database [CD-ROM]. Department of Genetics and Genomic Biology, MaRS Centre - East Tower, 101 College Street, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada Genomics TCfA; 2008.
69. Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP and State MW (2008). Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 82: 165-173.
70. Lamb JA, Barnby G, Bonora E, Sykes N, Bacchelli E, Blasi F, Maestrini E, Broxholme J, Tzenova J, Weeks D, Bailey AJ, Monaco AP and International Molecular Genetic Study of Autism C (2005). Analysis of IMGSAC autism susceptibility loci: evidence for sex limited and parent of origin specific effects. *J Med Genet* 42: 132-137.
71. Shao Y, Raiford KL, Wolpert CM, Cope HA, Ravan SA, Ashley-Koch AA, Abramson RK, Wright HH, DeLong RG, Gilbert JR, Cuccaro ML and Pericak-Vance MA (2002). Phenotypic homogeneity provides increased support for linkage on chromosome 2 in autistic disorder. *Am J Hum Genet* 70: 1058-1061.

72. Buxbaum JD, Silverman JM, Smith CJ, Kilifarski M, Reichert J, Hollander E, Lawlor BA, Fitzgerald M, Greenberg DA and Davis KL (2001). Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 68: 1514-1520.
73. Cantor RM, Kono N, Duvall JA, Alvarez-Retuerto A, Stone JL, Alarcon M, Nelson SF and Geschwind DH (2005). Replication of autism linkage: fine-mapping peak at 17q21. *Am J Hum Genet* 76: 1050-1056.
74. Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH and Gilliam TC (2003). A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 73: 886-897.
75. Kong X, Murphy K, Raj T, He C, White PS and Matise TC (2004). A combined linkage-physical map of the human genome. *Am J Hum Genet* 75: 1143-1148.
76. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL and Weber JL (1998). Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* 63: 861-869.
77. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM and Geschwind DH (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 82: 150-159.
78. Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, Elia M, Schneider C, Melmed R, Sacco R, Persico AM and Levitt P (2006). A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16834-16839.
79. Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A, Kendall J, Grabowska E, Ma B, Marks S, Rodgers L, Stepansky A, Troge J, Andrews P, Bekritsky M, Pradhan K, Ghiban E, Kramer M, Parla J, Demeter R, Fulton LL, Fulton RS, Magrini VJ, Ye K, Darnell JC, Darnell RB, Mardis ER, Wilson RK, Schatz MC, McCombie WR and Wigler M (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74: 285-299.

80. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM and et al. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371: 130-136.
81. Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT, Almeida J, Bacchelli E, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chu SH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizoi R, Kim C, Klauck SM, Klevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahon WM, Melhem NM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Piven J, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Betancur C, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI, Jr., Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Scherer SW, Sutcliffe JS, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Devlin B, Ennis S and Hallmayer J (2010). A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet* 19: 4072-4082.
82. Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH and Chakravarti A (2008). A common genetic variant in the

- neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet* 82: 160-164.
83. Matuszek G and Talebizadeh Z (2009). Autism Genetic Database (AGD): a comprehensive database including autism susceptibility gene-CNVs integrated with known noncoding RNAs and fragile sites. *BMC Med Genet* 10: 102.
 84. Banerjee-Basu S and Packer A (2010). SFARI Gene: an evolving database for the autism research community. *Dis Model Mech* 3: 133-135.
 85. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
 86. Celep F, Sonmez FM and Karaguzel A (2006). Chromosomal abnormalities in 457 Turkish patients with MCA/MR. *Turk J Pediatr* 48: 130-134.
 87. Celep F, Karaguzel A, Ozeren M and Bozkaya H (2006). The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127: 106-109.
 88. Dong Y, Jiang YT, Du RC, Zhang HG, Li LL and Liu RZ (2013). Impact of chromosomal heteromorphisms on reproductive failure and analysis of 38 heteromorphic pedigrees in Northeast China. *J Assist Reprod Genet* 30: 275-281.
 89. Paz-y-Mino C, Cumbal N, Araujo S and Sanchez ME (2012). Alterations and chromosomal variants in the Ecuadorian population. *J Biomed Biotechnol* 2012: 432302.
 90. Engel SM and Daniels JL (2011). On the complex relationship between genes and environment in the etiology of autism. *Epidemiology* 22: 486-488.
 91. Pebrel-Richard C, Debost-Legrand A, Eymard-Pierre E, Greze V, Kemeny S, Gay-Bellile M, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Goumy C and Francannet C (2013). An unusual clinical severity of 16p11.2 deletion syndrome caused by unmasked recessive mutation of CLN3. *Eur J Hum Genet*.
 92. Chen BY, Zou XB, Zhang J, Deng HZ, Li JY, Li LY, Tang C and Zou YY (2011). [Copy-number variations of SHANK3 and related clinical phenotypes in children with autism]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 49: 607-611.
 93. Luukkonen TM, Poyhonen M, Palotie A, Ellonen P, Lagstrom S, Lee JH, Terwilliger JD, Salonen R and Varilo T (2012). A balanced translocation truncates Neurotrimin in a family with intracranial and thoracic aortic aneurysm. *J Med Genet* 49: 621-629.

