

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

OTİZM BULGUSU GÖSTEREN
BİREYLERDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN
MLPA YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI

Dr. Fatih Mehmet CELAYİR

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2012

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**OTİZM BULGUSU GÖSTEREN
BİREYLERDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN
MLPA YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI**

Dr. Fatih Mehmet CELAYİR

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Sevilhan ARTAN**

**ESKİŞEHİR
2012**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

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

Tarih: / / 2012

Jüri Başkanı Prof.Dr. Sevilhan ARTAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye Doç.Dr. Coşkun YARAR
Çocuk Sağ. ve Hast. AD Çocuk Nör. BD

Üye Yard.Doç.Dr. S.Tülin FİDAN
Çocuk ve Ergen Ruh Sağ. ve Hast. AD

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

Prof.Dr. Bekir YAŞAR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın 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, Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR'e; bölümde birlikte çalıştığım asistan doktor arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Zafer YÜKSEL'e, Araş. Gör. Dr. Abdullah İhsan GÜRLER'e, çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Halime KÜÇÜK'e, Uzm. Bio. Ebru ERZURUMLUOĞLU'na, olguların değerlendirilmesi ve yönlendirilmesinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. S. Tülin FİDAN'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Celayir, F.M. Otizm bulgusu gösteren bireylerdeki genetik değişikliklerin MLPA yöntemi ile ortaya konması. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir,2012. Otizm; yaşamın ilk dönemlerinde başlayan, sosyal ilişkide ve etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde gerilik, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize, etkileri yaşam boyu devam eden “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar” (YGB) kapsamında değerlendirilen nörogelişimsel bir bozukluktur. Son yıllarda tüm genom bağlantı ve asosiasyon çalışmaları, Y kromozomu haricinde tüm kromozomlarda lokalize 175 kadar lokusun YGB etyolojisinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Olguların % 1-3 kadarında kromozom 15q11-q13 duplikasyonu, % 1 kadarında da kromozom 16p11.2 ve 22q13 delesyonları gözlenmektedir. Bu bölgelerde lokalize UBE3A, GABRA5 ve GABRB3 (kromozom 15q11-q13) ve SHANK3 (kromozom 22q13) genleri YGB ile ilişkisi ortaya konan genler arasındadır. Çalışmamızda Eskişehir bölgesinde YGB tanısı alan, kromozom ve FMR1 geni analizleri yapılan toplam 80 olguda 15q11’de lokalize UBE3A, 15q12’de lokalize GABRB3 ve CHRNA7’yi içeren 15q13 mikrodelsiyon bölgesi ile 16p11 mikrodelsiyon bölgesi ve 22q13’te bulunan SHANK3 geni mutasyonlarının MLPA yöntemi ile incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda SALSA MLPA P339-A1 (lot1209) ve P343-C1 AUTİSM-1 (lot0310) prob kitleri kullanılmıştır. Olgulardan sadece bir tanesinde 16p11.2 delesyonu saptanmış olup görülme sıklığı literatür ile uyumlu olarak (%1,25) değerlendirilmiştir. Olgumuzda konuşma geriliği, YGB ve belirgin kulak lobları fenotipi mevcuttur. Çalışmamızda; MLPA yöntemi ile YGB olgularının ilgili mutasyonlar açısından taranabileceği, YGB olgularında etkin bir genetik danışma için taramaların gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar, Otizm, Delesyon, Duplikasyon, MLPA

