

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

OTİZM BULGUSU GÖSTEREN  
BİREYLERDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN  
ARRAY CGH YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI

Dr. Zafer YÜKSEL

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR  
2013



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

OTİZM BULGUSU GÖSTEREN  
BİREYLERDEKİ GENETİK DEĞİŐIKLİKLERİN  
ARRAY CGH YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI

Dr. Zafer YÜKSEL

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI  
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN

ESKİŞEHİR  
2013

**TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI****T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Dr. Zafer YÜKSEL'e ait "Otizm bulgusu gösteren bireylerdeki genetik değişikliklerin array cgh yöntemi ile ortaya konması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 18.02.2013

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Sevilhan ARTAN Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Dilek AKTAŞ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (Hacettepe Üniversitesi)
Üye	Yrd. Doç. Dr. S. Tülin FİDAN Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun ..... Tarih ve .../... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren hocalarım Prof. Dr. Sevilhan ARTAN'a, Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS'a ve Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e; bölümümüzde birlikte çalıştığım meslektaşlarım Araş. Gör. Dr. Fatih CELAYİR'e, Araş. Gör. Dr. Abdullah İhsan GÜRLER'e, Uzm. Dr. Kadri KARAER'e, çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Halime KÜÇÜK'e, Uzm. Bio. Ebru ERZURUMLUOĞLU'na; tezimin projelendirilmesinde yardımcı olan Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Koordinatörü Doç. Dr. Mahmut YAVUZ ve saygıdeğer üyelerine; olguların değerlendirilmesi ve yönlendirilmesinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. S. Tülin FİDAN'a; deney malzemelerinin temini ve uygulaması konusunda yardımcı olan SemLab çalışanları Ece TÜRKMEN'e, Boğaç ÇAĞIL'a ve Halil İbrahim KISAKESEN'e yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

**Yüksel, Z. Otizm bulgusu gösteren bireylerdeki genetik değişikliklerin array CGH yöntemi ile ortaya konması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2012.**

Otizm sosyal etkileşimde bozulma, iletişimde bozulma ve tekrar eden ve basmakalıp davranışlar ile karakterize bir hastalıktır. Son on yılda otizm spektrum bozukluk/yaygın gelişimsel bozukluk (OSB/YGB) etiolojisinden sorumlu olduğu düşünülen genetik bileşenlere dair önemli verilere ulaşılmıştır. İnsan genomunun yüksek çözünürlükle taranmasındaki teknolojik ilerlemeler ve genomik varyasyonun kaynağı olarak bilinen kopya sayısı değişikliklerinin (KSD) tanımlanması, klinik olarak anlamlı lokusların tespit edilmesine yol açmıştır. Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) yöntemi otizmlili bireylerde geleneksel sitogenetik yöntemlere göre beş kat daha fazla tanımlama yapabilmektedir. Patojenik genomik değişikliklerin YGB'li olguların %10'undan fazlasında tanımlanması KSD'lerin YGB genetik etiolojisindeki önemini vurgulamaktadır. Çalışmamıza toplam 37 YGB'li olgu dahil edildi. Tüm olguların dismorfik değerlendirmeleri, karyotip ve Frajil X analizleri ile Agilent® 8x60K platformu kullanılarak aCGH analizleri gerçekleştirildi. Olguların % 5.4'ünde (2/37) kromozom anomalisi, yaklaşık %30'unda (11/37) da KSD'ler tespit edildi. Saptanan KSD'lerin %54'ü (6/11) delesyon, %46'sı (5/11) ise duplikasyon idi. Olguların klinik özellikleri ile KSD'lerinin saptandığı lokuslardaki aday genler arasındaki olası ilişkiler tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar, Otistik Spektrum Bozukluklar, Otizm, Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD), aCGH

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje No 2011-11036

## ABSTRACT

**Yuksel, Z. Investigating copy number variations in individuals showing autistic features using array comparative genomic hybridization method. Eskisehir Osmangazi University, Medicine Faculty, Medical Genetics Department, Medical Specialty Thesis, Eskisehir, 2012.** Autism is a disorder characterized by impaired social relationships, impaired language and communication, and repetitive behaviors. In the last decade, important evidence has been published about the genetic aetiology of autism spectrum disorders (ASD). Technologic advancement in screening human genome at high resolution and recognition of copy number variations (CNVs) as a prevalent source of genomic variation has led to identify clinically relevant loci. Array comparative genomic hybridization (aCGH) has up to fivefold increase in diagnostic yield when compared with conventional cytogenetic methods. Pathogenic genomic variations identified upwards of 10% of ASD cases highlighting an important role for CNVs in the genetic aetiology of ASD. In our study, we analyzed karyotypes and CNVs of 37 cases from Eskisehir region diagnosed as autism spectrum disorder and assessed their clinical effects. All cases were assessed in a clinical genetic setting and karyotype and Fragile-X analysis as well as aCGH using Agilent® 8x60K platform were performed. Chromosomal anomaly was found in 5.4% (2/37) while CNVs were found in approximately 30% (11/37). detected CNVs were distributed as 54% deletion (6/11) and 46% duplication (5/11). Clinical features and the possible responsible genes on the detected CNV loci were discussed.

Key Words: Pervasive Developmental Disorders, Autism Spectrum Disorders, Autism, Copy Number Variations (CNV), aCGH

Supporting Institutions: Scientific Research Project Commission, Eskisehir Osmangazi University, Project No 2011-11036

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Tarihçesi	3
2.2. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Prevelansı	4
2.3. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Klinik Özellikleri	5
2.3.1. Sosyal Etkileşimde Bozulma	6
2.3.2. İletişimde Bozulma	7
2.3.3. Tekrar Eden ve Basmakalıp Davranışlar	7
2.3.4. Diğer Bulgular	8
2.4. Yaygın Gelişimsel Bozukluktaki Fenotipler	9
2.5. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı	11
2.5.1. Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Tanı ve Tarama Araçları	13
2.6. Otizmin Genetik Nedenleri	14
2.6.1. Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler	14
2.6.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD'ler)	15
2.6.3. Tek Gen Hastalıkları	17
2.6.4. Metabolik Durumlar	19
2.7. Otizmin Diğer Nedenleri	21
2.8. Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH)	22



	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Hasta Grubu	26
3.2. Gereçler	26
3.2.1. Kullanılan Aletler	26
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.3. Yöntemler	28
3.3.1. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	28
3.3.2. Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi	29
3.3.3. Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi	30
3.3.4. Genomik DNA'nın Floresan İşaretleme	31
3.3.5. Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi	33
3.3.6. Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması	33
3.3.7. Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması	34
3.3.8. Mikroarray Hibridizasyonu	35
3.3.9. Hibridizasyon Sonrası Yıkama	36
3.3.10. Mikroarray Taratılması	37
3.3.11. İmaj Dosyalarının Analizi	37
4. BULGULAR	40
4.1. Olguların Demografik Özellikleri	40
4.2. Olguların Klinik Özellikleri	40
4.3. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler	42
4.4. Olgularda Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD'ler)	42
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR

aCGH	Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
ADI-R	Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş
ADOS	Otizm Tanı Gözlem Programı
AEİ	Anti Epileptik İlaçlar
AGAT	L-arjinin:glisin amidinotransferaz
AKK	Ana Kesim Karışımı
AS	Asperger Sendromu
ASDI	Asperger Sendromu Tanı Görüşmesi
ASSQ	Otizm Spektrum Tarama Anketi
BAC	Bakteriyel Yapay Kromozom
bç	Baz Çifti
CAST	Çocukluk Çağı Asperger Sendromu Testi
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CHL1	Hücre adezyon molekülü L1CAM (L1'in yakın homoloğu) homoloğu
ÇODÖ	Çocukluk Çağı Otizmi Değerlendirme Ölçeği
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DSM	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı
DSM-IV-TR	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. baskı düzeltilmiş metni
EAK	Etiketleme Ana Karışımı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EEG	Elektroensefalografi
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FKÜ	Fenilketonüri
GAMT	Guanidino Asetat Metil Transferaz
GARS	Gilliam Otizm Skorlama Ölçeği
gDNA	Genomik Deoksi Ribo Nükleik Asit
GTG	Tripsin ile G-bantlama ve Giemsa ile boyama
KES	Kreatin Eksikliği Sendromları

KSD	Kopya Sayısı Değişiklikleri
LKS	Landau-Kleffner sendromu
M-CHAT	Değiştirilmiş-Erken Çocukluk Dönemi Otizm Kontrol Listesi
MMR	Kızamık Kabakulak Kızamıkçık
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF1	Nörofibromatozis 1
OB	Otistik bozukluk
ODKL	Otizm Davranış Kontrol Listesi
ODÖ	Otizm Dismorfoloji Ölçümü
OSB	Otizm Spektrum Bozukluklar
PAC	P1 Plazmid Yapay Kromozomu
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
SLOS	Smith-Lemli Opitz Sendromu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TE	Tris Edta
TSK	Tüberoz Sklerozis Kompleksi
WAGR	Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon
YGB	Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
YGB-BTA	Yaygın Gelişimsel Bozukluk - Başka Türü Adlandırılmayan
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
ZB	Zeka Bölümü

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. aCGH işlemlerinin genel özeti	24
3.2. Enzimatik Kesim İşleminin Değerlendirilmesi	31
3.3. Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi	37
3.4. <i>Feature Extraction 10.5.1.1</i> Yazılımının Standart Ayarları	38
3.5. <i>Feature Extraction 10.5.1.1</i> yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği - 1	39
3.6. <i>Feature Extraction 10.5.1.1</i> yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği - 2	39
4.1 1 nolu olguya ait 16p11.2'de yer alan delesyon bölgesi görüntüsü	43
4.2 16 nolu olguya ait 2q37'de yer alan delesyon bölgesi görüntüsü	44
4.3 48 nolu olguya ait Xq22.1'de yer alan duplikasyon bölgesi görüntüsü	45

**TABLÖLAR**

	Sayfa
2.1. Otistik Bozukluk— DSM-IV Tanı Kriteri (tanı kodu 299.00)	11
3.1. Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı	30
3.2. Ana Kesim Karışımının Hazırlanışı	30
3.3. Isı Döngüleyicisi Programı	31
3.4. DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için ısı döngüleyicisi programı	32
3.5. Etiketleme Ana Karışımı Hazırlanışı	32
3.6. DNA Etiketlemesi için ısı döngüleyicisi programı	32
3.7. Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri	34
3.8. Hibridizasyon Ana Karışımı Hazırlanması	35
3.9. Isı döngüleyicisi programı	35
4.1. Çalışmamıza dahil olan olguların cinsiyet dağılımları	40
4.2. Olguların DSM-IV-TR'ye Göre Tanı ve Dismorfik Özellikleri	40
4.3. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozom Anomalileri	42
4.4. Olgularımızın aCGH Analiz Sonuçları	46
4.5. Kopya Sayısı Değişikliklerinin Kromozomlara Göre Dağılımı	47

## 1. GİRİŞ

Otizm, "otizm spektrum bozukluklar/yaygın gelişimsel bozukluklar" (YGB) olarak anılan; sosyal ilişkide bozulma, dil ve iletişim bozukluğu ve tekrarlayıcı davranışlar veya ilginin az olması gibi özellikleri paylaşan klinik olarak heterojen hastalıklar grubundan oluşmaktadır. Yaklaşık olarak %30'u 'gerileyen' başlangıca sahip olmasına rağmen çoğu çocuk için otizm belirtileri 18 - 24 ay arasında fark edilir (1). Otistik çocukların yaklaşık %50-70'i sözel olmayan ZB (Zeka Bölümü) testleri ile zeka yaşlarıyla kıyaslandığında yetersiz olarak tanımlanmaktadır (2) ve yaklaşık %25'inde epileptik nöbetler görülür (3). Otizm dismorfik bulguların ve/veya mikrosefalinin olması ile karmaşık; fiziksel anomalilerin ve mikrosefalinin yokluğu ile esansiyel olarak adlandırılmaktadır (4). YGB tanı kriterine uyan 2-3 yaşındaki çocukların yaklaşık %25'i sonradan konuşmaya ve iletişim kurmaya başlamaktadır ve 6-7 yaş itibarı ile normal sağlıklı çocuklarla birlikte okula devam etmektedir. Geriye kalan %75 ise ömür boyu ebeveyn bakımı, özel eğitim ve sosyal destek gerektiren engellere sahip olmaktadır (5).

Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. baskının düzeltilmiş metninde (DSM-IV-TR) yer alan davranış ölçütleri gerek ABD'de gerekse de dünya çapında otizm tanısı koymak için standart olarak kullanılmaktadır (6). Şimdiye kadar üç alt grup [Otistik bozukluk (OB), Asperger Sendromu (AS) ve Yaygın Gelişimsel Bozukluk-Başka Türü Adlandırılmayan (YGB-BTA)] tanımlanmıştır (7). Bir çocuğun OB (örn, klasik otizm) tanısına aday olması için üç yaşından önce sosyal etkileşim, sosyal iletişimde kullanılan dil veya sembolik/imgesel oyunlarda ve basmakalıp motor hareketlerde anormallikler veya kısıtlı ilgiye sahip olması şeklinde anormalliklerle ilgili 12 belirtiden en az 6 belirtiyi göstermesi gerekmektedir. Eğer OB için tanı kriterleri karşılanmıyorsa, YGB içinde yer alan diğer iki hastalıktan; AS veya YGB-BTA tanısına uyabilir. Otizm birden fazla nedeni, sonucu ve tedavi yanıtı ile giden yüzlerce nörolojik temelli sendrom ile birlikte bildirilmiştir. 2006'da Rett Sendromunun moleküler temelini keşfiyle birlikte birçok etiyojijiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde hala otizmlili bireylerin %15-20'sinde etiyojiji tanımlanabilmektedir (8).

Etiyolojisi bilinmeyen otizmliler için genetik danışma ve risk hesaplaması özel tanının genetiği temeline dayanmaktadır. Nedeni bilinmeyen otizmde, kardeşlerin ampirik riski otizm için %5-10; dil, sosyal ve psikiyatrik bozuklukları içeren daha hafif durumlar için %10-15'tir (4, 9). İki veya daha fazla etkilenmiş çocukları bulunan aileler için tekrarlama riski %35'e ulaşmaktadır (10). Esansiyel otizmi olan probandın erkek kardeşlerinde otizm için risk %7, hafif YGB için ek olarak %7'lik bir risk daha mevcuttur. Esansiyel otizmi olan probandın kız kardeşlerinde otizm için %1 risk vardır; hafif YGB için risk bilinmemektedir. Kompleks otizmi olan probandın kardeşlerinde tekrarlama riski otizm için %1 ve hafif YGB için ek olarak %2'dir (4).

İkiz ve aile çalışmaları otizmin genetik temelini ortaya koymuş ve kalıtlılabirliğin %90'ın üzerinde olduğunu belirtmiştir (11). Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde kromozom anöploidilerini ortaya koymaktadır. Diğer bir %3-5'lik kısım ise FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) teknikleri kullanılarak tanımlanabilmektedir. Eşlik eden dismorfolojisi olan otizmlilerde çoğunlukla dengesiz kromozom anomalileri bulunmaktadır (4, 12). Otizmde hemen hemen her kromozomda kromozom anomalisi tanımlanmasına rağmen, sadece bir kaç otizm genleri için muhtemel lokusları içerir gözükmektedir (13-15). Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) otizmlilerde çocukların değerlendirilmesinde giderek yüksek çözünürlüklü kromozom analizi ve FISH yönteminin yerini almaktadır. Günümüzde aCGH, nedeni bilinmeyen otizmlilerde bireylerin %7-10'unda *de novo* genomik dengesizlikleri tanımlayabilmektedir; otörlerin yazında "*sendromik*" otizm olarak tanımlanan bireylerde oranlar daha yüksek bulunmuştur (15-17).

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan, dismorfik açıdan Tıbbi Genetik Polikliniği'nde değerlendirilen ve karyotip analizi yapılan 37 olgunun periferik kan örneklerinden aCGH yöntemi ile analiz yapılmıştır. Böylelikle bu çalışma ile Eskişehir bölgesinde YGB tanılı olan olguların kopya sayısı değişikliğinin (KSD) ortaya konması, tanısal amaçlı kullanılabilirliği, elde edilen veriler ile moleküler etiyojisinin anlaşılmasına katkıda bulunulması ve genetik danışmanlığın yapılabilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Tarihçesi

Otizm, YGB olarak anılan; sosyal ilişkide bozulma, dil ve iletişim bozukluğu ve tekrarlayıcı davranışlar veya ilginin az olması gibi özellikleri paylaşan klinik olarak heterojen hastalıklar grubundan oluşmaktadır.

Otizm tanımlandıktan sonraki 60 yılda bu hastalığı anlamamıza yardımcı olabilecek bir çok değişiklik meydana geldi. Otizm ve diğer yaygın gelişimsel bozukluklar ile ilgili özellikler aşağıda özetlenmiştir.

Dr. Leo Kanner 1943 yılında 11 çocuğun davranışını tarif ettiği bir makale yayınlamış ve makalesinde ilk kez "otistik" tanımını kullanmıştır (18). Aslında Kanner'dan çok önce duygusal olarak farklı, garip veya zeka geriliği diye nitelendirilen çocukların aslında otistik olduğu fark edildi; örneğin Uta Frith (19) Bonnaterre'in yazımlarında (20) geçen "Aveyron'lu vahşi çocuk" olan Victor'u otistik olarak değerlendirmiştir. Kanner, otizm terimini şizofreni terimini de yazına kazandıran Bleuler'den almıştır (21); Yunanca'da *autos* (kendi) ve *ismos* (durum veya harekete ait bir ek) kelimelerinden oluşan "otistik" sıfatı kullanılmıştır ve sonradan "otizm" ismine dönüşmüştür. Kanner ve Eisenberg (22) sosyal ilişkide bozulma ve aynılıkta ısrar etme durumunu tanı kriteri olarak kullanırken, Rutter (23) dil ve dil gelişimi bozukluklarının olmazsa olmaz tanı kriteri olarak kullanılması gerektiğini vurgulamıştır. Bettelheim (24) otizmin nedeni olarak duygusuz anneler tarafından yetiştirilmenin veya annesiz olma durumunun otizmin nedeni olabileceğini öne sürmüştür. 1970'lerde otizmin çocukluk çağı şizofrenisi olabileceği düşünülmüş ve etiyolojideki biyolojik faktörleri araştıranlar büyük kromozom anomalileri bulmuş (25); ikiz (26) ve aile çalışmaları (27) yapmışlardır. 21 ikizin dahil edilerek yapıldığı çalışma o güne kadarki en iyi genetik kanıtı ortaya koymuştur (28). Otizmin biyolojik yönü gün yüzüne çıktıkça psikojenik teoriler geçerliliğini ve popülaritesini yitirmiştir (29). Bir çok araştırmacı ruhsal hastalıkların çoğunda olduğu gibi çoklu ve birbiri ile etkileşen nedensel faktörleri araştırmak üzere hem fikir olmuştur (30).

Kanner otizm tanımını 1943'te yapmasına karşın 1952'de yayınlanan DSM-I'de yer almamıştır. 1968'te DMS-II'nin yayınlanması ile otizm ayrı bir antite olarak yer bulmuştur (31). 1980'de yayınlanan DSM-III bir çok konuda radikal değişiklikler



yaparken infantil otizm de ayrı bir kategori olarak yer almıştır (32). Otizm DSM-III'te gelişim ve kişilik bozukluklarının altında sınıflandırılmış, infantil otizm YGB başlığı altındaki iki durumdan biri olarak yer almıştır (33). Diğer durum ise YGB-BTA olarak belirlenmiştir. DSM'de yapılan değişiklik (DSM-III-R) 1988 yılında yayınlanmış ve OB (299.00) tanı kriterleri genişletilerek yaygın gelişim geriliği kategorisi, eksen II'de yer almıştır. 1994'te bugün de tanı kriteri olarak kullanılan DSM-IV yayınlandı. DSM IV'te OB eksen I'e alındı ve YGB'ler günümüzde YGB terimi ile anılan OB, AS, Rett Sendromu, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu ve YGB-BTA buraya dahil edildi. OSB terimi hiç bir DSM'de yer almamasına rağmen bilimsel literatürde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kanner ile eş zamanlı olarak Asperger 1944'te benzer özellikler gösteren çocuklar tarif etti (34). Asperger'in tanımından sonra yayınlanan iki rapor (35, 36) tanımlanan bu çocukların değişen derecede benzer belirtileri olan ve otizmin devamı niteliğindeki durumlar olduğunu bildirmiştir. Bu tanımlamayı takiben OSB terimi kullanılmaya başlanmıştır (37). *MECP2* genindeki mutasyonların Rett Sendromlu olgularda tespit edilmesi (38) ve OB kriterine sıklıkla uymaması nedeniyle Rett Sendromu, DSM-IV-TR'ye (39) göre ayrı bir OB olarak sınıflandırılmaması uygun görülmüştür. Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu, diğer adıyla Heller Sendromu veya dezintegratif psikoz ise ilk olarak Heller (40) tarafından 1908'de tanımlanmıştır.