94. Venkateshwari A, Srilekha A, Begum A, Sujatha M, Sunitha T, Nallari P and Jyothy A (2011). De novo chromosomal translocation t(3;5)(q13;q35) in an infertile man. *Andrologia* 43: 428-430.
95. Stacy ME, Zablotzky B, Yarger HA, Zimmerman A, Makia B and Lee LC (2013). Sex differences in co-occurring conditions of children with autism spectrum disorders. *Autism*.
96. Coffman MC, Anderson LC, Naples AJ and McPartland JC (2013). Sex Differences in Social Perception in Children with ASD. *J Autism Dev Disord*.
97. Beacher FD, Radulescu E, Minati L, Baron-Cohen S, Lombardo MV, Lai MC, Walker A, Howard D, Gray MA, Harrison NA and Critchley HD (2012). Sex differences and autism: brain function during verbal fluency and mental rotation. *PLoS One* 7: e38355.
98. Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC, Banna L, Brereton AV, Hill A, Bisgaard AM, Muller I, Hultschig C, Erdogan F, Wieczorek G and Ropers HH (2007). Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28: 674-682.
99. Lawson HA, Cheverud JM and Wolf JB (2013). Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. *Nat Rev Genet* 14: 609-617.
100. Keverne EB (2013). Importance of the matriline for genomic imprinting, brain development and behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20110327.
101. Turkington C and Anan R (2007). The encyclopedia of autism spectrum disorders. Facts On File, New York, ix, 324 p.
102. American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic criteria from DSM-IV. The Association, Washington, DC, xi, 358 p.
103. Gillberg C (1998). Asperger syndrome and high-functioning autism. *Br J Psychiatry* 172: 200-209.
104. Rehnstrom K, Ylisaukko-oja T, Nieminen-von Wendt T, Sarenus S, Kallman T, Kempas E, von Wendt L, Peltonen L and Jarvela I (2006). Independent replication and initial fine mapping of 3p21-24 in Asperger syndrome. *J Med Genet* 43: e6.
105. Ylisaukko-oja T, Nieminen-von Wendt T, Kempas E, Sarenus S, Varilo T, von Wendt L, Peltonen L and Jarvela I (2004). Genome-wide scan for loci of Asperger syndrome. *Mol Psychiatry* 9: 161-168.

106. Abrahams BS, Arking DE, Campbell DB, Mefford HC, Morrow EM, Weiss LA, Menashe I, Wadkins T, Banerjee-Basu S and Packer A (2013). SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). *Mol Autism* 4: 36.
107. Bai R, Li D, Shi Z, Fang X, Ge W and Zheng S (2013). Clinical significance of Ankyrin repeat domain 12 expression in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 32: 35.
108. Patil SR and Lubs HA (1977). Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding. *Hum Genet* 38: 35-38.
109. Zhang A, Lin MS and Wilson MG (1987). Effect of C-banded heterochromatin on centromere separation. *Hum Hered* 37: 285-289.
110. Ozkinay F, Ercal D, Ozkinay C, Onay H, Bora E and Erler A (2005). Two extra euchromatic bands in the qh region of chromosome 9. *Genet Couns* 16: 45-48.
111. Deng H-w and Shen H (2007). Current topics in human genetics : studies in complex diseases. World Scientific, Hackensack, NJ, xii, 950 p.
112. Yamada K (1992). Population studies of INV(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet* 37: 293-301.
113. Samonte RV, Conte RA, Ramesh KH and Verma RS (1996). Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. *Hum Genet* 98: 576-580.