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

ABSTRACT

Celayir, F.M. Investigating genetic variations in individuals showing autistic features using MLPA method. Eskisehir Osmangazi University, Medicine Faculty, Medical Genetics Department, Medical Specialty Thesis, Eskisehir, 2012. Autism; starting at the first stages of life, is characterized by impaired social interactions and communications, backwardness of verbal and non verbal communications, repetitive and stereotyped behaviors. Effects throughout life within “pervasive developmental disorder” (PDD) assessed in the context of neurodevelopmental disorder. In recent years, genome linkage and association studies showed up to 175 locus that may play PDD etiology localized to all chromosomes except the y chromosome. Up to %1-3 chromosome 15q11-q13 duplication, up to %1 chromosome 16p11.2 ve 22q13 deletion of cases had been observed. Regions in UBE3A, GABRA5 and GABRB3 (chromosome 15q11-q13) and SHANK3 (chromosome 22q13) genes are among the genes related to PDD. The diagnosis of PDD in Eskişehir area total of 80 cases microdeletion regions were localised 15q11 in UBE3A, 15q12 in GABRB3, 15q13 in CHRNA7, microdeletion in region of 16p11, mutation in the SHANK3 gene located in 22q13 was targeted to investigate by the method of MLPA. For this purpose, SALSA MLPA P339-A1 (lot1209) and P343-C1 Autism-1 (lot0310) probe kits were used. According to the incidence of literature (1.25%) 16p11.2 deletion was detected only in one of the cases. In our case there are delayed speech, PDD and prominent ear lobes phenotype. Result of our study mutations of PDD cases can be scanned by MLPA method and its importance in the effective genetic screening of PDD cases was concluded.

Key Words: Pervasive Developmental Disorders, Autism, Deletion, Duplication, MLPA

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	4
2.1. Tanım	4
2.2. Tarihçe ve Sınıflandırma	4
2.3. Epidemiyoloji	6
2.4. Klinik Özellikler	7
2.4.1. Başlangıç Yaşı ve Tanı	7
2.4.2. Sosyal Etkileşim	10
2.4.3. İletişim	10
2.4.4. Davranış Anormallikleri	11
2.5. Eşlik Eden Diğer Bozukluklar	12
2.6. Tanı ve Tarama Araçları	12
2.7. Etyoloji	13
2.7.1. YGB’de Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler	14
2.7.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri	17
2.7.3. Otizm ile İlişkilendirilen Hastalıklar ve Tek Gen Hastalıkları	17
2.7.4. Metabolik Durumlar	24
2.7.5. Çevresel, Ailesel ve Diğer Etkenler	26
2.8. Otizm ve Genetik Analizler	27
2.9. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi	28

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Kullanılan Aletler	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	31
3.1.3. SALSA MLPA P339-A1 (lot1209) ve P343-C1 AUTİSM-1 (lot0310) Prob Kitleri	32
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Hasta Gurubu	35
3.2.2. Qiagen® Ekstraksiyon Kiti ile Periferik Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	35
3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi	37
4. BULGULAR	43
4.1. Araştırma Grubu Olgularının Demografik Özellikleri	43
4.2. Araştırma Grubu Olgularının Klinik ve Sitogenetik Özellikleri	43
4.3. Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları	46
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	Otizm Davranış Kontrol Listesi
aCGH	Array Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu
ADI-R	Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş
ADOS	Otizm Tanısal Gözlem Çizelgesi
AEİ	Antiepileptik ilaçlar
AGAT	L-arjinin:glisin amidinotransferaz
AOB	Atipik otistik bozukluk
AS	Asperger Sendromu
bç	Baz çifti
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BSE	Davranış Değerlendirme Ölçeği
BTA-YGB	Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk
CARS	Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği
ÇDB	Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu
DB	Dezintegratif bozukluk
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DSM-IV-TR	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. Baskı düzeltilmiş metni
EEG	Elektroensefalografi
FAM	N- (3- fluoranthyl) maleimide
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FKÜ	Fenilketonüri
GABA	Gama Amino Butirik Asit
GAMT	Guanidino Asetat Metil Transferaz
GARS	Gilliam Otizm Skorum Ölçeği
ICD-10	Hastalıkların ve İlgili Sağlık Sorunlarının Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması 10. Versiyonu
IVIG	İntravenöz immün globülin
KES	Kreatin Eksikliği Sendromları

KKK	Kızamık-kabakulak-kızamıkçık
KSD	Kopya Sayısı Değişiklikleri
M-CHAT	Yürüme Çağındaki Çocuklarda Otizm Kontrol Listesi
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
nAChRs	Nikotinik asetilkolin reseptörleri
NF1	Nörofibromatozis tip 1
OB	Otistik bozukluk
OSB	Otistik spektrum bozuklukları
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RS	Rett Sendromu
SLOS	Smith-Lemli-Opitz Sendromu
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TRH	Tiroid salıverici hormon
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
TSK	Tüberoz Sklerozis Kompleksi
UPD	Uniparental dizomi
WAGR	Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon
YGB	Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
YÜT	Yardımcı üreme tekniklerinin
ZB	Zeka Bölümü