## 2.2. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Prevelansı

Otizm spektrum bozuklukların tümü ile ilgili prevelans artış bildirimleri dünyanın çeşitli yerlerinden yapılmaktadır. 1990'a kadar, çoğu çalışma otizm için genel toplum prevelansının 4-5/10,000 (1/2000-1/2500) olduğunu tahmin etmekte idi (41). 1990'lar boyunca, Japonya, İngiltere ve İsveç'teki okul öncesi çocuklarda yapılan çalışmalar otizm için prevelansın 21-31/10,000 (1/476-1/323) olduğunu bildirdi (42, 43).

Brick Township, New Jersey'de yapılan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) vaka bulma çalışması prevelansın otizm için 40/10,000 (1/250) ve bütün YGB'ler için 67/10,000 (1/149) olduğunu bildirdi (44).

Birleşik Krallık'ta çocuk sağlığı ve gelişiminin 7, 18, 24 ve 72 aylık iken izlendiği bir epidemiyolojik çalışma, beş yaşından küçük çocuklarda prevelansın otizm için 16.8/10,000 (1/595) ve YGB'ler için 63/10,000 (1/159) olduğunu bildirdi

(45). Bu oranlar altı yaşından küçük çocuklarda prevelansın otizm için 22/10,000 (1/455) ve YGB'ler için 59/10,000 (1/169) şeklinde rapor edilmesi ile teyit edildi (46).

ABD'de yakın zamanda yapılan iki çalışma üç-on yedi yaş arasındakilerden 1/91 ve üç-sekiz yaş arasındakilerden 1/110 oranında çocuğun YGB tanısı aldığını bildirmiştir (46, 47).

Yakın zamanlı "*otizm epidemisi*" çalışmaları YGB insidansındaki artışın gerçeği yansıtmadığını kabul etmektedir, bu artış tanı ölçütlerinin genişletilmesiyle daha fazla vaka bulunmasına bağlanmaktadır (48).

YGB'deki en büyük artışı bulan çalışmalar aynı zamanda bu çocuklarda düşük oranda rastlanan entelektüel yetersizliği de belirtmiştir. Önceki çalışmalardaki %70 oranı ile karşılaştırıldığında YGB'si olan çocukların sadece %30'u entelektüel yetersiz olarak değerlendirilmiştir (46). Bu durum daha az düzeyde dil bozulması ve saldırgan davranışla giden (hafif otistik belirti) yüksek fonksiyonlu çocukların çoğunun geçmişteki epidemiyolojik izlemlerde sayılmadığını düşündürmektedir. Otizmle ilgili devam eden epidemiyolojik bir çalışma otizmdeki artışın ilerlemediğini göstermektedir. Söz konusu çalışma, daha erken yaşta tanı alanların ve daha hafif bulguları olanların dahil edilmesinin, artışın 2/3'ünden fazlasını oluşturduğunu dolayısı ile mevcut artışın gerçek bir artış olabilme ihtimalini de belirtmiştir (49).

### **2.3. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların Klinik Özellikleri**

YGB iki-üç yaş civarında fark edilmektedir. Süt çocukları tipik olarak tutulmaya veya kucaklanmaya tepki vermezler ve kucağa alınmak için herhangi bir girişimde bulunmazlar. Sıklıkla "*sancılı*" olurlar ve zor yatıştırılırlar, tipik olarak yalnız bırakıldıklarında daha çabuk sakinleşirler. Göz teması başlatmada yetersiz olabilirler veya göz temasından kaçınabilirler ya da boşluğa bakabilirler. Uyku bozuklukları ve duyuşsal durumlar ilk yılda fark edilebilir. Erken bulgulara rağmen YGB'li çocuklara sıklıkla ikinci yıldan sonra yani dil gelişim gecikmesi belirgin olduğu zaman tıbbi açıdan fark edilip tanı konabilmektedir.

YGB belirtilerinin başlangıcı çoğu olgu için aşama aşamadır; bununla birlikte yaklaşık %30'u "*gerileyici*" başlangıca sahiptir. Bu çocuklar konuşmaya başlar ve sonra ya aşamalı ya da hızlı bir şekilde konuşma kaybolur. Bir kaç gün içinde, çocuk göz kontağı kurmayı reddedebilir ve ismine bakmayı bırakabilir. İşitme testleri

normal olmasına rağmen sıklıkla işitmediğinden şüphelenilmektedir. Tekrarlayıcı davranışlar erken dönemde veya çocuk üç/dört yaşına gelene kadar gelişebilir. Bu çocukların iyi olduğu ve sonradan bazı ekzojenik maruziyetler ile bu hale geldiği tartışılmasına rağmen, birinci doğum günü videolarının görüntüleri geriye dönük analizi ile birlikte nöropatolojik çalışmalar, gerileyen gidişatın genetik olarak belirlendiğini öne sürmüştür (1).

YGB tanı kriterlerine uyan çocukların yaklaşık %25'i iki veya üç yaşında sonradan konuşmaya ve iletişim kurmaya başlamaktadır ve altı yedi yaşlarında değişen oranlarda normal okula başlamaktadır. Bu grup için bile sosyal bozulmalar genellikle devam etmektedir. Geriye kalan %75 ise yoğun bir şekilde ebeveyn, okul ve sosyal destek gerektiren engellere ömür boyu sahip olmaktadır. Bazı çalışmalar otizmlili çocukların %5'ten daha azının tamamen iyileştiğini belirtmiştir (50); bununla birlikte daha az etkilenmiş çocukları dahil etmek için tanı kriterinin genişletilmesi bu sayıyı artırmaktadır. 22 - 46 yaş arasında otizm tanısı alan ve ortalama veya ortalamaya yakın bilişsel yetenekleri olan erişkinlerin 1980'lerden 2000'li yıllara uzanan yaklaşık 20 yıllık takibi, bireylerin yarısının oldukça iyi olduğunu yarısının tam zamanlı veya yarı zamanlı işlerde çalıştığını ortaya koymuştur; bununla birlikte %12'sinin bağımsız, %56'sının ise ebeveynleri ile birlikte yaşadığını tespit etmiştir (5).

YGB tam olarak sosyal etkileşimde bozulma, iletişimde bozulma ve tekrar eden ve basmakalıp davranışlar şeklinde üç temel belirti çerçevesinde tanımlanmıştır.

### **2.3.1. Sosyal Etkileşimde Bozulma**

Sosyal etkileşimde bozulma otizmlili bireyleri etrafındakilerden ayırır. Klasik otizmlili çocuklar diğer insanları "*okuyamaz*", onları reddeder ve sıklıkla göz temasından kaçınır. Tipik olarak, diğerlerine rahat vermez veya rahat durmaz ve ebeveynlerine oyuncak veya resim getirmek gibi "*diğeri*" ile ilgili olan ortak ilgileri paylaşmaz. Onun yerine ebeveynlerini obje olarak kullanır ve istedikleri bir şeyi almak için onların üzerine çıkabilir, ellerini çekebilirler veya bir alet kullanıyormuş gibi ebeveynlerin ellerini nesnelere üzerine yerleştirebilirler. Klinikte, derginin sayfalarını çevirmekten veya arabanın tekerleğini döndürmekten hoşlanan çocuk, basit bir muayene girişiminden tedirgin olabilir. Evde, kendi başına olmayı, kendi ile ilgilenmeyi, sıklıkla tekrarlayan aktiviteler yapmayı tercih eder. Fonksiyonel veya

kendiliğinden olan "yap-ınan" oyununun eksikliği karakteristiktir. Oyuncaklar sıralanır, sınıflanır, döndürülür veya fırlatılır fakat hayal ürünü oyunlarda veya bebeği beslemek veya bulaşıkları yıkamak gibi günlük aktivitelerin taklit edilmesinde kullanılmaz. Oyun ortaya çıktığında ise yapılandırılmıştır ve rastgele değildir. Otizmlı çocuk yaşlıları ve kardeşleri ile arkadaşlık kurmada başarısız olur. Okulda, sıklıkla diğer çocukları ayakta belli bir mesafeden izler. Bazı çocuklar sosyal yaklaşımlara yanıt verir. Diğerleri etkileşim ararken ilk adımı atmakta zorlanır ama normal arkadaşlıkları ilerletmenin nasıl olduğuna dair algıları azdır.

### **2.3.2. İletişimde Bozulma**

Otizmlı çocuklar konuşma, vücut hareketleri veya yüz ifadesi ile karşılıklı iletişim geliştirmede başarısız olur. Çocuklar karakteristik olarak sürekli bakış kullanımında ve ebeveyninin dikkatini yönlendirmede başarısız olur. Erken edimsel beceriler sınırlıdır. Edimsel becerilerdeki eksiklikler yaşam boyu devam eder ve hem dil hem de sosyal etkileşimi etkilemektedir. Erken çocukluk döneminde konuşmayı nesnelere adlandırmak, oyuncak istemek veya diğerleri ile kaynaşmak için bütünlüğü kavranamamış bir şekilde kullandığı gözlenmektedir. Zeka geriliği olan veya ifade dilinden daha iyi algısal dile sahip olan (birincil dil gelişim bozukluğu) çocuklara kıyasla otizmlı çocuklar bozulmuş algısal dile sahiptir. Otizmlı çocuk konuşmayı öğrendiğinde, ekolali, zamirleri tersine çevirme ve alışık olmayan çekimler ve tonlamalar içerebilen tekrarlayıcı konuşma sergiler. Tek kelimelik ifadeler kullanarak konuşmaya başlayan tipik gelişimin aksine, otizmlı çocuklar reklamlar, filmler veya başkalarının konuşmalarından oluşan bir tarz ile konuşmaya başlayabilirler. Bu konuşma tarzı sıklıkla özel bir anlama gelmektedir; otizmlı çocuk kelimelerin bilinen anlamını anlamaz. Karşılıklı konuşmayı devam ettirmek, sıra almak ve konuşulan kişilerin konularını anlatmasına müsaade etmek gibi durumları içeren edimsel zorluklar, ifade edici konuşma gelişimine rağmen genellikle devam etmektedir (1).

### **2.3.3. Tekrar Eden ve Basmakalıp Davranışlar**

Süt çocukluğu döneminde olanlar dik dik bakabilirler veya taş gibi olabilirler. Yürümeye yeni başlamış çocuklar tel çevirme, sayfa çevirme veya yalama gibi basmakalıp parmak hareketlerine sahip olabilir. Etrafında dönmek ve ileri geri koşmak gibi bütün vücudu ilgilendiren tekrar edici hareketler de olabilir. Tekrar edici

davranışlar sıklıkla yüzün bir kısmına doğru parmakları tutma ve onları yandan bakarak izleme gibi görsel bir bileşen içermektedir. Bazen hareketler kişiselleştirilmiş okşama, silme veya döndürme dizileri gibi çok karmaşık olabilmektedir. Bu basmakalıp hareketler saatlerce devam edebilmektedir. Tekrar edici hareketlerin nedeni açık olmamasına rağmen, yatıştırıcı etkisi olduğu ve stres zamanlarında (özellikle daha büyük çocuklarda) yüzeye çıktığı görülmektedir. Bu tekrar durumu günlük hayatta aynılığın devamı ihtiyacının katı bir şekilde belirtilmesini yansıtmaktadır. Otizmliler çocuklar olayların sırası, özenle seçilmiş kelimeler ve takip edilmesi gereken nesnelere düzenlenmesi gibi özenle hazırlanmış ritüeller geliştirebilir. Ebeveyn veya bakıcıların tarif edilen olaylar sırasına uymaması yatıştırılmaz taşkınlıklara sebep olabilir.

#### **2.3.4. Diğer Bulgular**

Elektrikli süpürge gibi yüksek ve tiz sesler son derecede büyük rahatsızlıklara neden olabilir. Belli başlı kıyafetlerin hissi veya dokunuşu dayanılmaz olabilir; tam tersine, yanma, yırtılma gibi gerçekten acı verici uyaranlar fark edilmeyebilir.

Belli yiyecekleri veya sadece belli restoranlardan olan yiyecekleri yemek gibi, yemek ve onların sunumu ile ilgili tuhaf davranışlar görülebilir.

Gece hiç uyumama, uykuya dalmada problem veya güne saat sabah 02:00'de başlama gibi anormal uyku düzeni olguların %60'ında görülür.

Öfke nöbetleri ve/veya kendine zarar verme ve saldırgan davranışlar rutinde bir değişiklik ile ortaya çıkabilmektedir; istenmedik bir dokunuş, istemedikleri bir şeyin yapılmasının istenmesi veya belli bir neden olmaksızın ortaya çıkabilir.

Erken dönemde topuk yürüyüşü, hipotoni, sakarlık ve iki tekerlekli bisiklet kullanamama gibi motor gelişim gecikmesi bulguları görülebilir. Tehlikenin farkında olmamaları nedeniyle, boğulma gibi nedenlerden ötürü ölüm tehlikesi mevcuttur.

Otizmliler ergenlerin veya genç erişkinlerin %15 kadarının hareketlerinin orta safhasında donma ve yavaşlık ile giden belirgin hareket bozukluğu, ses çıkarma ve öz bakım yeteneklerinde gerileme şeklinde katatoni sendromu geliştirdiğine dair kanıtlar mevcuttur.

Obezite, nedeni belli olmayan bir şekilde ortak olarak görülen bir komplikasyondur. İlaç yan etkisi, aktif olmayan hayat tarzı ve saldırganlık ortaya

çıkabilir endişesi ile yiyecekleri çocuklardan uzak tutmadaki güçlük obezitenin nedenleri arasında yer alabilir.

#### 2.4. Yaygın Gelişimsel Bozukluktaki Fenotipler

Otizm içerisindeki klinik ve genetik heterojenitenin sıralanması girişiminde, araştırmacılar fenotipik özelliklerin (endofenotip veya biyobelirteçler) tanımlanmasına gidişat ve direkt tedavi seçeneklerini öngörebilmesi açısından önem vermektedir. "*Endofenotip*" ve "*biyobelirteç*" terimleri nörofizyolojik, biyokimyasal, endokrinolojik, nöroanatomik ve bilişsel özelliklerin daha çok biyolojik kökenli olduğunu ve böylelikle davranışsal belirtilerden ziyade etiyolojik süreçler ile daha fazla ilişkili olduğunu belirtmektedir (51).

ZB skorları uzun soluklu çalışmalarda uzun dönem sonuçlarını güçlü bir şekilde öngörmektedir ve küçük çocuklarda bile otistik psikopatoloji derecesi ile direkt ilişkilidir (10, 70-73). Geçmişte otistik çocukların %50-70'i sözel olmayan ZB testi ile entelektüel açıdan yetersiz olarak sınıflandırılmıştır (2). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nde (CDC) yapılan epidemiyolojik bir çalışma YGB popülasyonunun %44.6'sının entelektüel açıdan yetersiz olduğunu bildirmiştir. Yakın zamandaki çalışmalarda daha düşük oranlar bildirilmiş ve bu durum AS ve daha hafif belirtileri olan çocukları dahil etmek amacıyla YGB tanı kriterinin genişletilmesinin muhtemel sonucu olarak yorumlanmıştır (44).

Nöbetler otistik çocukların yaklaşık %25'inde gözlenmektedir. Ek olarak, elektroensefalografik (EEG) anomali sıklığı nöbet öyküsü olmayan otistik çocuklarda artmıştır (3). Genel popülasyonda, nöbetler tek başına gidişata dair duyarlı bir gösterge değildir. Bununla birlikte, nöbetlerin sıklığı orta-ciddi entelektüel yetersizliği ve motor kusurları olan bireyler arasında daha yüksektir (56). Otizme ek olarak nöbetleri olan bireyler nöbetleri olmayan bireylere göre daha düşük ZB ortalamasına, daha kötü adaptasyon, davranışsal ve sosyal sonuçlara sahiptir (57).

Yapısal beyin malformasyonları, tipik olarak MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme) ile tanımlanmaktadır, sıklıkla da daha kötü gidişata işaret etmektedir (58). Nöroradyologlar nedeni bilinmeyen OB ile birlikte komplike olmayan nöbet, ciddi entelektüel yetersizlik, majör anomaliler veya fokal nörolojik bulguları olan 77 çocuğu değerlendirdiklerinde, %40'ında en sık beyaz cevher sinyal anomalileri, ciddi dilate Virchow-Robin boşlukları ve yapısal temporal lob anomalileri gibi bazı

problemlere sahip olduğunu rapor etmiştir (59). Nonsendromik otizmlili çocuklardaki bu denli ağır patolojiler otizmde standart tanı testi olarak beyin MRG kullanımını desteklemektedir.

Belirgin dismorfoloji, erken gelişmenin bozulmuş olduğunu gösteren güvenilir bir belirteç olarak otizmlili olguların %15-20'sinde bulunmuştur (58). Genel dismorfolojiyi tanımlayan sınıflandırma sistemi kullanılarak bireylerin %81'inde tespit edilen dismorfolojik bulgular kötü prognozün göstergesi olarak değerlendirilmiştir (sözel olmayan ZB<55). Belirgin dismorfoloji varlığı erken davranışsal tedaviye kötü yanıtın en iyi göstergesidir (60). Klinisyenlere 12 başlık altında rehberlik eden Otizm Dismorfoloji Ölçümü (ODÖ), genetikçi olmayanlara genel dismorfoloji değerlendirmesi için standart bir yöntem sağlamak için geliştirilmiştir (61). Değerlendirilen 12 başlık: boy; saç büyüme şekli; kulak yapısı, boyutu ve yerleşimi; burun büyüklüğü; yüz boyutu ve yapısı; filtrum; ağız ve dudaklar; dişler; el boyutu; parmaklar ve baş parmak; tırnaklar ve ayaklardır.

Mikrosefali (baş çevresi <2. persantil) otizmlili çocukların %5-15'inde görülmektedir ve kötü prognozün kuvvetli belirteçlerindedir (4, 62, 63). Makrosefali (baş çevresi >97. persantil) otizmlili çocukların yaklaşık olarak %30'unda görülmektedir ve gidişat veya ZB ile ilişki bulunmamasına rağmen (63) Lainhart ve ark. (64) ilk kelimelerin ortaya çıkmasında bir gecikme ile ilişki olduğunu belirtmiştir. Dismorfoloji ve mikrosefali kullanılarak otizm karmaşık veya esansiyel olarak tanımlanabilir (4).

Karmaşık otizm dismorfik bulgular ve/veya mikrosefalinin varlığı ile tanımlanmıştır. Çocukların yaklaşık %20-30'u karmaşık otizm tanısı almaktadır. Karmaşık otizm kötü prognoz, daha düşük erkek/dişi oranı ve esansiyel otizme göre kardeşlerde daha düşük tekrarlama riski ile ilişkilidir. Günümüzdeki mevcut tanı testleri kullanılarak karmaşık otizmlili çocukların yaklaşık %30'una otizm ilişkili bir sendrom veya kromozom bozukluğu tanısı konmaktadır (61).

Esansiyel otizm dismorfik bulgular ve mikrosefalinin yokluğu ile tanımlanmaktadır. Otizmlili çocukların yaklaşık olarak %70-80'i esansiyel otizme sahiptir. Esansiyel otizmlili çocuklar genellikle erkektir, kardeşlerde tekrarlama riski yüksektir, aile hikayesinde otizm veya alkolizm, depresyon gibi otizm ilişkili hastalıklara karmaşık otizmlili çocuklardan daha sık rastlanır. Esansiyel otizmi olan

çoğu çocuk kötü gidişata sahip olsa da, esansiyel otizmde gidişat grup olarak karmaşık otizmden daha iyidir. Mevcut testler net bir etiyolojik tanının ortaya konmasında esansiyel otizmde kompleks otizme göre daha fazla zorlanmaktadır.

## 2.5. Yaygın Gelişimsel Bozukluk Tanısı

DSM-IV dünyanın bir çok ülkesinde ve ülkemizde de otizm için kullanılan birincil tanı rehberidir. 2000 yılında yapılan güncelleme ile bazı bölümleri değiştirildi fakat tanı kriterleri değişmedi (6). 1994'te yayınlanan DSM-IV; OB, AS, Rett Sendromu, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu ve YGB-BTA tanılarına YGB şemsiyesi altında yer vermiştir. *MECP2* mutasyonlarının Rett Sendromu'na neden olduğu keşfedildikten sonra, çocukluk çağı dezintegratif bozukluğu nozolojisi ile ilgili belirsizlik ve otizm tanısının daha iyi anlaşılabilmesi için YGB terimi OB, AS ve YGB-BTA için şemsiye terim olarak benimsenmiştir. DSM - V'in tahminen Mayıs 2013'te yayımlanması ile nozolojinin biraz daha basitleşmesi beklenmektedir (7).