EKLER

Ek 1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri

En az ikisi (1)'inci maddeden ve birer tanesi (2) ve (3)'üncü maddelerden olmak üzere (1), (2) ve (3)'üncü maddelerden toplam altı (ya da daha fazla) maddenin bulunması:

(1) Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren toplumsal etkileşimde Nitel bozulma:

- (a)Toplumsal etkileşim sağlamak için yapılan el kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi sözel olmayan bir çok davranışta belirgin bir bozulmanın olması.
- (b)Yaşlılarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememe,
- (c)Diğer insanlarla eğlenme, ilgilerini ya da başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örn. İlgilendiği nesneleri göstermeme, getirmeme ya da belirtmeme)
- (d)Toplumsal ya da duygusal karşılıklar vermeme

(2) Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren iletişimde nitel bozulma:

- (a)Konuşulan dilin gelişiminde gecikme olması ya da hiç gelişmemiş olması (el, Kol ya da yüz hareketleri gibi diğer iletişim yollarıyla bunun yerini tutma girişimi eşlik etmemektedir.)
- (b)Konuşması yeterli olan kişilerde, başkalarıyla söyleşiyi başlatma ya da sürdürmede belirgin bir bozukluğun olması.
- (c)Basmakalıp ya da yineleyici ya da özel bir dil kullanma,
- (d)Gelişim düzeyine uygun çeşitli, imgesel ya da toplumsal taklitlere dayalı oyunları kendiliğinden oynamama.

(3) Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, basmakalıp ve yineleyici örüntülerin olması:

- (a)İlgilenme düzeyi ya da üzerinde odaklanma açısından olağandışı, bir ya da birden fazla basmakalıp ve sınırlı bir örüntüsü çerçevesinde kapanıp kalma.
- (b)Özgül, işlevsel olmayan, alışageldiği üzere yapılan gündelik işlere ya da Törenselle davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma,
- (c)Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örn. Parmak şıklatma, el çırpma ya da burma ya da karmaşık tüm vücut hareketleri)

Ek 1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri (Devam)

(d)Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma.

B. Aşağıdaki alanlardan en az birinde, 3 yaşından önce gecikmelerin ya da olağandışı bir işlevselliğin olması:

- (1) Toplumsal etkileşim,
- (2) Toplumsal iletişimde kullanılan dil ya da
- (3) Sembolik ya da imgesel oyun.

C. Bu bozukluk Rett Bozukluğu ya da Çocukluk Dizintegratif Bozukluğu ile daha iyi açıklanamaz.

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

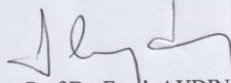
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı: “Otizm Spektrum Bozuklukların Genetik Etiyolojisinin Araştırılması”
Çalışmacılar: Doç.Dr.Ersan KALAY, Prof.Dr.Sema KANDİL, Doç.Dr.Ali CANSU
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ABD.

Etik Kurul Dosya No 2010/08	Etik Kurul Toplantı Tarihi 23.05.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/11	Etik Kurul Karar No 5
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Gamze ÇAN’ın başkanlığında “Otizm Spektrum Bozuklukların Genetik Etiyolojisinin Araştırılması” başlığını taşıyan çalışmasının, araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (23.05.2011)


Prof.Dr. Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı
Tıbbi Mikrobiyoloji Abd

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport :
Soyadı, Adı : ÖZTÜRK, Banu
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 23/02/1983, Çorlu
Medeni hali : Bekar
Telefon :
E-Posta : ozturkbanu83@hotmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	:	
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2013
Lisans	: İstanbul Üniversitesi	2006
Lise	: Trabzon Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Yüksek Lisans Öğrencisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2013-halen

YABANCI DİL

İngilizce