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. MAPK3, MAZ ve DOC2A genlerinin 16. kromozom üzerindeki Lokalizasyonu	16
2.2. SHANK3 geninin 22. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	18
2.3. UBE3A geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	19
2.4. GABRB3 geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	19
2.5. CHRNA7 geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	20
2.6. MLPA yönteminin diğer yöntemlerle karşılaştırması	28
2.7. MLPA yönteminin bütüncül görünümü	30
3.1. MLPA probunun hedef diziye hibridizasyonu	37
3.2. Probun iki parçası ligaz tarafından birleştirilmesi	38
3.3. Prob amplifikasyon ürünleri	39
4.1. Örnek analiz pik görüntüsü	47
4.2. Kontrollere ait MLPA Salsa P339-A1 pik görüntüleri	48
4.3. Kontrollere ait MLPA Salsa P343-C1 pik görüntüleri	48
4.4. Normal bir bireye ait MLPA Salsa P339-A1 pik görüntüleri	49
4.5. Normal bir bireye ait MLPA Salsa P343-C1 pik görüntüleri	49
4.6. 16p11.2 mikrolelesyon bölgesinde delesyon saptanan hastaya ait MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi	52

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri (APA 1994)	8
2.2. Salsa MLPA P339-A1 SHANK3 Prob Kiti Bölgeleri	33
2.3. Salsa MLPA P343-C1 Prob Kiti Bölgeleri	34
4.1. Olguların cinsiyet dağılımı	43
4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom ve MLPA analizi sonuçları ve DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları	44
4.3. Normal bir olguya ait P343-C1 Prob piklerinin analiz görüntüsü	50
4.4. Normal bir olguya ait P339-A1 Prob piklerinin analiz görüntüsü	51
4.5. 16p11.2 mikrolelesyon bölgesine ait saptanan delesyonun Ezersoftware programında değerlendirme sonuçları	53

1. GİRİŞ

Otizm, Leo Kanner tarafından 1943 yılında “bebeklik otizmi” olarak tanımlanmıştır. Otizmi doğumsal olarak tanımlayan Kanner; ciddi derecede iletişim sorunları, konuşmanın gecikmesi, sığ duygulanım durumu, zayıf göz teması, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışları kapsayan bir klinik görünümü ortaya koymuştur. Kanner ayrıca olgu sayısı az olmasına rağmen görülme sıklığının daha fazla olduğunu belirtmiştir. Günümüzde otizm; yaşamın ilk dönemlerinde başlayan, sosyal ilişkide ve etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde gerilik, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize, etkileri yaşam boyu devam eden “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar” (YGB) kapsamında değerlendirilen nörogelişimsel bir bozukluktur (1, 2).

Otizimde mevcut bulgular bireyler arasında farklı şiddette etkilere neden olabilmektedir. Bu farklılık bireyin sosyal durumuna, gelişim seviyesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Sosyal etkileşimdeki yetersizlik daha sık göze çarpmaktadır. İletişimi başlatmada problem yaşamadan, hiç iletişim kurmak istememe ve ortamdan kaçmaya kadar geniş yelpazede davranış kalıbıyla karşılaşılabilmektedir. İletişim bozukluğu bebeklik döneminde başlayıp 5 yaş civarında belirgin hale gelmektedir. Yapılan çalışmalarda otizmlili bireylerin %50’sinden fazlasında zeka ile ilgili problemlerden bahsedilmektedir. Zeka düzeyindeki düşüklük arttıkça YGB kapsamındaki davranışların da artışı beraberinde gelmektedir. Otizmde bazı bireylerin daha erken okuması gibi zeka düzeyinden bağımsız olarak genel entellektüel durumda farklılıklar mevcuttur (3, 4).

Otizm tanısı koyabilmek için belirli semptomlar olsa da değişik tarama araçları ve Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı 4. baskı düzeltilmiş metni (DSM-IV-TR) veya Hastalıkların ve İlgili Sağlık Sorunlarının Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması 10. versiyonu (ICD-10) ölçütleri rehber olarak kullanılmalıdır. Otizmde tanı nedene veya işleyiş durumuna göre değil davranışa göre konmaktadır. YGB’de doğru tanının konması klinik seyir ve prognoz açısından çok önemlidir. Klinik tablo hastalar arasında farklılık gösterse de üç yaşından önce belirtiler ortaya çıkar ve tanı konur (4, 5).