OB ile ilgili DSM-IV Tanı Kriterleri Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.1. Otistik Bozukluk— DSM-IV Tanı Kriteri (tanı kodu 299.00)

I. A, B ve C grubundan A'dan en az iki, B ve C'nin her birinden bir tane olmak üzere toplamda altı (veya daha fazla) madde:	
A.	Aşağıda belirtilenlerden en az ikisinin olduğu sosyal etkileşimde niteliksel bozulma:
B.	Aşağıda belirtilenlerden en az birisinin olduğu iletişimde niteliksel bozulma:
	1. Göz-göze bakış, yüz ifadesi ve sosyal etkileşimi düzenleme için kullanılan vücut postürü gibi çoklu sözsüz davranışlarda belirgin bozulma
	2. Gelişim seviyesine uygun akran ilişkisi geliştirmede yetersizlik
	3. Haz, ilgi paylaşımı veya diğer insanlar ile bir arada yapılan işlerde (örn, göstermede, getirmede veya ilgi duyulan nesnelere göstermede eksiklik) spontan aramanın yokluğu



Tablo 2.1. Otistik Bozukluk— DSM-IV Tanı Kriteri (tanı kodu 299.00) (Devam)

	4.	Sosyal veya duygusal karşılık eksikliği
	5.	Konuşma dilinin gelişim eksikliği veya tamamen yokluğu (duruş veya mimik gibi iletişimin alternatif kullanımlarının eşlik etmediği şekilde)
	6.	Uygun konuşması olan bireylerde, diğerleri ile karşılıklı konuşmanın başlatılması veya devam ettirilmesi yeteneğinde bozulma
	7.	Basmakalıp ve tekrarlayıcı veya kendine ait dil kullanımı
	8.	Gelişim basamağına uygun değişken, spontan yap-inan oyunları veya sosyal taklit oyunlarının eksikliği
	9.	Yoğunluk veya odaklanma açısından anormal olan bir veya daha fazla tekrarlayan ve sınırlı ilgi şeklinde devam eden olaylar ile kafasının meşgul olması
	10.	Özel fonksiyonu olmayan rutin veya ritüellere belirgin inatçı bir bağlanma
	11.	Basma kalıp ve tekrarlayan motor hareketler (örn, el/ayak çırpma veya döndürmek veya karmaşık vücut hareketleri)
	12.	Nesnelerin kısımları ile devamlı meşgul olma
C.	Aşağıda belirtilenlerden en az birisinin olduğu kısıtlı tekrarlayan ve basma kalıp davranış, ilgi ve aktivite modelleri:	
II. İlk üç yaşa kadar olan dönemde 1) sosyal etkileşim, 2) sosyal iletişimde kullanılan dil veya 3) sembolik veya hayali oyun gibi durumların en az birisinde gecikme veya anormal fonksiyon		
III. Rett Sendromu veya çocukluk çağı dezintergratif bozukluğundan daha iyi bir şekilde açıklanamaması.		

AS otizm için olan diğer DSM-IV tanı kriterlerini karşılması fakat göreceli normal dil gelişimi (zaman, gramer ve kelime bilgisi dahil) ile karakterizedir (65). AS'li bireyler genellikle yalnız, grup içinde olmaktan rahatsız, diğerleri ile empati kuramayan, konuşmayan, deyim veya esprileri anlamayacak şekilde edebi konuşma

üslubu takınan, rutinde aynı kalan, sıkı kurallar takip eden ve bilgisayar veya hava gibi kafasını kurcalayan bir ilgi alanına sahiptir. Konuşma ukala veya garip tonlamaları olan tekrarlayıcı biçimde olabilir. Tanı için ZB normal aralıkta olmalıdır. Sakarlık yaygındır. AS'nin otizm spektrumunun bir ucunda mı yoksa ayrı genetik bir antite mi olduğu açık değildir.

AS tanısı çeşitli tanı araçları arasında zayıf uyumluluk olması nedeniyle problemlidir (66). Otizm Spektrum Tarama Anketi (ASSQ) (67), AS Tanı Görüşmesi (ASDI) (68), AS için Avustralya Ölçeği (69) ve Çocukluk Çağı AS Testi (CAST) (70) mevcut tanı araçlarıdır. Yakın zamanda yayınlanan, "Asperger Tanı Değerlendirmesi" olarak anılan bir video (71) klinisyenler için uygulamalı bilgiler sunmaktadır.

YGB-BTA, otistik belirtiler gösterip üç ana tanı kriteri başlığına da tam olarak uymayanlar için kullanılan bir sınıflamadır. Bazen YGB-BTA küçük çocuklarda tanı değerlendirmeleri tanımlanmadan önce başlangıç veya değiştirilebilir tanı olarak kullanılabilir.

"Geniş otizm fenotipi" bazı otizm belirtileri gösteren kardeşleri veya diğer aile bireylerini tanımlayabilir (72). Bu terminoloji aday genlerde mutasyona sahip olan kardeşleri sınıflandırmak ve otizm spektrum bozukluğunun geniş fenotipi ile ilgili artan farkındalığı yansıtmak amacıyla araştırmacılar tarafından kazandırılmıştır.

Çocukluk Çağı dezintegratif bozukluğu normal gelişen çocuğun gelişiminin en az iki yıl bozulduğu ve önceden kazandığı dil, sosyal ve oyun becerilerini kaybettiği, 10 yaşından önce ortaya çıkan nadir bir durumdur. Bu durum klinik olarak otizmi andırabilir ancak başlangıç, gidişat ve sonuç olarak otizmden ayrılmaktadır. Yaygın gelişimsel bozukluklardan biri olarak kabul edilmektedir.

### **2.5.1. Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Tanı ve Tarama Araçları**

Otizm tanısı koymak için DSM-IV veya çeşitli kontrol listeleri (73) kullanılarak otizm belirtileri ve ortaya çıkış yaşı tespit edilmelidir:

ÇODÖ (Çocukluk Çağı Otizmi Değerlendirme Ölçeği) (74) ebeveyn ve testi uygulayan tarafından skorlanan, 15 soru içeren, en çok kullanılan tanı kontrol listesidir. Güvenilir, doğrulanmış, görece hızlı ve uygulaması kolay bir ölçüttür. 30-35 arası skor hafif otizm, 36 ve yukarısı orta-ciddi otizm demektir. Diğer kullanılan

testler arasında ODKL (Otizm Davranış Kontrol Listesi) (75) ve GARS (Gilliam Otizm Skorlama Ölçeği) (76) yer almaktadır.

Uygulamada detaylı ebeveyn görüşmesi ve ADI-R (Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş) (78) kullanılmaktadır. ADI-R, ADOS'tan (Otizm Tanı Gözlem Programı) (77) daha kısa olup, DSM-IV kriterlerini içerir ve otizmin homojen olarak tanımlanmasına olanak vermektedir. ADOS araştırma haricinde de yaygın biçimde kullanılmaya başlamasına rağmen, zaman ve uygulama masrafı açısından klinik pratikte yaygın biçimde kullanılmamaktadır.

M-CHAT (Değiştirilmiş-Erken Çocukluk Dönemi Otizm Kontrol Listesi) en sık kullanılan tarama aracıdır (79). 23 maddelik olan bu kontrol listesi 18 aylık kontrollere gelen çocuklardaki riski tanımlamak için birincil sağlık hizmeti verenlere yönelik hazırlanmıştır. Yakın zamanlı bir çalışma (80) muhtemel YGB olgularını yakalamadaki geçerliliğini 16-30 ay yaşlarında olan düşük ve yüksek risk gruplarında teyit etmiştir (73).

## **2.6. Otizmin Genetik Nedenleri**

İkiz ve aile çalışmaları otizmin genetik temelini ortaya koymuştur ve otizmin kalıtılabilirliğinin %90'ın üzerinde olduğunu belirtmiştir (11). Hali hazırda otizimli çocukların %20-25'inde genetik neden belirlenebilmektedir. Otizm vakalarının küçük bir kısmında özel teratojenik maruziyet neden olarak suçlanabilir. Geriye kalan %75-80'lik kısmında ise neden bilinmemektedir.

Otizmin bilinen genetik nedenleri arasında (1) Sitogenetik olarak gözlenebilen kromozom anomalileri (~%5), (2) KSD'ler (örn, submikroskobik delesyonlar ve duplikasyonlar) (%10-20) ve (3) Nörolojik bulguları YGB ile ilişkili olan tek gen hastalıkları (~%5) yer almaktadır.

### **2.6.1. Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler**

Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi kromozom anöploidilerini YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde ortaya çıkarmaktadır. Ek bir %3-5'lik kısım ise FISH teknikleri kullanılarak tanımlanabilen kromozom anomalilerine sahiptir. Otizm ve eşlik eden dismorfolojisi olan çocuklarda çoğunlukla dengesiz kromozom anomalileri bulunmaktadır (4, 12). Otizmde hemen hemen her kromozomda

kromozom anomalisi bulunmasına rağmen, sadece bir kaçının otizm genleri için muhtemel lokuslara sahip olduğu düşünülmektedir (13, 14).

Anne kaynaklı Prader Willi/Angelman Sendromu kritik bölgesinin (15q11-q13) duplikasyonu otizmde %1-3 oranı ile en sık rastlanan kromozom anomalisidir. Bu durum çoğunlukla *de novo* fazladan izodisentrik 15q kromozomu ve daha az sıklıkla da paternal kromozom translokasyonun ayrılması veya maternal interstisyel 15q duplikasyonu sonucudur. Rutin sitogenetik analizleri fazla olan izodisentrik 15q 'yu tespit edebilir fakat interstisyel duplikasyonların tanısı interfaz FISH veya aCGH yöntemi gerektirmektedir. Anne kaynaklı 15q11-q13 interstisyel duplikasyonu otizmin yüksek oranda kalıtılabilir bir nedeni iken, baba kaynaklı duplikasyon bu bölgenin genomik damgalanmasının önemine işaret eder şekilde çok az fenotipik etkiye sahiptir. Bu bölgenin trizomisi ile sonuçlanan maternal 15q duplikasyonu fiziksel fenotipte göze çarpmayan değişikliklere neden olurken, fazladan izodisentrik 15'i olan yani 15q bölgesinin dört kopyasına sahip olan çocuklar tipik olarak daha fazla etkilenmiştir ve hipotoni, nöbetler, mikrosefali ve ciddi gelişim geriliği gösterebilir (81).

Down sendromlu çocuklar beklendiğinden daha sık otizme sahiptir. Bir çalışmada insidans en az %7 bulunmuştur (82).

Turner sendromlu maternal X kromozomuna sahip ( $45,X^{mat}$ ) bireylerin paternal X kromozomuna sahip ( $45,X^{pat}$ ) olan bireylerden daha kötü sosyal bilişsel yeteneklere sahip olduğu bildirilmiştir (83).

Bir defadan fazla bildirilmiş kromozom anomalileri 2q37, 18q, 22q13.3, Xp22.3 delesyonları ve 47,YYY, 47,XXY, 45,X gibi cinsiyet kromozomu anöploidileridir (14, 16, 84-86). 2q37 ve 22q13.3 ile ilgili bütün bildirilen terminal delesyonlar dismorfik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (87). Nedeni bilinmeyen otizimli bireylerdeki 22q13.3 ve Xp22.3 delesyonları için minimal kritik kromozom bölgelerin tanımlanması sırasıyla *SHANK3* (88) ve *NLGN4* (89) mutasyonlarının tanımlanmasına sebep oldu.

### 2.6.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD'ler)

aCGH otizimli çocukların değerlendirilmesinde giderek yüksek çözünürlüklü kromozom analizi ve FISH yönteminin yerini almaktadır. aCGH'de kullanılan ve klinik olarak mevcut olan platformlar bilinen delesyon/duplikasyon sendromlarının

bütün genomda ve ek olarak subtelomerik bölgelerin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. aCGH'de kullanılan platformlar yoğunluk ve moleküler belirteçlerin çeşidi [BAC (Bakteriyel Yapay Kromozom), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve oligonükleotid klonlar] açısından değişkenlik gösterebilir ve yeni KSD bölgeleri tanımlandıkça güncellenmektedir.

Jacquemont ve ark. (12) 1-Mb genom bütünlüğünde array kullanarak, rutin sitogenetik çalışmalar ile normal karyotipe sahip olup dismorfolojisi olan otistik olgularda %27.5 (8/29) oranında klinik olarak anlamlı KSD'ler tanımladı.

Sebat ve ark. (15) oligonükleotid array kullanarak basit ailelerin (tek etkilenmişli aile) çocuklarının %10'unda ve multipleks ailelerin (birden fazla etkilenmişli aile) %2'sinde, kontrollerin %1'inde bulunana kıyasla *de novo* kopya sayısı değişiklikleri buldu.

Marshall ve ark. (16) yoğun genom bütünlüğünde SNP arrayi kullanarak, otizmi olan 427 ilişkisiz ailede %44 oranında kontrol ailelerinde bulunmayan dengesiz KSD'ler buldu. Nedeni bilinmeyen otizmlı kişilerdeki bu KSD'lerin çoğu kalıtılmış sadece %7'si *de novo* idi.

YGB'li 859 birey ve 1,409 sağlıklı Avrupa kökenli çocuktan 550,000 SNP kullanılarak yapılan çalışma nöronal adezyon moleküllerini kodlayan (*NRXN1*, *CNTN4*, *NLGN1* ve *ASTN2*) ve ubiquitin yolağında yer alan (*UBE3A*, *PARK2*, *RFWD2* ve *FBXO40*) genlerde çeşitli patolojik değişiklikler ortaya çıkardı (90).

Otizm ile ilişkisi sıklıkla saptanan bazı KSD'ler aşağıda sunulmuştur.

16p11.2 delesyon sendromu gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik ve/veya YGB ile karakterizedir. Gelişme geriliği motor yetersizlikten ziyade dil bozukluğu ve bilişsel fonksiyon ile ilişkilidir. ZB skorları hafif entelektüel yetersizlikten normale kadar değişebilmesine rağmen, ortalama ZB skoruna sahip olanlar konuşma gecikmesi veya YGB gibi diğer gelişimsel problemlere sahiptir. İfadesel dil, algısal dilden daha fazla etkilenmiş gözükmektedir. Marshall ve ark. (16) %1 ile benzer bir oran gözlemlemiştir. 16p11.2 delesyonu sıklıkla *de novo* olarak ortaya çıkmaktadır fakat ebeveynlerden çocuğa otozomal dominant olarak da geçebilir. Bununla birlikte 16p11.2 ile ilgili KSD'ler etkilenmemiş aile bireyleri de dahil şizofreni, bipolar hastalık, nöbetler, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve disleksi gibi

diğer hastalıklarda da gözlenebilir; bu nedenle bu KSD'lerin önemini/anlamını değerlendirmek zor olabilir (91).

15q13.3 delesyon sendromu entelektüel yetersizlik ve epilepsi (92) ve YGB ile (93) ilişkilendirilmiştir ve klinik olarak değişken olduğu görülmektedir. *CHRNA7*'nin haployetersizliğinin 15q13.3 mikrodelsyon sendromunun nörogelişimsel fenotipinin nedeni olduğu düşünülmektedir (94).

### 2.6.3. Tek Gen Hastalıkları

Aşağıda bahsedilen tek gen hastalıklarının sıklıkla sendromik otizme neden olduğu gözlenmiştir.

*Frajil X Sendromu.* Otizm tanısı temelinde değerlendirilen olguların %1-3'ü frajil X sendromuna sahiptir, en azından frajil X sendromlu çocukların yarısı göz temasından kaçınma, konuşma gecikmesi, tekrarlayıcı davranışlar, uyku bozuklukları, öfke nöbetleri, kendine zarar verme, hiperaktivite, düşünmeden hareket etme, dikkatsizlik ve sese duyarlılık gibi bazı otistik davranışlara sahiptir. Frajil X sendromu *FMRI* genindeki CGG trinükleotid tekrarlarının tam mutasyon boyutu olan 200 veya daha fazla sayıya genişlemesi nedeniyle oluşmaktadır. Otizm için değerlendirilen çocukların dikkate değer bir kısmında *FMRI* premutasyonları (55-200 CGG tekrarı) bulundu (95). Bu durum YGB için değerlendirilen bütün çocukların *FMRI* moleküler genetik test yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

*PTEN makrosefali sendromu.* *PTEN* (Fosfataz ve Tensin Homoloğu) geni ilk olarak Cowden Sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromu, Proteus Sendromu ve Lhermitte-Duclos hastalığını içeren, *PTEN* hamartoma tümör sendromu olarak bilinen geniş hastalık grubu ile ilişkilendirilmiş bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlandı. Yakın zamanda *PTEN* geni mutasyonları otizm ve makrosefali ile ilişkilendirildi (96, 97). Paralel olarak *PTEN* geninin nöronal sağkalım ve sinaptik plastisite dahil beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığı fark edildi. YGB'nin nedeni olan *PTEN* mutasyonlarının sıklığı net değildir; otizm ve makrosefali olarak değerlendirilen çocukların dahil edildiği çalışmalarda sıklık %1'den (97) %8.3'e, (98) %17'ye (96) ulaşmaktadır. Hem *de novo* hem de ailesel *PTEN* mutasyonları tanımlanmıştır. YGB'li çocuklardan *PTEN* mutasyonu olanlar genellikle +3.7 SD'den +9.6 SD'ye değişen aralıkta (ortalama: +5.4 SD) aşırı makrosefaliye sahiptir (97).

*Sotos Sendromu.* Sotos Sendromu tipik yüz görünümü, aşırı büyüme (boy ve baş çevresi  $\geq 2$  SD ortalamasının üstünde) ve hafiften (çocuklar örgün öğretime katılabilir ve bağımsız erişkinler olabilir) ciddiye (yaşam boyu bakım ve destek gereken) değişebilen öğrenme güçlüğü gibi ana özellikleri ile karakterizedir. Sotos sendromu davranışsal problemler, konjenital kalp anomalileri, yenidoğan sarılığı, renal anomaliler, skolyoz ve nöbetler gibi majör özellikler ile ilişkilidir. Sotos sendromu klasik otizmin önemli bir nedeni olmamasına rağmen (99), Sotos sendromlu çocuklar akran grup ilişkilerinde zorluk ve sosyal ipuçlarını anlamada eksiklik gibi davranışsal problemler nedeniyle otizm kliniklerine yönlendirilebilir. Sotoslu olguların %80-90'ında *NSD1*'in mutasyonu veya delesyonu gösterilebilir; kalıtım otozomal dominanttır.

*Rett Sendromu.* Orjinal DSM-IV'te tanımlanan yaygın gelişimsel bozukluklardan ve spesifik genetik etyolojisi tanımlanan tek hastalıktır. Klasik Rett Sendromu olan bireylerin %96'sı X kromozomunda lokalize *MECP2* geninde mutasyona sahiptir. *MECP2* mutasyonu tespit edilmiş Rett Sendromu fenotipi, nedeni bilinmeyen otizm ile oldukça örtüşmektedir; her ikisi de olan çocuklar sıklıkla normal gelişim gösterdikleri bir dönemden sonra tekrar eden el hareketleri ile birlikte konuşma kaybı yaşarlar. Bununla birlikte Rett Sendromu baş çevresi büyüme hızının azalması, ilerleyici duruş bozukluğu ve erken çocuklukta el ovuşturma hareketi ile klinik olarak ayırt edilebilir. Rett sendromu veritabanları ile yapılan iki çalışma *MECP2* mutasyonlu Rett Sendromu olan kızların %17.6'sına (55/313) erken otizm tanısı konulduğunu gösterdi (100). Young ve ark. (100) otizm tanısı almış bütün kızların Rett Sendromu belirtileri (baş büyümesi hızındaki düşüş de dahil) açısından dikkatlice izlenmesini tavsiye etmektedir. *MECP2* mutasyonları otizmle tanımlanan çocukların yaklaşık %1'inde bildirilmiştir (101).

*Tüberoz Sklerozis Kompleksi (TSK).* Entelektüel yetersizliği olan TSK'li bireylerin %25-50'si otizm tanı kriterini tam olarak karşılmasına rağmen, TSK'lilerin sadece %1.1-1.3'üne ilk tanı olarak YGB denmektedir (102). Erken başlangıçlı infantil spazmlar ve MRG'deki temporal tüberler *TSC2* mutasyonu olan çocuklarda otizm gelişme olasılığını artırmaktadır (103). Deri lezyonları (hipopigmente maküller, köpekbalığı derisi lekeleri, adenoma sebaceum) ve otozomal dominant kalıtım ile uyumlu TSK'yi düşündüren bulguları (nöbetler, deri

lezyonları, entellektüel yetersizlik) olan aile hikayesi gibi belirti ve durumların değerlendirilmesi genellikle otizmlili çocuklarda TSK tanısının konulmasında veya dışlanmasında yeterli olacaktır. *TSC1* ve *TSC2* genleri için moleküler genetik testler mevcuttur. TSK ile ilişkili otizmde ailelerdeki tekrarlama riski nedeni bilinmeyen otizmi olan ailelerdekinden daha yüksektir. TSK'deki otizm mekanizması bilinmemektedir.

*Nörofibromatozis tip 1 (NF1)*. NF1 otizmlili çocuklarda tanı almasına rağmen, bunun gerçek bir ilişki mi yoksa gerçekten çocukluk çağının iki sık hastalığının aynı anda bir arada oluşu mu bilinmemektedir (102, 104).

*Timothy Sendromu*. Timothy sendromu, *CACNA1C* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan kalsiyum kanal hastalığıdır, ciddi QT uzaması, sindaktili, kardiyak defektler, dismorfik yüz, gelişme geriliği ve otistik belirtiler ile karakterize otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır (105).

*Joubert Sendromu*. Otozomal resesif olan bu hastalık MRG'de "azı dışı görünümü" şeklinde görünen kısmi/tam serebellar vermis yokluğu, anormal nefes alıp verme, anormal göz hareketleri, bilişsel bozulma ve davranış problemleri ile karakterizedir. Joubert sendromunun bir kısmı 'jouberin' proteinini kodlayan *AHI* geni ile ilişkilidir (106). Bir çalışmada Joubert sendromlu 11 çocuktan üç tanesi otizm ve bir tanesi YGB-BTA tanı kriterine uydu (107).

Otizm veya otistik özellikler diğer tek gen hastalıkları olan çocuklarda tanımlanmıştır. Çoğu ciddi entelektüel yetersizlik ve anlamlı dismorfolojik bulgular ile ilişkilidir: *Cohen Sendromu* (108), *Cole Hughes makrosefali sendromu* (109) *San Filippo Sendromu*, *Cornelia De Lange Sendromu*, *Angelman Sendromu* (110), *Williams Sendromu* (111) ve tersi *7q11.23 mikroduplikasyon sendromu* (112) *17p11.2p11.2 duplikasyon sendromu* (113, 114) *22q11 delesyon sendromu* (115), *WAGR (Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon) sendromu* (116) *Duchenne Müsküler Distrofisi* (117).

#### 2.6.4. Metabolik Durumlar

*Mitokondriyal Hastalıklar*. Mitokondriyal solunum zincir bozuklukları otizmlili olgularda çok nadir bildirilmesine rağmen, artmış plazma laktat konsantrasyonları sıklıkla rapor edilmiştir (118). 69 otizmlili çocuğun dahil olduğu bir çalışma artmış plazma laktat konsantrasyonlarını %20 (14/69) oranında bildirmiştir;



onbir çocuktan beşine kas biyopsisi yapılmış enzimatik kompleks aktivitesinin normalin %20'sinin altına düşecek biçimde bir veya daha fazla solunum zincir kompleksi sıklıkla da kompleks I, IV ve V eksikliği tespit edilmiştir (119). Eğer teyit edilirse bu grup otizmin en geniş alt grubu olmaya adaydır. Hipotoni, gelişim geriliği ve aralıklı regresyon epizotları gibi atipik özellikleri olan otistik çocuklarda mitokondriyal bir bozukluğu tanımlamak olmayanlara göre daha muhtemeldir.

*Fenilketonüri (FKÜ).* Tedavi edilmemiş FKÜ ve YGB komorbiditesi tanımlanmıştır fakat bu çocuklarda bulunan ciddi entelektüel yetersizlik nedeniyle otizm tanısı genellikle komplikedir. Sistematik bir çalışma tanı ve erken tedavi almış FKÜ'lü 62 kişinin hiç birinin otizm tanı kriterine uymadığını gösterirken, FKÜ'lü 35 tanesinden ikisinin (%5.7) daha sonradan YGB tanı kriterine tam olarak uyduğu bildirilmiştir (120).

*Adenilosüksinat Liyaz Eksikliği.* Bu antite *de novo* pürin sentezinin nadir otozomal bozukluğudur ve vücut sıvılarında süksinilpürinlerin birikimi ile sonuçlanır. Etkilenmiş bireylerin yaklaşık yarısı gelişim geriliği, nöbetler ve göz teması kurmakta başarısızlık, tekrarlayan davranış, tahrik, öfke nöbetleri ve saldırganlık dahil otizm bulgularını içermektedir (121). Bir çalışmada YGB'li 420 çocuktan birinde adenilosüksinat liyaz eksikliği bulunmuştur (122).

*Kreatin Eksikliği Sendromları (KES).* Doğuştan kreatin metabolizma bozuklukları olan KES'ler iki kreatin biyosentez bozukluğunu, guanidinoasetatmetiltransferaz (GAMT) eksikliği ve L-arjinin:glisin amidinotransferaz (AGAT) eksikliği (veya GTAM eksikliği) ve kreatin taşıma defekti, SLC6A8 eksikliğini içerir. Entelektüel yetersizlik ve nöbetler bütün üç KES'de de ortaktır. GAMT eksikliği olan bireylerin yaklaşık %80'i otistik davranış ve kendine zarar verme dahil davranış bozukluğuna sahiptir; yaklaşık %45'i piramidal/ekstrapiramidal bulgulara sahiptir. AGAT eksikliği olan sadece beş birey tanımlanmıştır. SLC6A8 eksikliği fenotipi etkilenmiş erkeklerde hafif entelektüel yetersizlik ve konuşma gecikmesinden ciddi entelektüel yetersizlik, nöbetler ve davranış bozukluklarına kadar değişmektedir. SLC6A8 eksikliği açısından heterozigot olan dişilerin yaklaşık %50'si öğrenme ve davranış problemlerine sahiptir. YGB'li olgularda kreatin eksikliği sendromlarının prevalansının düşük

olduğu gözlenmektedir. YGB'li 100 erkekte *SLC6A8* geni dizilenmesi, hastalık oluşturuca herhangi bir mutasyon tespit edememiştir (123).

*Smith-Lemli-Opitz Sendromu (SLOS)*. Çoklu doğumsal anomali ve entelektüel yetersizlik sendromu olan bu otozomal resesif hastalık kolesterol biyosentezinde esansiyel bir enzim olan 7-dehidrokolesterol redüktaz eksikliği nedeniyle oluşmaktadır. SLOS tekrarlayıcı ve kendine zarar verici davranışlar gibi otistik bulgular, duyuşal hiperaktivite, sıcaklık disregölasyonu ve uyku bozukluğu gibi diğer davranışsal özellikler ile ilişkilidir. SLOS'lu bireylerdeki otistik davranış sıklığı %50'den %80'e kadar değişmektedir (124).

## 2.7. Otizmin Diğer Nedenleri

*Moebius sendromu veya sekansı*. Altıncı ve yedinci kafa sinirlerinin tek taraflı veya çift taraflı felci ile tarif edilen Moebius sendromu gülümsemeyi ve gözleri tamamen kapatmayı önleyen yüz felci ile karakterizedir. Sıklıkla göz yaşı ile ilgili anormal durumlar, nöbetler, işitme kaybı ve ekstremitte anomalileri ile ilişkilidir. Moebius sendromlu çocukların yaklaşık %30'unda YGB gelişmektedir (125). Johansson ve ark. (125), entelektüel yetersizliği olan Moebius sendromu olgularında YGB'nin daha sık gözlendiği bulgusunu teyit etmiştir.

*Landau-Kleffner sendromu (LKS)*. YGB'li ve geç regresyonlu olan çocukların küçük bir grubunda LKS vardır. Bu çocuklar nöbetler (epileptik afazi) ve/veya derin uykuda ciddi EEG anomalileri ile ilişkili ani veya kademeli olarak izole dil regresyonları gösterirler (126). Genel olarak hem nöbetler hem de dil bozulması EEG anomalilerinin düzelmesi ile iyileşmektedir (3).

*Çevresel Nedenler*. Son 20 yılda önemli derecede artan otizm prevelansı ve monozygotik ikizlerde otizm için tam olmayan konkordans nedeniyle otizmin çevresel nedenleri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir:

*In utero maruziyetlerden*, valproik asit, talidomid ve misoprostol gibi ilaçların otizmin nedeni olduğu anlaşıldı. Gebelik süresince antiepileptik ilaçlara (AEİ) maruz kalan 632 çocuğun katıldığı uzun dönemli bir çalışmada, in utero valproata maruz kalan çocukların AEİ'lere maruz kalmayanlardan yedi kat daha fazla otizm geliştirme riski olduğu bulundu (127).

*Diğer faktörler.* Yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) yaygın kullanımı (128) ve terbutalin gibi tokolitik ajanlar (129) otizm nedenleri arasında değerlendirilmektedir.

*Çocukluk çağı aşuları* regresif-başlangıçlı otizmin farkına varıldığı dönemlerde uygulanmasından dolayı ilgi odağı olmuştur. Yaklaşık %50 koruyucu thimerosal içeren organik civanın kullanıldığı bazı aşular ve hiç civa içermeyen kızamık-kabakulak-kızamıkçık (MMR) gibi aşular çalışıldı. Ebeveyn görüşleri önemli olmasına rağmen çoklu çalışmalar ve bilimsel kanıtlar aşılama ve otizm arasında herhangi bir ilişkiyi desteklemedi (130).

## **2.8. Array Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH)**

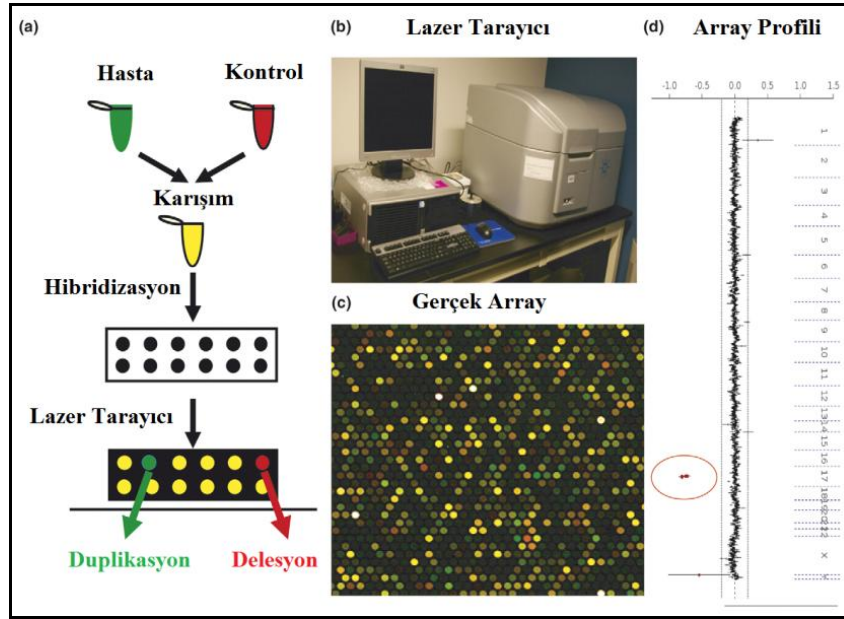
Moleküler karyotipleme olarak da adlandırılan aCGH, segmental genomik KSD'lerin yüksek çözünürlükte tüm genomda taranabilmesi için geliştirilmiştir (131). Yüzlerce farklı genomik lokusun DNA kopya sayısı kazanımları ve kayıpları için karşılaştırmalı sorgulanmasına imkan tanıyan bir yöntemdir. aCGH ile ilgili son bir kaç yıldaki gelişim ve klinik uygulamalar hastalara tanı konulmasında devrim yaratmış ve bir çok genetik hastalığın moleküler temelini tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Kanserdeki genomik dengesizlikler için araştırma amaçlı geliştirildiği günden bu yana aCGH gerekli ve rutin bir tanı aracı haline dönüşmüş ve giderek sitogenetik metodların yerini almaktadır (132).

Kromozomal anöploidiler (fazla veya eksik kromozomlar) ve yapısal aberasyonlar (delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar) konjenital anomaliler, dismorfizm, global gelişim geriliği, otizm, düşükler ve çeşitli diğer genetik sendromların altında yatan nedenlerindedir. Giemsa boyalı metafaz kromozomlarının sitogenetik analizi bu anomalileri ortaya çıkarmak için rutin olarak uygulanmaktadır. Bu teknik dengeli ve dengesiz yapısal ve sayısal kromozom anomalilerini tanımlamaktadır. Bununla birlikte, rutin karyotip analizi küçük (< 5Mb) kromozom yeniden düzenlenmelerini tespit edebilmek için yeterince hassas değildir. FISH yönteminin geliştirilmesi tanısal çözünürlüğü artırmıştır. FISH analizinde, floresan ile işaretli DNA probları interfaz hücrelerine veya metafaz kromozomlarına hibridize olarak spesifik genomik segmentlerin varlığını, konumunu ve sayısını tespit etmektedir. Bununla birlikte FISH yöntemi beklenmedik genomik

dengesizlikler için genom bütününde bir tarama yapamamaktadır ve fenotipin klinisyen tarafından değerlendirilmesi temelinde bir sonuç verebilmektedir.

Metafaz CGH ilk olarak tümör sitogenetiğinde moleküler araç olarak geliştirildi (133). Bu teknikte, hastaya ve referansa ait bütün genomik DNA farklı şekilde etiketlenir ve cam lamlara yayılmış normal metafaz üzerinde bir arada hibridizasyona bırakılır. Dengesiz kromozom yeniden düzenlenmeleri farklı hibridizasyon sinyalleri ile 3-10 Mb çözünürlükte tespit edilebilmektedir (134). Metafaz CGH kullanışlı bir tanı aracı olmasına rağmen önceden tanı almamış gelişim geriliği ve konjenital anomalileri olan vakaların yaklaşık %10'una bir açıklama getirebilmektedir. Metafaz kromozomlarının düşük çözünürlüğü ve teknik güçlükler bu uygulamanın yaygın kullanımını sınırlandırmıştır (135). Metafaz kromozomlarının ayırık metal uçlar veya cam kapilerler kullanarak robot yardımı ile hareket etmeyecek şekilde cam lam üzerine yerleştirilmiş hedef DNA'lar ile değiştirilmesi, çözünürlüğü önemli derecede artırmış ve analiz sürecini kolaylaştırmıştır.

aCGH metodunda, eşit miktarda etiketli genomik DNA ve referans örneği DNA hedeflerini içeren array üzerine bir araya getirilerek hibridize edilir. Bazı laboratuvarlar toplanmış erkek ve dişi DNA'ları, bazıları da bireysel erkek ve dişi DNA'ları kontrol olarak kullanmaktadır. Hastalara ve kontrole ait genomik DNA'lar Cyanine 3 (Cy3) ve Cyanine 5 (Cy5) ile farklı farklı etiketlenmektedir. Tekrarlayan dizilerin hibridizasyonu cot-1 DNA eklenerek engellenebilir. Lamlar mikroarray tarayıcısı kullanılarak imaj dosyalarına çevrilir. Spot yoğunlukları ölçülür ve imaj dosyaları özellik çıkartma yazılımları kullanılarak logaritmik oranları metin dosyaları (.txt) şeklinde elde edilir ve kopya sayısı analizi için yazılımın içine aktarılır (136). İşlemlerin genel özeti Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. aCGH işlemlerinin genel özeti - Shinawi ve Cheung'tan (137) alınmıştır.

Floresan yoğunluk oranı, test ve referans genomlarında DNA dizilerinin kopya sayısı ile orantılıdır. Floresan boyaların yoğunlukları bir propta eşit ise, hasta genomunun söz konusu o bölgesi test ve referans örneklerinde eşit miktarda olduğu şeklinde yorumlanmaktadır; eğer değişmiş  $Cy3:Cy5$  oranı var ise bu hasta DNA'sında bir kayıp veya kazanç işaret etmektedir.

Hedef problemler BAC veya P1 (PAC) klonları (75-200 kb), daha küçük araya eklenen kosmidler (30-40 kb) ve fosmidler (40-50 kb) veya oligonükleotidler (25-85 mer) formundaki insan genomik DNA parçalarıdır.

Farklı aCGH platformlarının genomik çözünürlüğü DNA problemlerinin yerleşimi ve uzunluğu ile belirlenmektedir. Hali hazırda mevcut aCGH platformlarının çoğu anöploidileri, iyi tanımlanmış mikrodelsiyon veya mikrodüplikasyon sendromlarını ve subtelomerik veya diğer dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmeleri tespit edebilecek şekilde tasarlanmıştır.

Hedef problemlerin megabaz başına yaklaşık bir klon büyüklüğünden 100 kb başına bir klon büyüklüğüne olan, eşit aralıklarla yerleştirilen tüm genom aCGH platformları da vardır (138). Ticari olarak mevcut olan tüm genom oligonükleotid array kapasitesi 6 kb başına bir probdan 70 kb başına bir proba kadar değişmektedir (139). Bazı aCGH platformları, BAC veya hedeflenmiş rasgele genomik dizileri taklit etmek için tasarlanan oligonükleotidleri kapsamaktadır (140). Odaklanmış veya

tüm genom oligonükleotid array kullanımının avantajı ortalama BAC boyutundan daha küçük değişiklikleri değerlendirmesi, yüksek çözünürlük ve artmış dinamik aralığa (sinyal-gürültü oranı) sahip olmasıdır (139-141).

aCGH'nin sitogenetik metodlara en belirgin üstünlüğü yüksek çözünürlüğü, otomasyona imkan veren verimliliği, dayanıklılığı, basitliği, tekrarlanabilirliği ve aberasyonları etkin biçimde haritalamasıdır. Ek olarak hücre kültürüne ihtiyaç duymaması, sitogenetik metodlardan daha kısa sürede sonuca ulaştırmaktadır. Çoğu aCGH platformu sadece bir kaç mikrogram genomik DNA'ya ihtiyaç duymaktadır ve tüm genom amplifikasyon prosedürleri de analiz için gerekli miktarın artırılmasını mümkün kılmaktadır. Bazı durumlarda, aCGH ek ve klinik olarak beklenmedik genomik dengesizlikleri ortaya koymaktadır. Bu da tüm genom yaklaşımının sadece ilgili lokusa dair bilgi sağlayabilen, lokusa özel yöntemlere göre avantajını ortaya koymaktadır. Ek olarak, aCGH metafaz hatta interfaz FISH analizinde tespit edilemeyen genomik duplikasyonları yakalayabilir. aCGH'nin sitogenetik analiz ile gözden kaçırılacak mozaisizmi de tespit edebildiği kanıtlanmıştır (142).

aCGH translokasyon ve inversiyon gibi dengeli yeniden düzenlenmeleri tanımlayamaz. Bu teknoloji sadece aynı örnek içinde diğer DNA'lara görece kopya sayısı dengesizliklerini tespit edebilmektedir bu yüzden aCGH poliploidiyi tespit edememektedir. Önemi bilinmeyen genomik dengesizlikler çok yüksek çözünürlükte olan ve bütün genomu kapsayan platformlar ile tespit edilebilmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğine Aralık 2011-Nisan 2012 tarihlerinde başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan, dismorfik açıdan Tıbbi Genetik Polikliniği'nde değerlendirilen ve karyotip analizi yapılan 37 olgu dahil edilmiştir. Hastalardan alınan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüp içerisine alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Çalışmamız Mayıs 2012 - Temmuz 2012 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Otizm bulgusu gösteren, YGB tanısı alan olgular, periferik kan hücrelerinden elde edilen gDNA'larından, tüm genomdaki KSD'lerin incelenmesine imkan veren aCGH yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 09.12.2011 tarih ve 2011/57 sayılı onay alınmıştır.

#### 3.2. Gereçler

##### 3.2.1. Kullanılan Aletler

İnsan CGH Mikroarray Kiti 8x60K (Agilent G4450A SurePrint G3)

Mikroarray Tarayıcısı (Agilent p/n G2565CA)

Hibridizasyon Haznesi (leke tutmayan özellikte, Agilent p/n G2534A)

Hibridizasyon Haznesi Contalı Lamı (Agilent p/n G2534-60014)

Hibridizasyon Fırını (Agilent p/n G2545A)

Hybridization Fırını Rotatoru (Agilent p/n G2530-60029)

Ozon bariyer lam kapağı (Agilent p/n G2505-60550)

Manyetik Karıştırıcı Çubuk (Corning p/n 401435)

Isıtma Özellikli Manyetik Karıştırıcı Plaka (Corning p/n 6795-410)

Cam Tabak (1.5 L) (Borcam)

Lam Yıkama Plakaları (250 ml) (Wheaton p/n 900200)

Lam Tutucusu (Agilent G2505-60525)

Pipet Takımı (Gilson)

Jel Görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)  
 Mikrosantrifüj (Sigma)  
 Isı döngüleyicisi (PE GenAmp PCR System 9700)  
 Çeker Ocak (LaminAir)  
 Su Banyosu (Nüve)  
 Vorteks (Heidolph)  
 Beher (500'lük)  
 Derin dondurucu (Arçelik)  
 Mikrodalga Fırın (Arçelik)  
 Buzdolabı (Arçelik)  
 1.5 ml'lik mikrofüj tüpleri (Ambion p/n AM1240)  
 PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)  
 Toplama tüpü (Qiagen)  
 Spin kolonu (Qiagen)  
 Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)  
 Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtresi (Milipore p/n UFC503096)

### **3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)  
 RNase A (100 mg/mL) (Qiagen p/n 19101)  
 Proteinaz K solüsyonu (>600 mAU/mL) (Qiagen p/n 19131)  
 İnsan gDNA'sı [Promega p/n G1521 (dişi) ve p/n G1471 (erkek)]  
 Alu I (10 U/ $\mu$ L) (Promega p/n R6281)  
 Rsa I (10 U/ $\mu$ L) (Promega p/n R6371)  
 Agaroz (Scjarlou)  
 Borik Asit (Sigma)  
 Etidyum Bromid (Sigma)  
 Moleküler Ağırlık Belirteci (Fermantas)  
 6X Jel yükleme tamponu (Sigma)  
 Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti (Agilent p/n 5190-0449)  
 [Nükleazdan arındırılmış su, Exo (-) Klenow, 5X Reaksiyon tamponu,



Cyanine 5-dUTP, Cyanine 3-dUTP, 10X dNTP, Rasgele Primer  
içermektedir.]

1 × TE (Tris Edta) (pH 8.0) (Promega p/n V6231)

Asetonitril (% 100, 1L) (Sigma p/n 271004)

Oligo aCGH Yıkama Tamponu 1 ve 2 (Agilent p/n 5188-5226)

Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti (Agilent p/n 5188-5220)

Human Cot-1 DNA (Agilent p/n 5190-3393)

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)

Distile Su

Etanol (%95-100) (Tekel)

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen® Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır:

- Su banyosunun sıcaklığı 56 °C'ye getirilmiştir.
- Kan örnekleri ve diğer malzemeler oda sıcaklığına getirilmiştir.
- 1,5 ml ependorf tüp strafora konulup üzerine protokol numarası yazılmıştır.
- 20 µl proteinaz K ependorf tüpünün dibine konmuştur.
- 100 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
- PBS tamponu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 120 µl eklenmiştir.
- Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
- 56 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
- %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmiştir.
- Filtreli tüpün kapağına protokol numarası yazılmıştır.
- Ependorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılmıştır.
- 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.

- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konulup, filtratlı tüp atılmıştır (Filtreli tüp tamamen boşalamadığı zaman tam devirde tekrar santrifüjlenmiştir) .
- 500 µl Buffer AW1 dikkatlice filtreli tüpe konulmuştur. 8000 devir/dk'da 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp ikinci yeni toplama tüpüne konulup filtreli tüp atılmıştır.
- Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulmuştur.
- 14.000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni Ependorf tüplerine aktarılıp tam devirde 1 dk santrifüjlenmiş, ependorf tüpü atılmıştır.
- Filtreli tüp yeni ependorf tüpüne aktarılıp üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 5 dk bekletilip 8000 devir/dk'da 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Filtreli tüp atılıp DNA içeren sıvı ependorf tüpü içinde -20 °C'ye kaldırılmıştır.

### 3.3.2. Genomik DNA'nın Niceliksel ve Niteliksel Analizi

Oligo aCGH deneyimizin başarısı için gDNA'nın (genomik DNA) niceliksel ve niteliksel değerlendirmesinin doğru biçimde yapılması son derece önemlidir. Yüksek kalitede gDNA karbohidratlar, proteinler ve organik çözücüler gibi atıklardan arınmış olmalı ve minimal degradasyona uğramış olmalıdır. gDNA konsantrasyonunun ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

- NanoDrop Program menüsünden Nükleik Asit Ölçümü seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.
- Cihazın ölçüm ayarını sıfırlamak için elüsyon tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.
- Her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak her örneğin DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Ürün miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Ürün } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

- Yüksek kalitedeki gDNA'nın A260/A280 oranı 1.8-2.0 arasında olması kontamine proteinlerin yokluğuna işaret etmektedir. Dolayısı ile A260/280 oranı kaydedilmiştir.

### 3.3.3. Genomik DNA Enzimatik Etiketleme Kiti ile Restriksiyon Kesimi

Buffer C ve Asetillenmiş BSA (10 mg/ $\mu$ L) [Rsa I(10 U/  $\mu$ L) enzimi ile birlikte -20 °C'de bulunmaktadır] oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra vorteks karıştırıcıda hızlıca sonra mikrosantrifüjde döndürüldü. Bütün malzemelerle buz üzerinde iken çalışıldı ve işi bitince tekrardan -20 °C'ye kaldırıldı.

Her reaksiyon için PCR tüpüne Tablo 3.1'de belirtilen uygun miktarda gDNA eklendi ve distile su ile Tablo 3.1'de belirtilen hacme tamamlandı.

Tablo 3.1. Mikroarray başına gerekli başlangıç gDNA miktarı

Mikroarray Formatı	Başlangıç gDNA miktarı ( $\mu$ g)	Restriksiyon Kesimli gDNA Hacmi ( $\mu$ L)
8x mikroarray	0.2 - 0.5	10.1

Ana Kesim Karışımı (AKK) Tablo 3.2'te verildiği sıra ve miktarlarda buzun üzerinde hazırlandı.

Tablo 3.2. Ana Kesim Karışımının Hazırlanışı

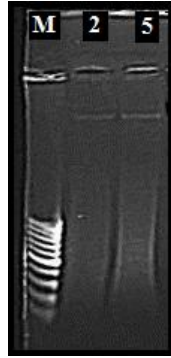
Bileşen	Reaksiyon başına ( $\mu$ L)	16 reaksiyonluk (fazlası dahil) ( $\mu$ L)
Distile Su	1	18
10X Buffer C	1.3	23.4
Asetillenmiş BSA (10 mg/ $\mu$ L)	0.1	1.8
Alu I (10 U/ $\mu$ L)	0.25	4.5
Rsa I (10 U/ $\mu$ L)	0.25	4.5
<b>Son Hacim</b>	<b>2.9</b>	<b>52.2</b>

Sekiz olgu gDNA'sının ve sekiz referans gDNA'sının olduğu her bir PCR tüpüne (toplamda 16 PCR tüpü) 2.9  $\mu$ L AKK eklendi. 10.1  $\mu$ L hacme tamamlanan PCR tüplerine 2.9  $\mu$ L AKK eklenmesi ile toplam hacmi 13  $\mu$ L'ye ulaşan karışıma pipetaj yapıldı. Tüplere Tablo 3.3'te yer alan ısı döngüleyicisi programı uygulandı.

Tablo 3.3. Isı Döngüleyicisi Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
1	37 °C	2 saat
2	65 °C	20 dakika
3	4 °C	Beklet

Isı döngüleyicisi programı sonrasında kesilmiş gDNA'dan 2  $\mu$ L alındı. Kesimin etkinliği %1 rutin agaroz jelde etidyum bromid ile boyanarak jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi kullanılarak değerlendirildi. Kesilen ürünlerin büyük çoğunluğu 200-500 bp arasında yer aldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Enzimatik Kesim İşleminin Değerlendirilmesi (M: Moleküler Belirteç, 2 ve 5: Örnek protokolleri)

### 3.3.4. Genomik DNA'nın Floresan İşaretlemesi

Isı döngüleyicisindeki program bittikten sonra 13  $\mu$ L gDNA içeren her bir PCR tüpüne (toplam 16 adet) 2.5  $\mu$ L rasgele primerlerden eklendi ve toplam hacim 15.5  $\mu$ L'ye ulaştı. DNA denatürasyonu ve fragmantasyonu için Tablo 3.4'te verilen ısı döngüleyicisi programı uygulandı.

Tablo 3.4. DNA denatürasyonu ve fragmentasyonu için ısı döngüleyicisi programı

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>1</b>	95 °C	3 dk
<b>2</b>	4 °C	Beklet

Cy3 ve Cy5 etiketleme ana karışımı (EAK) Tablo 3.5'deki sıra ile ve buzun üzerinde hazırlandı.

Tablo 3.5. Etiketleme Ana Karışımı Hazırlanışı

<b>Bileşen</b>	<b>Reaksiyon başına (µL)</b>	<b>8 reaksiyonluk (fazlası dahil) (µL)</b>
<b>5X Reaksiyon Tamponu</b>	5.0	42.5
<b>10X dNTP</b>	2.5	21.25
<b>Cyanine 3-dUTP veya Cyanine 5-dUTP</b>	1.5	12.75
<b>Exo (-) Klenow</b>	0.5	4.25
<b>Son Hacim</b>	9.5	80.75

Referans gDNA'larının bulunduğu PCR tüplerinin her birine Cyanine 3-dUTP (boya) eklenen etiketleme ana karışımından 9.5 µL eklendi. Örnek gDNA'larının bulunduğu PCR tüplerinin her birine ise Cyanine 5-dUTP (boya) eklenen etiketleme ana karışımından 9.5 µL eklendi. 25 µL hacime ulaşan PCR tüplerine pipetaj yapıldı. DNA etiketlenmesi Tablo 3.6'deki ısı döngüleyici programı kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.6. DNA Etiketlemesi için ısı döngüleyicisi programı

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>1</b>	37 °C	2 saat
<b>2</b>	65 °C	10 dakika
<b>3</b>	4 °C	Beklet

### 3.3.5. Etiketlenmiş gDNA'nın Temizlenmesi

Etiketlenmiş gDNA Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtresi kullanılarak aşağıdaki basamaklar takip edilerek temizlenmiştir:

- Her bir reaksiyon tüpüne 430 µL 1xTE (pH 8.0) eklendi.

- 1.5 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine Amicon Ultra-0.5, Ultracel-30 Membran, 30 kDa Filtreler yerleştirildi ve etiketlenmiş olan her bir gDNA (örnek ve referanslar dahil toplam 16 adet) filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında 10 dk. boyunca 14,000 x g 'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı.

- Her bir reaksiyon tüpüne 480 µL 1xTE (pH 8.0) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk. boyunca 14,000 x g 'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı.

- Filtreler yeni 1.5 µL'lik mikrofüj tüplerinin içine ters çevirilerek yerleştirildi. Oda sıcaklığında 1 dk. boyunca 1,000 x g 'de santrifüj edilerek temizlenmiş örnek elde edildi. Temizlenme işlemi sonunda her bir tüpte yaklaşık olarak 20-32 µL hacim kaldı.

### 3.3.6. Ürün Miktarı ve Spesifik Aktivite Hesaplanması

Ürün miktarı ve spesifik aktivite hesaplanması için NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spektrofotometresi kullanılmıştır:

- NanoDrop Program menüsünden MikroArray Ölçümü seçildikten sonra örnek tipi DNA-50 olarak ayarlanmıştır.

- Cihazın ölçüm ayarını sıfırlamak için TE tamponundan 1.5 µL kullanılmıştır.

- Temizlenmiş etiketli her gDNA örneğinden 1.5 µL kullanılarak her örneğin  $A_{260nm}$  (DNA),  $A_{550nm}$  (cyanine 3),  $A_{650nm}$  (cyanine 5) absorbansı, gDNA konsantrasyonu ve hacmi ölçülmüştür.

- Spesifik Aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Aktivite} \quad (\mu\text{g gDNA başına pmol boya}) = \frac{\mu\text{L boya başına pmol}}{\mu\text{L gDNA başına } \mu\text{g}}$$

- Ürün miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Ürün miktarı } (\mu\text{L}) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng}/\mu\text{L}) \times \text{Örnek Hacmi } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng}/\mu\text{g}}$$

- Spesifik aktivite ve ürün miktarı ile ilgili beklenen değerler Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Beklenen spesifik aktivite ve ürün miktar değerleri

<b>Giriş gDNA (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Ürün Miktarı (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Cyanine-3 işaretli Referansların spesifik aktivitesi (<math>\text{pmol}/\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Cyanine-5 işaretli Örneklerin spesifik aktivitesi (<math>\text{pmol}/\mu\text{g}</math>)</b>
0.2-0.5	2.5-3	15-25	15-20

- Etiketleme sonrası Cy3 ve Cy5 ürün miktarları birbirinin aynı olması gerekmektedir. Cy3 ile etiketlenmiş referansların olduğu PCR tüpleri (8 adet) ile Cy5 ile etiketlenmiş örneklerin olduğu PCR tüpleri (8 adet) tek bir PCR tüpünde bu prensip doğrultusunda birleştirildi.

### 3.3.7. Etiketlenmiş gDNA'nın Hibridizasyona Hazırlanması

Hibridizasyon ana karışımında kullanılmak üzere Oligo aCGH Hibridizasyon Kiti içerisinde liyofilize halde olan 10X bloke edici ajana 1.350  $\mu\text{L}$  distile su eklendi ve oda sıcaklığında 60 dk. bekletildi, vorteks karıştırıcıda döndürüldükten sonra -20 °C'de kullanıma hazır şekilde kaldırıldı.

Hibridizasyon ana karışımı Tablo 3.8'deki sıra ile ve buzun üzerinde hazırlandı.

Tablo 3.8. Hibridizasyon Ana Karışımı Hazırlanması

<b>Bileşen</b>	<b>Hibridizasyon başına hacim (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>8 reaksiyonluk (fazlası dahil) (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)</b>	2	20
<b>10X aCGH Bloke Edici Ajan</b>	4.5	45
<b>2X HI-RPM Hibridizasyon Tamponu</b>	22.5	225
<b>Son Hacim</b>	29	290

Her bir PCR tüpünden (toplan 8 adet) 16  $\mu\text{L}$ , hibridizasyon ana karışımından 29  $\mu\text{L}$  alınarak toplam 45  $\mu\text{L}$  yeni PCR tüpünde birleştirildi. Tablo 3.9'da yer alan ısı döngüleyicisi programı uygulandı.

Tablo 3.9. Isı döngüleyicisi programı

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>1</b>	95 °C	3 dakika
<b>2</b>	37 °C	30 dakika

### 3.3.8. Mikroarray Hibridizasyonu

Hibridizasyon haznesine açıklıkları üste bakacak şekilde temiz bir contalı lam yerleştirildi. Contalı lamın haznenin tabanı ile tam olarak oturduğundan emin olundu.

Conta ile çevrelenen ve sekiz adet olan örnek koyma kısmının içine hibridizasyon örnek karışımından 40  $\mu\text{L}$  "sürükle ve dağıt" usulüne uygun olarak eklendi.

Problar, cam lamın "Agilent" etiketli yüzüne basılmıştır. Bu yüz "aktif kısım"; numerik barkodun olduğu kısım ise "inaktif kısım" olarak adlandırılmaktadır. Aktif kısmı contalı lamın üst yüzeyine; numerik barkod kısmı yukarı, Agilent etiketli barkod kısmı aşağı bakacak şekilde yerleştirildi. Cam lamlar mikroarraye zarar vermemek için kenarlarından dikkatlice tutuldu ve lamaların yüzeyine hiç bir suretle dokunulmadı. Hibridizasyon haznesi kapağı kapatıldı, mandal kaydırıldı ve



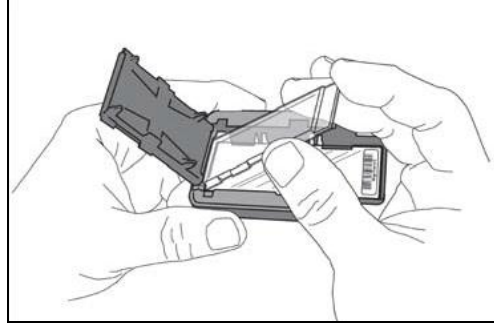
döndürülerek sıkıldı. Hazne dik olarak döndürülerek lamlar tamamen karışım ile temas ettirildi, baloncuklar kontrol edildi. Kapatılmış lam haznesi 65 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınındaki rotator yuvaya yerleştirildi. Denge için yuvanın simetriğine ayrı boş bir hibridizasyon haznesi yerleştirildi. Rotator hızı 20 devir/dakika'ya ayarlandı. 65 °C'de 16-24 saat hibridizasyona bırakıldı.

### **3.3.9. Hibridizasyon Sonrası Yıkama**

Yıkama tamponu 1'i içeren iki adet cam tabak, yıkama tamponu 2'yi içeren bir adet cam tabak, lam yıkama plakaları ve manyetik karıştırıcı çubuk yıkama öncesinde %100 asetonitril ile 5 dk boyunca oda sıcaklığında ve çeker ocak içinde manyetik karıştırıcı yardımı ile yıkandı. Daha sonra çeker ocakta bekletilerek kurutuldu. Yıkamada kullanılacak olan asetonitril ile yıkanmış olan malzemeler distile su ile en az beş defa durulandı.

16-24 saatlik hibridizasyon süresinin bitimi sonrasında hibridizasyon haznesi yıkama tamponu 1'in bulunduğu cam tabak içinde birbirlerinden ayrıldı. Mikroarray lamı hemen sonrasında yıkama tamponu 1'in bulunduğu ve manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan cam tabaktaki lam yıkama plağına yerleştirildi ve 5 dk boyunca bekletildi. Sonrasında lam yıkama plağı, yıkama tamponu 2'nin bulunduğu ve 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan cam tabağa aktarıldı burada da 1 dk. bekletildikten sonra emdirme kağıdının üzerine alındı (Optimum performans için bir gece boyunca 37 °C'ye ayarlanmış su banyosuna beher içinde bırakılan yıkama tamponu 2, yıkama işleminin hemen öncesinde 37 °C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı plakaya yerleştirildi).

Mikroarray lamı, lam tutucusuna "Agilent" etiketi dış ve üst tarafa bakacak şekilde yerleştirildi, ozon bariyer lam kapağı da Şekil 3.3'te gösterildiği gibi lamın üzerine yerleştirilerek lam tutucusunun tırnağı yardımı ile kapatıldı.



Şekil 3.3. Mikroarray lamının lam tutucuya yerleştirilmesi ve ozon-bariyer lam kapağının kapatılması işlemi

### 3.3.10. Mikroarray Taratılması

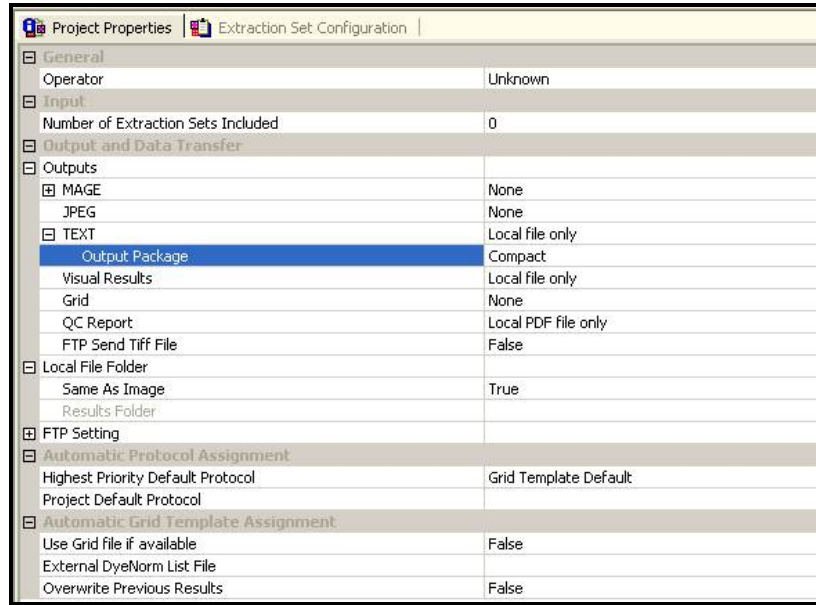
Lam tutucu taratıcı cihaz karuseline yüklendi. Bilgisayardan "Scan Control" programı açıldı ve aşağıda belirtilen ayarlar yapıldı:

- 8x60K mikroarrayi için *Profile AgilentG3\_CGH* seçildi.
- *Slide ID <Auto Detect>* olarak seçildi.
- *Channels R+G* olarak ayarlandı.
- *Scan Region Agilent HD (61x21.6 mm)* olarak ayarlandı.
- *Resolution ( $\mu\text{m}$ ) 3  $\mu\text{m}$ 'ye* ayarlandı.
- *Tiff 16 bit'e* ayarlandı.
- *R PMT ve G PMT %100'e* ayarlandı.
- *XDR* ayarı *<No XDR>*'ye ayarlandı.
- İmaj dosyasının çıkartılacağı klasör dizini seçildi.

- Tarayıcı durum menüsünden "tarayıcı hazır" ifadesi görüldükten sonra mikroarrayin karuselde yerleştirildiği yuva "Slot *m-n*" (*m* ilk yuva *n* son yuva) olarak belirtilip tarama başlatıldı.

### 3.3.11. İmaj Dosyalarının Analizi

Tarama işlemi bittikten sonra aberasyonları analiz etmek için imaj dosyasından (.tiff) veri çıkartma ve log oranlarına dönüştürme işlemi yapmak amacıyla *Feature Extraction 10.5.1.1* ve *Agilent CytoGenomics 2.0.6.0* yazılımları kullanıldı. *Feature Extraction* yazılımının ayarları Şekil 3.4'te gösterildiği gibi yapıldı.

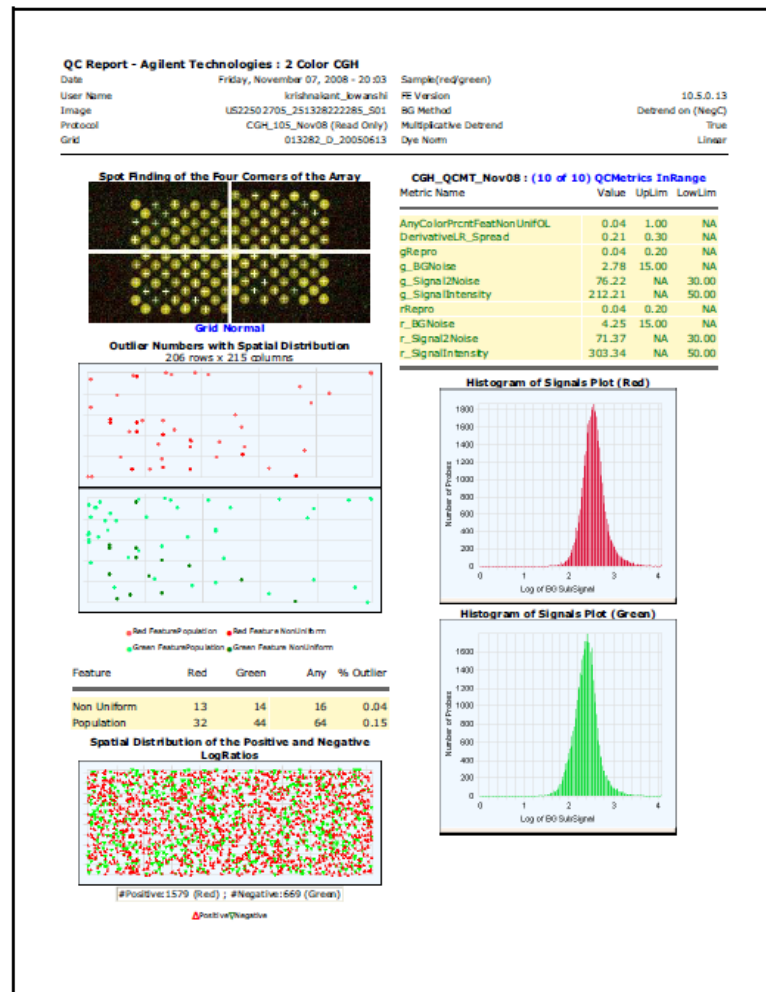


Şekil 3.4. *Feature Extraction 10.5.1.1* Yazılımının Standart Ayarları

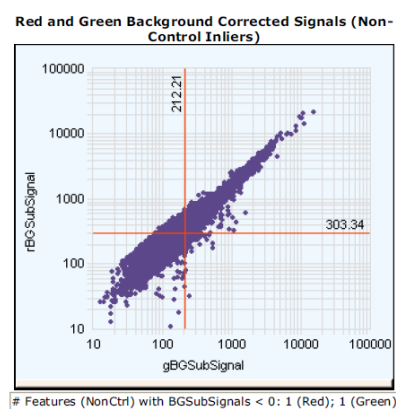
*Feature Extraction 10.5.1.1* yazılımı deneyin kalitesi ile ilgili Şekil 3.5'te ve Şekil 3.6'da örnek verildiği üzere kalite kontrol raporu vermektedir. Ayrıca enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.11. Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri

Metrik Değer	Mükemmel	İyi	Değerlendir
<b>Arka Plan Gürültüsü (BGNoise)</b>	<10	10-20	>20
<b>Sinyal Yoğunluğu (Signal intensity)</b>	>150	50-150	<50
<b>Sinyal/Gürültü (Signal to Noise)</b>	>100	30-100	<30
<b>Tekrarlanabilirlik (Reproducibility)</b>	<0.05	0.05.-0.2	>0.2
<b>DLRSpread</b>	<0.2	0.2-0.3	>0.3



Şekil 3.5. *Feature Extraction 10.5.1.1* yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği - 1



Şekil 3.6. *Feature Extraction 10.5.1.1* yazılımının verdiği CGH Kalite Kontrol Raporu Örneği - 2

## 4. BULGULAR

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, DSM-IV-TR'ye göre YGB tanısı alan 37 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Dismorfik değerlendirmeleri standart bir yöntem sağlamak için geliştirilen ODÖ rehberi eşliğinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'nde yapılmıştır. Karyotip ve aCGH analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Olguların yaşları, cinsiyetleri ve tanıları ile ilgili bilgiler hasta dosyalarından temin edilmiştir.

### 4.1. Olguların Demografik Özellikleri

Çalışmamıza dahil edilen olguların 32'si erkek, 5'i kızdır (Tablo 4.1). Olguların yaş ortalaması ~ 9 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Çalışmamıza dahil olan olguların cinsiyet dağılımları

Olgu No.	N	%
Kız	5	13,6
Erkek	32	86,4
<b>Toplam</b>	<b>37</b>	<b>100,0</b>

### 4.2. Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmamızda DSM-IV-TR'ye göre YGB şemsiyesi altındaki alt tanılarından 27'sinde OB, 7'sinde atipik OB ve 3'ünde AS tanımlandı. Çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun 20 tanesinde dismorfik özellik tespit edildi. Olgularımızın tanı ve dismorfik değerlendirme bulguları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Olguların DSM-IV-TR'ye Göre Tanı ve Dismorfik Özellikleri

Olgu No.	Tanı	Dismorfik Özellikler
1	Otistik Bozukluk	Sinofri, elde bilateral protüberan polidaktili (opere)

Tablo 4.2. Olguların DSM-IV-TR'ye Göre Tanı ve Dismorfik Özellikleri (Devam)

2	Otistik Bozukluk	-
3	Otistik Bozukluk	Tübüler burun görünümü
4	Otistik Bozukluk	Tübüler burun görünümü
5	Otistik Bozukluk	Obezite, geniş burun köprüsü, ön saç düğümü
6	Otistik Bozukluk	Pitozis, kemer görünümde kaşlar, hipoplazik alae nazi, ince üst dudak, göz altında morluklar, displastik kulaklar
7	Otistik Bozukluk	-
8	Otistik Bozukluk	-
9	Otistik Bozukluk	-
10	Otistik Bozukluk	-
11	Otistik Bozukluk	-
12	Otistik Bozukluk	Belirgin kulak lobları
13	Otistik Bozukluk	Belirgin büyük kulaklar, konjenital katarakt
14	Otistik Bozukluk	Sivri çene, hafif belirgin alın çıkıklığı ve alın genişliği, derin yerleşimli gözler, üçgen yüz
15	Otistik Bozukluk	-
16	Otistik Bozukluk	Kemerli kaş yapısı, ince üst dudak
17	Otistik Bozukluk	Kalın kaşlar, düzensiz yerleşimli ön dişler
18	Otistik Bozukluk	-
19	Atipik Otistik Bozukluk	-
20	Otistik Bozukluk	-
21	Asperger Sendromu	-
22	Otistik Bozukluk	-
23	Otistik Bozukluk	Ön saç düğümü, dolgun yanaklar, hipertelorizm, strabismus
24	Atipik Otistik Bozukluk	Hafif prognatizm, obezite
25	Atipik Otistik Bozukluk	-

Tablo 4.2. Olguların DSM-IV-TR'ye Göre Tanı ve Dismorfik Özellikleri (Devam)

27	Atipik Otistik Bozukluk	-
28	Atipik Otistik Bozukluk	Çene gamzesi
29	Otistik Bozukluk	Ön kesici diş belirginliği, hafif retrognati
31	Otistik Bozukluk	Hipermetropi
32	Atipik Otistik Bozukluk	Geniş burun ucu
34	Asperger Sendromu	-
37	Asperger Sendromu	-
39	Otistik Bozukluk	-
40	Otistik Bozukluk	Hafif dolgun yanaklar, strabismus
47	Otistik Bozukluk	Makrosefali, obezite, strabismus
48	Otistik Bozukluk	Strabismus, hipertelorizm, kulaklar displastik, filtrum kısa, ön saç düğümü
55	Atipik Otistik Bozukluk	Basık burun kökü

#### 4.3. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler

Çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun iki tanesinde (%5.4) kromozom anomalisine rastlanmış diğerleri normal olarak değerlendirilmiştir. Bu anomaliler Tablo 4.3'de belirtilmiştir.

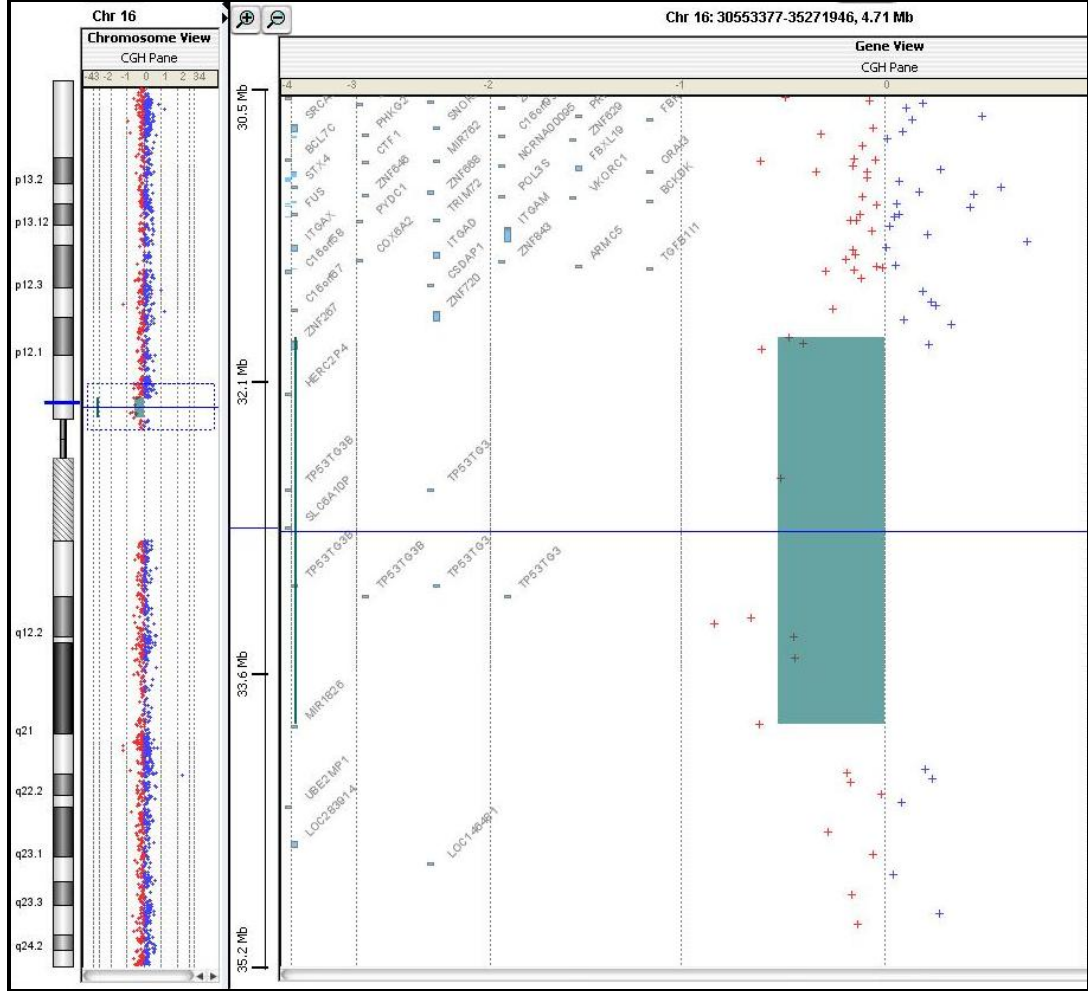
Tablo 4.3. Olgularda Saptanan Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozom Anomalileri

Olgu No.	Kromozom Anomalisi
1	45,XY,rob(13;14)mat
48	46,Y,inv(X)(p22q22)

#### 4.4. Olgularda Saptanan Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD'ler)

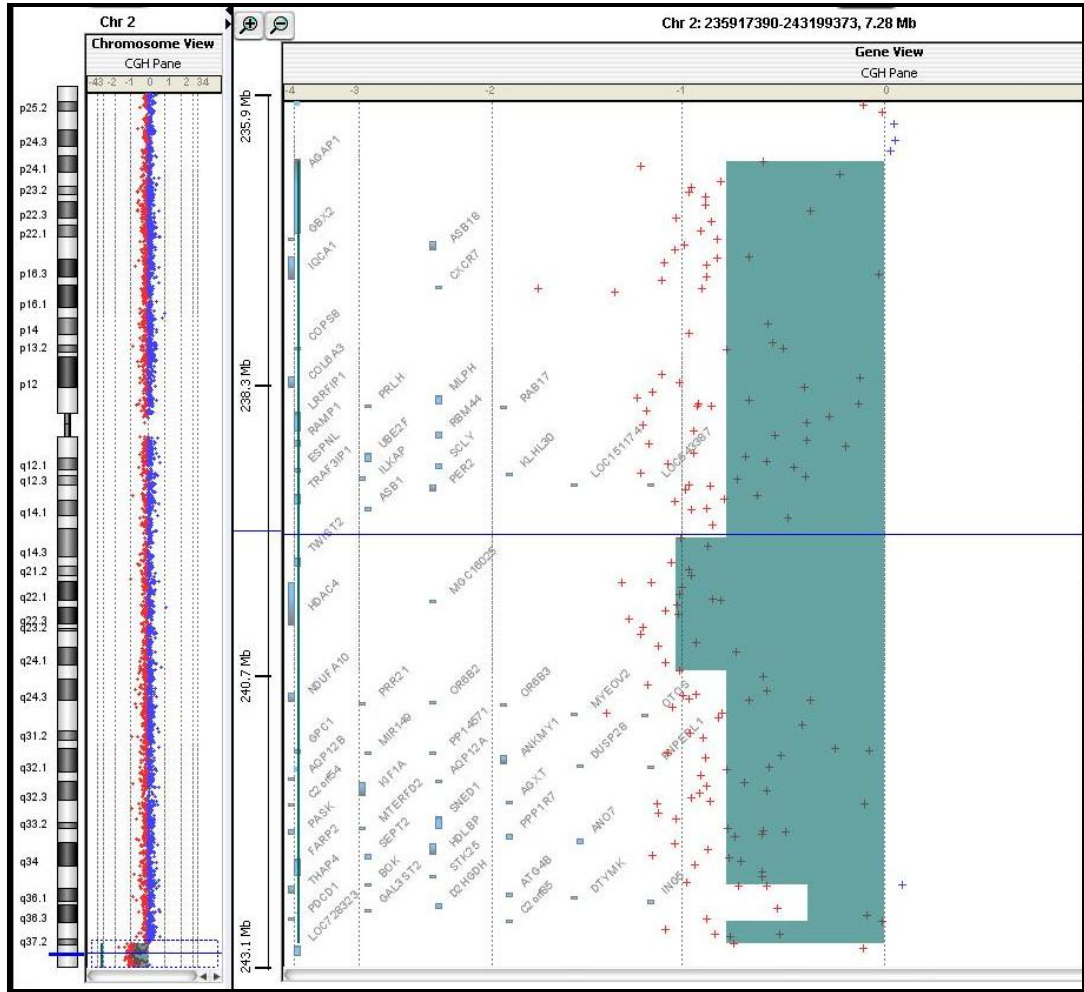
Çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun 11'inde (~%30) KSD tespit edilmiştir. Olgularda saptanan KSD'ler ve boyutları Tablo 4.4'te özetlenmiştir. *Cytogenomics*

2.0.6.0 analiz programındaki aberasyon görüntülerine ait örnekler Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

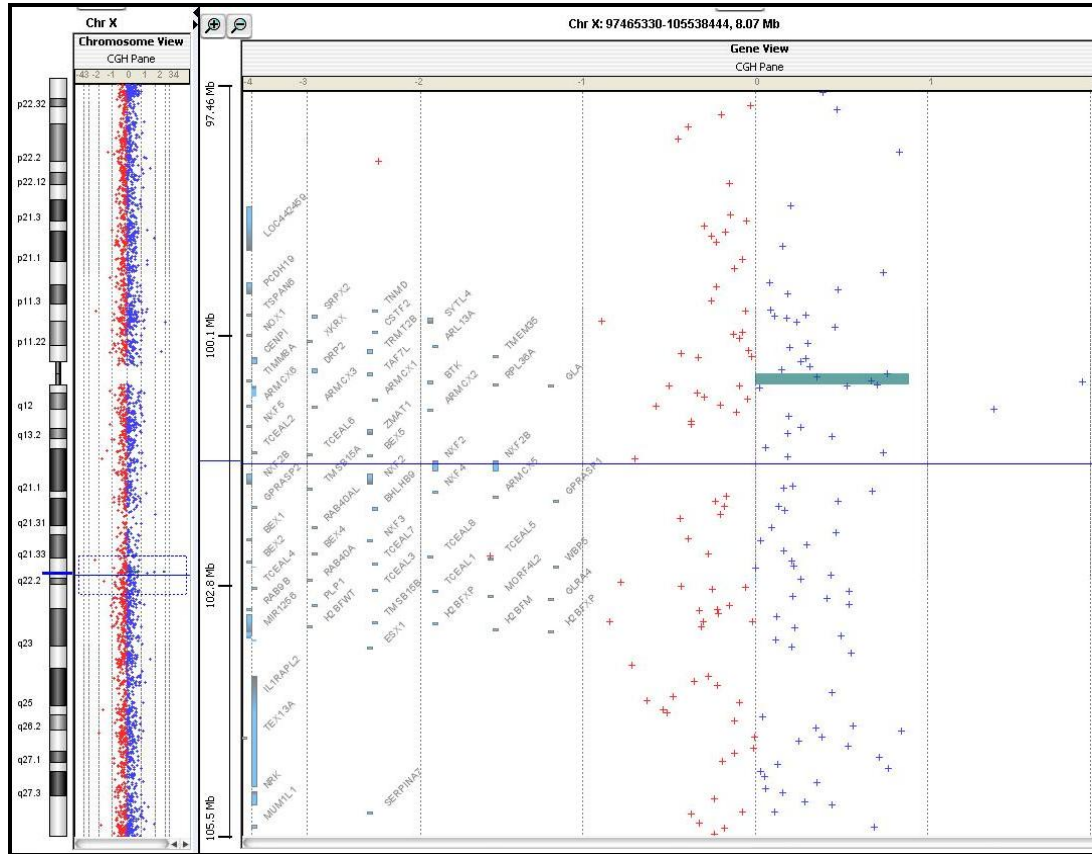


Şekil 4.1. 1 nolu olguya ait 16p11.2'de yer alan delesyon bölgesi görüntüsü





Şekil 4.2. 16 nolu olguya ait 2q37'de yer alan delesyon bölgesi görüntüsü



Şekil 4.3. 48 nolu olguya ait Xq22.1'de yer alan duplikasyon bölgesi görüntüsü

Tablo 4.4. Olgularımızın aCGH Analiz Sonuçları

<b>Olgu No.</b>	<b>Saptanan KSD</b>	<b>Boyutu (bç)</b>	<b>Kırık noktaları (başlangıç- bitiş) (bç)</b>
1	del 16p11.2	2,097,143	31,864,091-33,961,233
4	dup 17q12	915,571	32,007,395-32,922,965
7	del 2p16.3	528,849	50,982,113-51,510,961
9	dup 16p13.11 - p12.3	2,166,391	15,131,723-17,298,113
10	del 3p26.3	994,316	93,949-1,088,264
11	del 1q44	906,917	247,879,926-248,786,842
13	dup 7q36.3	259,659	155,257,241-155,516,899
16	del 2q37.2 - q37.3	6,577,375	236,429,985-243,007,359
20	del 20p13	868,191	1,580,899-2,449,089
25	dup 2p25.3 - p25.1	9,630,684	386,460-10,017,143
48	dup Xq22.1	116,014	100,531,472-100,647,485

Olgularda saptanan KSD'lerin kromozomlara göre dağılımı, sıklığı ve tespit edildiği olgu numarası Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Kopya Sayısı Değişikliklerinin Kromozomlara Göre Dağılımı

<b>Kromozom</b>	<b>Anomali</b>	<b>Sıklığı (%)</b>	<b>Gözlenen olgu no.</b>
1.	del q44	1/37 (%2.7)	11
2.	del q37.2 - q37.3	1/37 (%2.7)	16
2.	dup p25.3 - p25.1	1/37 (%2.7)	25
2.	del p16.3	1/37 (%2.7)	7
3.	del p26.3	1/37 (%2.7)	10
7.	dup 7q36.3	1/37 (%2.7)	13
16.	del p11.2	1/37 (%2.7)	1
16.	dup 13.11 - p12.3	1/37 (%2.7)	9
17.	dup q12	1/37 (%2.7)	4
20.	del p13	1/37 (%2.7)	20
X.	dup q22.1	1/37 (%2.7)	48

## 5. TARTIŞMA

Sosyal ilişkide bozulma, dil ve iletişim bozukluğu ve tekrarlayıcı davranışlar veya ilginin az olması gibi özelliklerle tanımlanan otizm, "YGB" olarak adlandırılmaktadır. İkiz ve aile çalışmaları otizmin genetik temelini ortaya koymuş ve kalıtılabilirliğinin %90'ın üzerinde olduğunu belirtmiştir (11). Günümüzde otizmlili vakaların yaklaşık %25'inde genetik neden belirlenebilmektedir. Bu nedenler (1) Sitogenetik olarak gözlenebilen bütün kromozom anomalileri (~%5), (2) Kopya Sayısı Değişiklikleri (KSD'ler) (örn, submikroskopik delesyonlar ve duplikasyonlar) (%10-20) ve (3) Nörolojik bulguları YGB ile ilişkili olan tek gen hastalıkları (~%5) yer almaktadır. YGB tanısına yönelik klinik tanı kriterleri bulunmasına rağmen tanı koymayı kesinleştiren sitogenetik veya moleküler bir tanı yöntemi yoktur. YGB tanısı alan olguların klinik farklılıklar göstermesi, tedavi metodu olarak izlenen özel eğitim yöntemlerine cevabın farklı olması, farklı moleküler yolların patogeneizde etkili olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda Eskişehir bölgesinde YGB tanısı alan olgulardaki karyotip ve KSD'lerin ortaya konması, bunların tanısal amaçlı kullanılabilirliğinin ortaya konması, elde edilen veriler ile moleküler etiyojisinin anlaşılmasına katkıda bulunulması ve genetik danışmanın verilebilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamıza dahil olan 37 olgunun 27'si OB, 7'si atipik OB ve 3'ü AS olarak tanımlanmıştır. Bu olgular ODÖ rehberi eşliğinde dismorfik açıdan değerlendirildi ve olguların oksipitofrontal çap (OFC) ölçümleri yapıldı. Genel dismorfoloji ve mikrosefalinin olmamasına göre otizm esansiyel ve kompleks olarak ayrılmaktadır. (4). Buna göre çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun tümü esansiyel otizm olarak kabul edildi ancak mevcut dismorfik bulguları tespit edilenler ek olarak belirtildi. Çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun aileleri tek bir etkilenmiş bireye sahip "basit aile" tanımlamasına uymaktadır. Dahil edilen 37 olgunun tümüne Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda GTG bantlama yöntemi ile karyotip analizi ve yaklaşık 60,000 oligonükleotid probun (8x60K) yer aldığı platform kullanılarak aCGH analizi yapıldı.

Sitogenetik olarak gözlenebilen kromozom anomalileri GTG bantlama yöntemi ile YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde ortaya konabilmektedir.

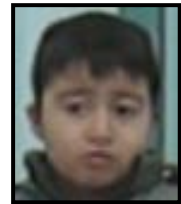
Çalışmamıza dahil edilen 37 olgunun iki tanesinde GTG bantlama yöntemi ile kromozom anomalisi tespit edildi. Kromozom anomalisi tespit edilen iki olgu çözünürlüğü daha yüksek olan aCGH tekniği ile de incelendi. Çalışmamızda sitogenetik olarak gözlenebilen kromozom anomalisi oranı %5.4 olup literatür ile benzer bir oran göstermiştir. 1 nolu olguda bulunan kromozom anomalisi, 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)mat daha önce bildirilmiş, klinik önemi bilinmeyen ancak kalıtılan anomalilerdendir (143, 144). 48 nolu olguda saptanan kromozom anomalisine benzer bir olgu literatürde perisentromerik X inversiyonuna sahip mental retarde ve otistik bir çocukta bildirilmiştir (145).

aCGH analizi çalışmamıza dahil olan 37 olgunun 11'inde (~%30) çeşitli KSD'leri tespit etti. Patojenik olması muhtemel KSD'ler Tablo 4.4'te özetlenmiş ve aşağıda tartışılmıştır.

1 nolu olgumuzda del 16p11.2 tespit edildi. 16p11.2 delesyon sendromu gelişme geriliği, entelektüel yetersizlik ve/veya otizm spektrum bozukluk (YGB) ile karakterizedir. Weiss ve ark. (17) 16p11.2 delesyonlarını veya duplikasyonlarını otizmli bireylerin yaklaşık %1'inde ve gelişme veya konuşma gecikmesi olan çocukların %1.5'inde bildirmiştir. Marshall ve ark. (16) %1 ile benzer bir oran gözlemlemiştir. Çalışmamızda bir olguda (%2.7) del 16p11.2 saptanmış olup araştırma grubu sayısının sınırlı olması nedeniyle sıklığın literatür verilerine göre yüksek olduğu düşüncesindeyiz.



4 nolu olgumuzda 17q12 mikroduplikasyonu tespit edildi. Bu bölgenin delesyonlarının ve duplikasyonlarının YGB ile ilişkili olduğunu öne süren vakalar bildirilmiştir (163, 164).



7 nolu olgumuzda 2p16.3 bandında 2:50,982,113-51,510,961 baz çiftleri arasında 528,849 bç'lik bir delesyon tespit edildi. Bu delesyon bölgesinde otizm ile ilişkili olduğu bilinen *NRXN1* (neuroxin 1) geni delesyona uğramıştır (158-160).



9 nolu olgumuzda 16p13.11 - p12.3 bant bölgesinde 15,039,224-17,205,614 baz çiftleri arasında 2,166,391 bç büyüklüğünde bir duplikasyon tespit edildi. Bu bölgedeki genlerden *NDE1* nörolojik ve davranışsal fenotiplerden sorumlu olabilir. Bu gen mikrotübül organizasyonu, mitoz ve nöron göçünde temel rolü olan nükleer dağılım E (NudE) ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. 16p13.11 bölgesinin duplikasyonu otizmin de dahil olduğu çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklarda risk faktörü olarak kabul edilmektedir (162). *NDE1* geninin homozigot mutasyonları mikrosefali ile birlikte olan lizensefali 4; LIS4 (OMIM #614019) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak olgumuzda mikrosefali ile birlikte lizensefali bulgusuna rastlanmadı. Bu durum olgumuzda söz konusu geni içeren bölgenin duplike olması ile ilgili olabilir.



10 nolu olgumuzda 3p26.3 bölgesinde 3:939,49-1,088,264 baz çiftleri arasında 994,316 bç'lik delesyon ile birlikte *CHLI* [Hücre adezyon molekülü L1CAM (L1'in yakın homoloğu) homoloğu] geni ortadan kaybolmuştur. *CHLI*'in dahil olduğu gen ailesinin üyesi olan *CNTN4* geninin bütünlüğünün bozulması otizm ile ilişkilendirilmiştir. *CNTN4* geninin 3p26.3-p26.2 bandındaki mRNA transkripti merkezi sinir sisteminde akson büyümesinde, rehberliğinde ve fasikülasyonunda yer almaktadır ve immüoglobulin süperfamilyasının nöronal adezyon molekülleri grubunun bir üyesidir. *CHLI* geninin delesyonu benzer bir etki ile 10 nolu olgumuzdaki fenotipe neden olmuş olabilir (161).



11 nolu olgumuzda del 1q44 tespit edildi. Bu bölgede olfaktör reseptörlerini kodlayan 32 farklı gen bulunmaktadır. Otistik çocuklarda olfaktör fonksiyonun bozulması tarif edilen bir durumdur (153, 154). Otizmin neden - sonuç ilişkisi göz önüne alındığında olfaktör yapılar ile ilgili araştırmaların ilerletilmesine ihtiyaç vardır (155).



13 nolu olgumuzda 7q36.3 bant bölgesinde 259,659 bç'lik bir duplikasyon tespit edildi. Bu bölgede yer alan *EN2* geninin otizm etyolojisindeki nörogelişimsel defekt hipotezini destekleyen bir yatkınlık geni olduğu bildirilmiştir (166, 167).



16 nolu olgumuzda del 2q37 tespit edilmiştir. Bugüne kadar bildirilmiş 2q37 mikrodelesyonuna sahip olguların üçte birinde otizm veya otistik özellikler bildirilmiştir. 2q37 mikrodelesyonları sendromik otizmlili bireylerde daha sık gözlenmektedir (12). Ancak 2q37 mikrodelesyonuna özel bir davranış fenotipi tespit edilmemiştir. 2q37 ile ilgili bütün bildirilen terminal delesyonlar dismorfik fenotip ile ilişkilendirilmiştir. 16 nolu olgumuzda 2q37 delesyonu olan olgularda da tanımlanmış olan dismorfik özelliklerden kemerli kaş yapısı ve ince üst dudak tespit edildi. Tip E Brakidaktili, Albright Herediter Osteodistrofisi-benzeri kritik bölgesi olarak adlandırılan ve *HDAC* genini içeren kısmın delesyonu olan olguların yarısında gözlenmektedir (146). 2q37 delesyonu olan 16 nolu olgumuzda *HDAC* geni delesyona uğramış ancak direk grafiler ile yapılan değerlendirmeler sonucu Tip E brakidaktili ile uyumlu bulunmamıştır. 2q37 mikrodelesyonu olan olgulardaki otistik özelliklerden sorumlu tutulan aday genlerden *KIF1A*, *FARP2*, *HDLBP*, *PASK* ve *AGAP1* genlerinin 16 nolu olguda delesyona uğradığı tespit edildi (147-151). 2q37 delesyonlu olgularda renal kist gelişme riski bulunması nedeniyle pubertede izlenmeleri tavsiye edildi (152).



20 nolu olgumuzda del 20p13 tespit edildi. Aday lokusların (1) Sık varyasyon gözleendiği bilinen genler, (2) Otizme neden olan nadir varyant genler, (3) Otizm ile ilişkili Mendeliyen hastalıklara neden olan genler ve (4) Mikrodelesyon veya mikroduplikasyon sendromlarının olduğu bölgeler şeklinde dört kategoride değerlendirildiği bir çalışmada 20p13 bölgesine anlamlı bağlantı gösterilmiştir (165).



25 nolu olgumuzda dup 2p25.3 - p25.1 tespit edilmiştir. Geniş otizm serilerinde yapılan çalışmalarda bu bölgeye bağlantı gösterilmiştir (156). 2p25.3'te yer alan ve ağırlıklı olarak beyinde ifade bulan *PXDN* ve *MYTIL* genleri otizme neden olan potansiyel genler olarak değerlendirilmektedir (157).



46,Y,inv(X)(p22q22) karyotipi saptanan 48 nolu olgumuzda dup Xq22.1 tespit edildi. Fenotipik olarak strabismus, hipertelorizm, displastik kulaklar, kısa filtrum, ön saç düğümü gibi özellikleri; inv(X)'in anneden kalıtılması ve annede entellektüel yetersizlik durumunun olması literatürde benzer bir şekilde bildirilmiştir. Bu durumdan X'e bağlı mental





retardasyon 21 (OMIM #300143) fenotipine yol açan *ILIRAPLI* geninin bütünlüğünün bozulması sorumlu tutulmaktadır (145).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Patojenik KSD'lerin özelliklerini ayırmada (1) *de novo* olayın her iki ebeveynden gelmemesi veya etkilenmiş ebeveynden gelmesi (2) beyinde ifade bulunduğu bilinen genleri içeren delesyonlar veya duplikasyonlar olması (3) geniş KSD'ler olması ve (4) duplikasyonlara nazaran delesyonlar olması gibi hususlara dikkat edilmelidir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz KSD'lerden 1 ve 48 nolu olguların parental analizleri yapıldı. Bu olgulardaki KSD'lerin *de novo* olduğu tespit edilmiştir. Diğer olguların paternal analizleri ve doğrulama çalışmaları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılacaktır.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz otizmlili çocukların esansiyel otizme uygunluk göstermesi, nedeni bilinen sendromik olguların ekarte edilerek aCGH analizine başlanmasına ve böylelikle nedeni bilinmeyen genetik alt yapının anlaşılmasına daha fazla katkı sağlamıştır. Her ne kadar klinik değerlendirmede olgular esansiyel olarak değerlendirilse de fenotipik özelliklerin çok farklı olabileceği, ancak bu olgularda aCGH gibi yüksek çözünürlüklü yöntemler kullanıldığında tespit edilebilecek anomaliler olduğu unutulmamalıdır. Çalışmamızda fenotipik değerlendirmede karakteristik özellikleri ile tanımlanamayan 16 nolu olgumuz (del 2q37) bu durumu tekrardan hatırlatmıştır.

Çalışmamızda tespit edilen KSD'leri tespit edebilecek test metodlarından multipleks ligasyon-bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA), metafaz FISH ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) kullanılarak doğrulama çalışmaları yapılmasına ihtiyaç vardır.

Ülkemizde otizm genetiği konusunda araştırmaların yaygınlaştırılması ve artırılması, genetik etyolojinin aydınlatılmasına katkı sağlamanın ötesinde aynı zamanda kromozom anomalilerinin, KSD'lerin ve tek gen hastalıklarının tespit edilmesini; böylelikle otistik çocuklara ve ailelerine genetik danışmanlık verilebilmesini mümkün kılacaktır. Genetik danışmanlık ile birlikte otistik bireylerin ve ailelerinin daha iyi bilgilendirilmesi sağlanabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Stefanatos GA. Regression in autistic spectrum disorders. *Neuropsychol Rev.* 2008;18(4):305-19.
2. Fombonne E. Epidemiological studies of pervasive developmental disorders. In: Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen DJ, editors. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Vol 1: Diagnosis, Developmental, Neurobiology and Behavior.* 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2005. p.42-69.
3. Spence SJ, Schneider MT. The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders. *Pediatr Res.* 2009;65:599–606.
4. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE. Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *Am J Med Genet A.* 2005;135:171–80.
5. Farley MA, McMahon WM, Fombonne E, Jenson WR, Miller J, Gardner M, Block H, Pingree CB, Ritvo ER, Ritvo RA, Coon H. Twenty-year outcome for individuals with autism and average or near-average cognitive abilities. *Autism Res.* 2009:109–18.
6. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* 4<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2000.
7. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* <http://www.dsm5.org> [31/05/2012]
8. Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders. *Genet Med.* 2008;10(4):301-5.
9. Selkirk CG, McCarthy Veach P, Lian F, Schimmenti L, LeRoy BS. Parents' perceptions of autism spectrum disorder etiology and recurrence risk and effects of their perceptions on family planning: Recommendations for genetic counselors. *J Genet Couns.* 2009;18:507–19.
10. Ritvo ER, Jorde LB, Mason-Brothers A, Freeman BJ, Pingree C, Jones MB, McMahon WM, Petersen PB, Jenson WR, Mo A. The UCLA-University of

Utah epidemiologic survey of autism:recurrence risk estimates and genetic counseling.*Am J Psychiatry.*1989;146:1032–6.

11. Monaco AP, Bailey AJ. Autism. The search for susceptibility genes. *Lancet.*2001;358 Suppl:S3.
12. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC, Prieur M, Vekemans M, Carter NP, Munnich A, Colleaux L, Philippe A. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet.*2006;43:843–9.
13. Reddy KS. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet.*2005;6:3.
14. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry.*2006;11(1):18–28.
15. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.*2007;316:445–9.
16. 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, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.*2008;82:477–88.
17. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA,

- Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008;358:667–75.
18. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2.1943;217–250.
  19. Frith, U. *Autism: Explaining the enigma*. Oxford: Blackwell; 1989.
  20. Bonnatere, P. J. *Notice Historique sur le sauvage de l’Aveyron*. Paris: Pancoucke; 1800.
  21. Bleuler, E. *Dementia praecox oder gruppe der schizophrenien*. In: G. Aschaffenburg (Ed.), *Handbuch der Psychiatrie. Spezieller Teil. 4. Abteilung. 1. Hälfte*. Leipzig und Wien: Franz Deuticke; 1911.
  22. Eisenberg, L., & Kanner, L. Early infantile autism, 1943–1955. *American Journal of Orthopsychiatry*. 1956;35:221–234.
  23. Rutter, M. *Diagnosis and definition*. In: M. Rutter & E. Schopler (Eds.), *Autism: A reappraisal of concepts and treatment*. 1978. p.1–25.
  24. Bettelheim, B. *Feral children and autistic children*. *Am. J. Sociol.* 1959;64,455–467.
  25. Böök, J. A., Nichten, S., & Gruenberg, E. *Cytogenetical investigation in childhood schizophrenia*. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 1963;39:309–323.
  26. Rutter, M. *Psychotic disorders in early childhood*. In: A. J. Copen & A. Walk (Eds.), *Recent developments in Schizophrenia: A symposium*. London: R.M.P.A. 1967. p.133–158.
  27. Lowe, L. H. *Families of children with early childhood schizophrenia*. *Archives of General Psychiatry*. 1966;14:26–30.
  28. Folstein, S., & Rutter, M. *Infantile autism: A genetic study of 21 twin pairs*. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1977;18(4), 297–321.
  29. Spence, M. A. *Genetic studies*. In: E. Ritvo (Ed.), *Autism: Diagnosis, current research and management*. New York: Halstead/Wiley; 1976. p.169–174.
  30. Rutter, M. *Concepts of autism: A review of research*. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1968;9:1–25.

31. American Psychiatric Association. Committee on nomenclature and statistics. In: Diagnostic and statistical manual of mental disorders (2nd ed.). Washington, DC: American Psychiatric Press. 1968.
32. Mayes, R., & Horowitz, A. V. DSM-III and the revolution in the classification of mental illness. *Journal of the History of the Behavioral Sciences*. 2005;41:249–267.
33. Volkmar, F. R., & Cohen, D. J. Debate and argument: The utility of the term pervasive developmental disorder. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1991; 32:1171–1172.
34. Asperger, H. Die autistischen psychopathen im kindersalter. *Archive fur psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1944;117:76–136.
35. Wing, L., & Gould, J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: Epidemiology and classification. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 1979;9(1):11–29.
36. Wing, L. Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychological Bulletin*. 1981;11:115–129.
37. Tsai, L., Stewart, M. A., & August, G. Implication of sex differences in the familial transmission of infantile autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 1981;11:165–173.
38. Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*. 1999;23:185–188.
39. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., TR). Washington, DC: American Psychiatric Association. 2000.
40. Heller, T. Dementia infantilis. *Zeitschrift fur die Erforschung und Behandlung des Jugenlichen Schuachsinnns*. 1908;3:141–165.
41. Fombonne E. Is there an epidemic of autism? *Pediatrics*. 2001;107:411–2.
42. Arvidsson T, Danielsson B, Forsberg P, Gillberg C, Johansson M, Kjellgren G. Autism in 3-6-year-old children in a suburb of Goteborg, Sweden. *Autism*. 1997;1:163–73.

43. Baird G, Charman T, Baron-Cohen S, Cox A, Swettenham J, Wheelwright S, Drew A. A screening instrument for autism at 18 months of age: a 6-year follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000;39:694–702.
44. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network; Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*. 2009;58:1–20.
45. Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA*. 2001;285:3093–9.
46. Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry*. 2005;162:1133–41.
47. Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA, Boyle CA, Perrin JM, Ghandour RM, Singh GK, Strickland BB, Trevathan E, van Dyck PC. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics*. 2009;124:1395–403.
48. Fombonne E, Zakarian R, Bennett A, Meng L, McLean-Heywood D. Pervasive developmental disorders in Montreal, Quebec, Canada: prevalence and links with immunizations. *Pediatrics*. 2006;118:e139–e150.
49. Hertz-Picciotto I, Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology*. 2009;20:84–90.
50. Nordin V, Gillberg C. The long-term course of autistic disorders: update on follow-up studies. *Acta Psychiatr Scand*. 1998;97(2):99–108.
51. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 2003;160:636–45.
52. Lord C, McGee JP. Committee on Educational Interventions for Children with Autism, National Research Council. *Educating Children with Autism*. 2001. Washington, DC: The National Academies Press. [www.nap.edu](http://www.nap.edu). [10/04/2012].

53. Chawarska K, Bearss K. Assessment of cognitive and adaptive skills. In: Chawarska K, Klin A, Volkmar FR, eds. *Autism Spectrum Disorders in Infants and Toddlers: Diagnosis, Assessment, and Treatment*. New York/London: The Guildford Press; 2008.
54. Stevens MC, Fein DA, Dunn M, Allen D, Waterhouse LH, Feinstein C, Rapin I. Subgroups of children with autism by cluster analysis: a longitudinal examination. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000;39:346–52.
55. Klin A, Pauls D, Schultz R, Volkmar F. Three diagnostic approaches to Asperger syndrome: implications for research. *J Autism Dev Disord*. 2005a;35:221–34.
56. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*. 2002;1:352–8.
57. Hara H. Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. *Brain Dev*. 2007;29:486–90.
58. Miles JH, Hillman RE. Value of a clinical morphology examination in autism. *Am J Med Genet*. 2000;91:245–53.
59. Boddaert N, Zilbovicius M, Philippe A, Robel L, Bourgeois M, Barthelemy C, Seidenwurm D, Meresse I, Laurier L, Desguerre I, Bahi-Buisson N, Brunelle F, Munnich A, Samson Y, Mouren MC, Chabane N. MRI findings in 77 children with non-syndromic autistic disorder. *PLoS ONE*. 2009;4:e4415.
60. Stoelb M, Yarnal R, Miles JH, Takahashi TN, Farmer J, McCathren R. Predicting responsiveness to treatment of children with autism: a retrospective study of the importance of physical dysmorphology. In: *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities*. foa.sagepub.com. [10/04/12].
61. Miles JH, Takahashi TN, Hong J, Munden N, Flournoy N, Braddock SR, Martin RA, Bocian ME, Spence MA, Hillman RE, Farmer JE. Development and validation of a measure of dysmorphology: useful for autism subgroup classification. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:1101–16.
62. Fombonne E, Roge B, Claverie J, Courty S, Fremolle J. Microcephaly and macrocephaly in autism. *J Autism Dev Disord*. 1999;29:113–9.
63. Miles JH, Hadden L, Takahashi TN, Hillman RE. Head circumference is an independent clinical finding associated with autism. *Am J Med Genet*. 2000;95:339–50.



64. Lainhart JE, Bigler ED, Bocian M, Coon H, Dinh E, Dawson G, Deutsch CK, Dunn M, Estes A, Tager-Flusberg H, Folstein S, Hepburn S, Hyman S, McMahon W, Minshew N, Munson J, Osann K, Ozonoff S, Rodier P, Rogers S, Sigman M, Spence MA, Stodgell CJ, Volkmar F. Head circumference and height in autism: a study by the Collaborative Program of Excellence in Autism. *Am J Med Genet A*. 2006;140:2257–74.
65. Frith U. 'Autistic psychopathy' in childhood. In: Frith U, ed. *Autism and Asperger Syndrome*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1991:37–92.
66. Klin A, Saulnier CA, Tsatsanis K, Volkmar FR. Clinical evaluation in autism spectrum disorders: Psychological assessment within a transdisciplinary framework. In: Volkmar FR, Paul R, Klin A, Cohen DJ, eds. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders. Vol 2: Assessment, Interventions, and Policy*. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2005b.p.772-798.
67. Ehlers S, Gillberg C, Wing L. A screening questionnaire for Asperger syndrome and other high-functioning autism spectrum disorders in school age children. *J Autism Dev Disord*. 1999;29:129–41.
68. Gillberg C, Gillberg C, Rastam M, Wentz E. The Asperger syndrome (and high-functioning autism) Diagnostic Interview (ASDI): a preliminary study of a new structured clinical interview. *Autism*. 2001;5:57–66.
69. Garnett MS, Atwood A. The Australian scale for Asperger's Syndrome. *Asperger's Syndrome: A Guide for Parents and Professionals*. London: Jessica Kingsley Publishers; 1997.
70. Scott FJ, Baron-Cohen S, Bolton P, Brayne C. The CAST (Childhood Asperger Syndrome Test): preliminary development of a UK screen for mainstream primary-school-age children. *Autism*. 2002;6:9–31.
71. Attwood T. *Asperger's Diagnostic Assessment*. Video recording. 2004. Arlington, TX: Future Horizons.
72. Pickles A, Starr E, Kazak S, Bolton P, Papanikolaou K, Bailey A, Goodman R, Rutter M. Variable expression of the autism broader phenotype: findings from extended pedigrees. *J Child Psychol Psychiatry*. 2000;41:491–502.

73. Filipek PA, Accardo PJ, Ashwal S, Baranek GT, Cook EH, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin SW, Tuchman RF, Volkmar FR. Practice parameter: screening and diagnosis of autism: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. *Neurology*.2000;55:468–79.
74. Schopler E, Reichler RJ, Renner BR. The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism. New York: Irvington Publishers; 1986.
75. Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ. The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am J Ment Defic*.1985;89:485–91.
76. Gilliam JE. Gilliam Autism Rating Scale (GARS). Austin, Texas: PRO-ED, Inc; 1995.
77. Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, Schopler E. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord*.1989;19:185–212.
78. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*.1994;24:659–85.
79. Robins DL, Fein D, Barton ML, Green JA. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*.2001;31:131–44.
80. Kleinman JM, Robins DL, Ventola PE, Pandey J, Boorstein HC, Esser EL, Wilson LB, Rosenthal MA, Sutera S, Verbalis AD, Barton M, Hodgson S, Green J, Dumont-Mathieu T, Volkmar F, Chawarska K, Klin A, Fein D. The modified checklist for autism in toddlers: a follow-up study investigating the early detection of autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*.2008;38:827–39.

81. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol Dis.* 2010;38(2):181–91.
82. Kent L, Evans J, Paul M, Sharp M. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 1999;41:153–8.
83. Skuse DH. Imprinting, the X-chromosome, and the male brain: explaining sex differences in the liability to autism. *Pediatr Res.* 2000;47:9–16.
84. Gillberg C. Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord.* 1998;28:415–25.
85. Jha P, Sheth D, Ghaziuddin M. Autism spectrum disorder and Klinefelter syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007;16:305–8.
86. Shinawi M, Patel A, Panichkul P, Zascavage R, Peters SU, Scaglia F. The Xp contiguous deletion syndrome and autism. *Am J Med Genet A.* 2009a;149A:1138–48.
87. Lukusa T, Vermeesch JR, Holvoet M, Fryns JP, Devriendt K. Deletion 2q37.3 and autism: molecular cytogenetic mapping of the candidate region for autistic disorder. *Genet Couns.* 2004;15:293–301.
88. 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, Bourgeron T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007;39:25–7.
89. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colinaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003;34:27–9.
90. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP, Imielinski M, Frackelton EC, Reichert J, Crawford EL, Munson J, Sleiman PM, Chiavacci R, Annaiah K, Thomas K, Hou C, Glaberson W, Flory J, Otieno F, Garris M, Soorya L, Klei L, Piven J, Meyer KJ, Anagnostou E, Sakurai T, Game RM, Rudd DS, Zurawiecki D,

- McDougle CJ, Davis LK, Miller J, Posey DJ, Michaels S, Kolevzon A, Silverman JM, Bernier R, Levy SE, Schultz RT, Dawson G, Owley T, McMahon WM, Wassink TH, Sweeney JA, Nurnberger JI, Coon H, Sutcliffe JS, Minshew NJ, Grant SF, Bucan M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Schellenberg GD, Hakonarson H. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*.2009;459:569–73.
91. Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham B, Pursley A, Clark G, Lee J, Proud M, Stocco A, Rodriguez D, Kozel B, Sparagana S, Roeder E, McGrew S, Kurczynski T, Allison L, Amato S, Savage S, Patel A, Stankiewicz P, Beaudet A, Cheung SW, Lupski JR. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet*.2010;47:332–41.
92. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R, Broomer A, Casuga I, Wang Y, Xiao C, Barbacioru C, Gimelli G, Bernardina BD, Torniero C, Giorda R, Regan R, Murday V, Mansour S, Fichera M, Castiglia L, Failla P, Ventura M, Jiang Z, Cooper GM, Knight SJ, Romano C, Zuffardi O, Chen C, Schwartz CE, Eichler EE. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*.2008;40:322–8.
93. Ben Shachar S, Lanpher B, German JR, Qasaymeh M, Potocki L, Nagamani SC, Franco LM, Malphrus A, Bottenfield GW, Spence JE, Amato S, Rousseau JA, Moghaddam B, Skinner C, Skinner SA, Bernes S, Armstrong N, Shinawi M, Stankiewicz P, Patel A, Cheung SW, Lupski JR, Beaudet AL, Sahoo T. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders *J Med Genet*.2009;46:382–8.
94. Shinawi M, Schaaf CP, Bhatt SS, Xia Z, Patel A, Cheung SW, Lanpher B, Nagl S, Herding HS, Nevinny-Stickel C, Immken LL, Patel GS, German JR, Beaudet AL, Stankiewicz P. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*.2009b;41:1269–71.

95. Loesch DZ, Bui QM, Dissanayake C, Clifford S, Gould E, Bulhak-Paterson D, Tassone F, Taylor AK, Hessler D, Hagerman R, Huggins RM. Molecular and cognitive predictors of the continuum of autistic behaviours in fragile X. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31:315–26.
96. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet.* 2005;42:318–21.
97. Buxbaum JD, Cai G, Chaste P, Nygren G, Goldsmith J, Reichert J, Anckarsater H, Rastam M, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Leboyer M, Gillberg C, Verloes A, Betancur C. Mutation screening of the PTEN gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007a;144B:484–91.
98. Varga EA, Pastore M, Prior T, Herman GE, McBride KL. The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly. *Genet Med.* 2009;11:111–7.
99. Buxbaum JD, Cai G, Nygren G, Chaste P, Delorme R, Goldsmith J, Rastam M, Silverman JM, Hollander E, Gillberg C, Leboyer M, Betancur C. Mutation analysis of the NSD1 gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *BMC Med Genet.* 2007b;8:68.
100. Young DJ, Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Ellaway C, Kulkarni A, de Klerk N, Kaufmann WE, Leonard H. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr.* 2008;167:661–9.
101. Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet.* 2009;46:1–8.
102. Fombonne E, Du M, Cans C, Grandjean H. Autism and associated medical disorders in a French epidemiological survey. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1997b;36:1561–9.
103. Bolton PF. Neuroepileptic correlates of autistic symptomatology in tuberous sclerosis. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:126–31.

104. Battaglia A, Carey JC. Etiologic yield of autistic spectrum disorders: a prospective study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006;142C:3–7.
105. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 2004;119:19–31.
106. Alvarez Retuerto AI, Cantor RM, Gleeson JG, Ustaszewska A, Schackwitz WS, Pennacchio LA, Geschwind DH. Association of common variants in the Joubert syndrome gene (AHI1) with autism. *Hum Mol Genet.* 2008;17:3887–96.
107. Ozonoff S, Williams BJ, Gale S, Miller JN. Autism and autistic behavior in Joubert syndrome. *J Child Neurol.* 1999;14:636–41.
108. Howlin P, Karpf J, Turk J. Behavioural characteristics and autistic features in individuals with Cohen Syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2005;14:57–64.
109. Naqvi S, Cole T, Graham JM. Cole-Hughes macrocephaly syndrome and associated autistic manifestations. *Am J Med Genet.* 2000;94:149–52.
110. Bonati MT, Russo S, Finelli P, Valsecchi MR, Cogliati F, Cavalleri F, Roberts W, Elia M, Larizza L. Evaluation of autism traits in Angelman syndrome: a resource to unfold autism genes. *Neurogenetics.* 2007;8:169–78.
111. Klein-Tasman BP, Mervis CB, Lord C, Phillips KD. Socio-communicative deficits in young children with Williams syndrome: performance on the Autism Diagnostic Observation Schedule. *Child Neuropsychol.* 2007;13:444–67.
112. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-DeLuca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA, Mason CE, Bilguvar K, Celestino-Soper PB, Choi M, Crawford EL, Davis L, Wright NR, Dhodapkar RM, DiCola M, DiLullo NM, Fernandez TV, Fielding-Singh V, Fishman DO, Frahm S, Garagaloyan R, Goh GS, Kammela S, Klei L, Lowe JK, Lund SC, McGrew AD, Meyer KA, Moffat WJ, Murdoch JD, O’Roak BJ, Ober GT, Pottenger RS, Raubeson MJ, Song Y, Wang Q, Yaspan BL, Yu

- TW, Yurkiewicz IR, Beaudet AL, Cantor RM, Curland M, Grice DE, Günel M, Lifton RP, Mane SM, Martin DM, Shaw CA, Sheldon M, Tischfield JA, Walsh CA, Morrow EM, Ledbetter DH, Fombonne E, Lord C, Martin CL, Brooks AI, Sutcliffe JS, Cook EH Jr, Geschwind D, Roeder K, Devlin B, State MW. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011;70(5):863-85.
113. Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CM, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA, Mendoza-Londono R, Robbins-Furman P, Shaw C, Shi X, Weissenberger G, Withers M, Yatsenko SA, Zackai EH, Stankiewicz P, Lupski JR. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet*. 2007;80:633–49.
114. Gulhan Ercan-Sencicek A, Davis Wright NR, Frost SJ, Fulbright RK, Felsenfeld S, Hart L, Landi N, Einar Mencl W, Sanders SJ, Pugh KR, State MW, Grigorenko EL. Searching for Potocki-Lupski syndrome phenotype: A patient with language impairment and no autism. *Brain Dev*. 2011;34(8):700-3
115. Niklasson L, Rasmussen P, Oskarsdottir S, Gillberg C. Autism, ADHD, mental retardation and behavior problems in 100 individuals with 22q11 deletion syndrome. *Res Dev Disabil*. 2009;30:763–73.
116. Xu S, Han JC, Morales A, Menzie CM, Williams K, Fan YS. Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122:181-7.
117. Wu JY, Kuban KC, Allred E, Shapiro F, Darras BT. Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder. *J Child Neurol*. 2005b;20:790–5.
118. Correia C, Coutinho AM, Diogo L, Grazina M, Marques C, Miguel T, Ataíde A, Almeida J, Borges L, Oliveira C, Oliveira G, Vicente AM. Brief report: High frequency of biochemical markers for mitochondrial dysfunction in

- autism: no association with the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene. *J Autism Dev Disord.* 2006;36:1137–40.
119. Oliveira G, Diogo L, Grazina M, Garcia P, Ataide A, Marques C, Miguel T, Borges L, Vicente AM, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47:185–9.
  120. Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M. Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord.* 2003;33:201–4.
  121. Van den Berghe G, Vincent MF, Jaeken J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1997;20:193–202.
  122. Stathis SL, Cowley DM, Broe D. Autism and adenylosuccinase deficiency. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2000;39:274–5.
  123. Newmeyer A, deGrauw T, Clark J, Chuck G, Salomons G. Screening of male patients with autism spectrum disorder for creatine transporter deficiency. *Neuropediatrics.* 2007;38:310–2.
  124. Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P. Autism and metabolic diseases. *J Child Neurol.* 2008;23:307–14.
  125. Johansson M, Wentz E, Fernell E, Stromland K, Miller MT, Gillberg C. Autistic spectrum disorders in Mobius sequence: a comprehensive study of 25 individuals. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43:338–45.
  126. Cortesi M, Alfei E, Barale F, Fusar-Poli P. Linking autism, regression and Landau-Kleffner syndrome: integrative role of nerve growth factor. *Med Hypotheses.* 2007;68:1178–9.
  127. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology.* 2008;71:1923–4.
  128. Knoester M, Helmerhorst FM, van der Westerlaken LA, Walther FJ, Veen S. Matched follow-up study of 5 8-year-old ICSI singletons: child behaviour,



- parenting stress and child (health-related) quality of life. *Hum Reprod.* 2007;22:3098–107.
129. Connors SL, Crowell DE, Eberhart CG, Copeland J, Newschaffer CJ, Spence SJ, Zimmerman AW. Beta2-adrenergic receptor activation and genetic polymorphisms in autism: data from dizygotic twins. *J Child Neurol.* 2005;20:876–84.
  130. Institute of Medicine. *Immunization Safety Review: Vaccines and Autism.* Washington, DC: The National Academies Press. books.nap.edu. [01/04/2012].
  131. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;20(4):399-407.
  132. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003;73(6):1261-70.
  133. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258(5083):818-21.
  134. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Döhner H, Lundsteen C. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;25(4):410-3.
  135. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001;38(11):740-4.
  136. Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA, Stankiewicz P, Ou Z, Chinault AC, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW, Ward PA. Clinical implementation of

- chromosomal microarray analysis:summary of 2513 postnatal cases.PLoS One.2007;2(3):e327.
137. Shinawi M, Cheung SW.The array CGH and its clinical applications.Drug Discov Today.2008;13(17-18):760-70.
  138. Veltman, J.A. and de Vries, B.B.Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis?J. Mol. Diagn.2006;8:534–537.
  139. Shaikh, T.H.Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies.Genet. Med.2007;9:617–625.
  140. Ou Z, Kang SH, Shaw CA, Carmack CE, White LD, Patel A, Beaudet AL, Cheung SW, Chinault AC.Bacterial artificial chromosome-emulation oligonucleotide arrays for targeted clinical array-comparative genomic hybridization analyses.Genet Med.2008;10(4):278-89.
  141. Carter, N.P.Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays.Nat. Genet.2007;39:S16–21.
  142. Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Pursley A, Li J, Erickson R, Gropman AL, Miller DT, Seashore MR, Summers AM, Stankiewicz P, Chinault AC, Lupski JR, Beaudet AL, Sutton VR.Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics.Am J Med Genet A.2007;143A(15):1679-86.
  143. L. Medne, K. Russell, J. Ming, I.D. Krantz, M. Souders, S. Levy, A. Gupta, N.B. Spinner, E.H. Zackai, J.J.D.Subtelomeric FISH Analysis in 108 Autistic Patients as Adjunct to Chromosome Analysis and Fragile X Testing.Morrisette Program Nr: 847 from 2003 ASHG Annual Meeting.
  144. C.M. Wolpert, S.L. Donnelly, H.L. Abel, S.A. Ravan, H.H. Wright, R.K. Abramson, G.R. DeLong, M.L. Cuccaro, M.A. Pericak-Vance. Clinical Frequency of Chromosomal Abnormalities Observed in a Consecutive Series of Patients with Autistic Disorder. Program Nr: 839 from the 2001 ASHG Annual Meeting.

145. Bhat SS, Ladd S, Grass F, Spence JE, Brasington CK, Simensen RJ, Schwartz CE, Dupont BR, Stevenson RE, Srivastava AK. Disruption of the IL1RAPL1 gene associated with a pericentromeric inversion of the X chromosome in a patient with mental retardation and autism. *Clin Genet*. 2008;73(1):94-6.
146. Aldred MA, Sanford RO, Thomas NS, Barrow MA, Wilson LC, Brueton LA, Bonaglia MC, Hennekam RC, Eng C, Dennis NR, Trembath RC. Molecular analysis of 20 patients with 2q37.3 monosomy: definition of minimum deletion intervals for key phenotypes. *J Med Genet*. 2004;41:433-9.
147. Smith M, Escamilla JR, Filipek P, Bocian ME, Modahl C, Flodman P, Spence MA. Molecular genetic delineation of 2q37.3 deletion in autism and osteodystrophy: report of a case and of new markers for deletion screening by PCR. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;94:15-22.
148. Devillard F, Guinchat V, Moreno-De-Luca D, Tabet AC, Gruchy N, Guillem P, Nguyen Morel MA, Leporrier N, Leboyer M, Jouk PS, Lespinasse J, Betancur C. Paracentric inversion of chromosome 2 associated with cryptic duplication of 2q14 and deletion of 2q37 in a patient with autism. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:2346-54.
149. Felder B, Radlwimmer B, Benner A, Mincheva A, Tödt G, Beyer KS, Schuster C, Bölte S, Schmötzer G, Klauck SM, Poustka F, Lichter P, Poustka A. FARP2, HDLBP and PASK are downregulated in a patient with autism and 2q37.3 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:952-9.
150. Wassink TH, Piven J, Vieland VJ, Jenkins L, Frantz R, Bartlett CW, Goedken R, Childress D, Spence MA, Smith M, Sheffield VC. Evaluation of the chromosome 2q37.3 gene CENTG2 as an autism susceptibility gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;136B:36-44.
151. Nie Z, Stanley KT, Stauffer S, Jacques KM, Hirsch DS, Takei J, Randazzo PA. AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2002;277:48965-75.
152. Falk RE, Casas KA. Chromosome 2q37 deletion: clinical and molecular aspects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C:357-71

153. Bennetto L, Kuschner ES, Hyman SL. Olfaction and taste processing in autism. *Biol Psychiatry*. 2007;62:1015–21.
154. Schecklmann M, Schwenck C, Taurines R, Freitag C, Warnke A, Gerlach M, Romanos M. A systematic review on olfaction in child and adolescent psychiatric disorders. *J Neural Transm*. 2012 Jul 19.
155. Brang D, Ramachandran VS. Olfactory bulb dysgenesis, mirror neuron system dysfunction, and autonomic dysregulation as the neural basis for autism. *Med Hypotheses*. 2010;74(5):919-21.
156. Allen-Brady K, Robison R, Cannon D, Varvil T, Villalobos M, Pingree C, Leppert MF, Miller J, McMahon WM, Coon H. Genome-wide linkage in Utah autism pedigrees. *Mol Psychiatry*. 2010;15(10):1006-15.
157. Meyer KJ, Axelsen MS, Sheffield VC, Patil SR, Wassink TH. Germline mosaic transmission of a novel duplication of PXDN and MYT1L to two male half-siblings with autism. *Psychiatr Genet*. 2012;22(3):137-40.
158. Schaaf CP, Boone PM, Sampath S, Williams C, Bader PI, Mueller JM, Shchelochkov OA, Brown CW, Crawford HP, Phalen JA, Tartaglia NR, Evans P, Campbell WM, Chun-Hui Tsai A, Parsley L, Grayson SW, Scheuerle A, Luzzi CD, Thomas SK, Eng PA, Kang SH, Patel A, Stankiewicz P, Cheung SW. Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. *Eur J Hum Genet*. 2012 May 23.
159. Liu Y, Hu Z, Xun G, Peng Y, Lu L, Xu X, Xiong Z, Xia L, Liu D, Li W, Zhao J, Xia K. Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort. *J Psychiatr Res*. 2012 May;46(5):630-4.
160. Marshall CR, Scherer SW. Detection and characterization of copy number variation in autism spectrum disorder. *Methods Mol Biol*. 2012;838:115-35.
161. Fernandez, T., Morgan, T., Davis, N., Klin, A., Morris, A., Farhi, A., Lifton, R. P., State, M. W. Disruption of contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 2004;74: 1286-1293.
162. Ramalingam A, Zhou XG, Fiedler SD, Brawner SJ, Joyce JM, Liu HY, Yu S. 16p13.11 duplication is a risk factor for a wide spectrum of neuropsychiatric disorders. *J Hum Genet*. 2011;56(7):541-4.

163. Dixit A, Patel C, Harrison R, Jarvis J, Hulton S, Smith N, Yates K, Silcock L, McMullan DJ, Suri M. 17q12 microdeletion syndrome: Three patients illustrating the phenotypic spectrum. *Am J Med Genet A*. 2012 Aug 6.
164. Brandt T, Desai K, Grodberg D, Mehta L, Cohen N, Tryfon A, Kolevzon A, Soorya L, Buxbaum JD, Edelman L. Complex autism spectrum disorder in a patient with a 17q12 microduplication. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(5):1170-7.
165. Weiss LA, Arking DE; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 2009;461(7265):802-8.
166. Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2004 May;9(5):474-84.
167. Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmerman RA, Diccico-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet*. 2005 Nov;77(5):851-68.