Otizmin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Kanner otizmi tanımladıktan sonra YGB'nin etyolojisine dair çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Kanner otizmi başlangıçta doğuştan gelen bir bozukluk olarak ele almıştır. Son dönemlerde ise etyolojide genetik faktörlerin yanında biyolojik, psikolojik, sosyal faktörler öne çıkmaya başlamıştır (6). Otizmde epileptik bozukluklara, zeka geriliğine ve diğer tıbbi durumlara sık rastlanması; genetik etyolojiye yönelik çalışmaların umut verici şekilde ilerlemesi biyolojik faktörlerin etken olduğu bir bozukluk olma ihtimalini daha da güçlendirmiştir (7, 8, 9). Kalıtsal değişikliklerdeki karmaşık ve henüz belirlenememiş küçük etkileşimler de muhtemel nedenler arasındadır. İkiz ve aile çalışmaları otizm genetiğini aydınlatmada yol gösterici olmuş, otizmde kalıtımın %90'dan fazla olabileceğinden bahsedilmiştir (10). Otizmlili bireylerin % 20'sinde genetik neden ortaya konabilmektedir. Çok az bir kısmında teratojenik etkenler suçlanırken vakaların çoğunda etyolojik altyapı aydınlatılamamaktadır. Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde kromozom anöploidilerini ortaya koymaktadır. Kromozom anomalilerinin %3-5'lik kısmı ise Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) teknikleri kullanılarak tayin edilebilmektedir. Otizmde hemen her kromozomda anomali bulunmasına rağmen, bunlardan sadece bir kaçının otizm genleri için muhtemel lokusları içerdiği düşünülmektedir (11, 12). Aday genleri belirlemek amacıyla Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ve diğer bazı yöntemlerle çalışmalar devam etmektedir.

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğine başvuran, DSM-IV kriterlerine göre değerlendirilerek YGB tanısı alan, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda kromozom analizi ve FMR1 geni taramaları yapılan 80 olguda YGB'de aday genleri içeren bölgeler olarak tanımlanan 15q11'de lokalize UBE3A, 15q12'de lokalize GABRB3 ve CHRNA7'yi içeren 15q13 mikrodelsiyon bölgesi ile 16p11 mikrodelsiyon bölgesi ve 22q13'te lokalize SHANK3 geni mutasyonlarının Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile analizi hedeflenmiştir. Çalışmamızda Eskişehir bölgesinde tanı alan YGB olgu sıklığının belirlenmesi, yöntemin avantaj-dezavantajları ile tanısall amaçlı kullanılabilirliğinin ortaya konması, elde edilen moleküler veriler ile klinik özellikler arasındaki

bağlantının değerlendirilmesi ve moleküler etyolojisi belirlenmiş olan olgu ve ailelere hastalık ve mutasyon ile ilgili genetik danışmanın verilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Otizm; yaşamın ilk dönemlerinde başlayan, sosyal ilişki ve etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde gerilik, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize, etkileri yaşam boyu devam eden YGB kapsamında değerlendirilen nörogelişimsel bir bozukluktur. YGB’de klinik şiddet bireyler arasında değişkendir ve hafiften ağıra kadar otizm bulguları ile karşılaşılabılır. YGB başlığı altındaki tüm bozukluklar karmaşık bir nörolojik gelişim yapısına sahiptir (1, 2 ,3 ,4).

2.2. Tarihçe ve Sınıflandırma

Küçük çocuklarda görülen gelişim basamaklarındaki bozulmayla ilgili olarak 19. yüzyıla kadar çok az sayıda bilimsel yayın yapılmıştır. O dönemden sonra çocuklukta başlayan psikiyatrik bozuklukları ifade eden bazı kavramlar öne sürülmüştür. Otizm terimini ilk olarak Bleuler 1911’de kullanmış, otizmi; gerçekte bağın kopması ve iletişimde yaşanan ciddi zorluklar olarak ifade etmiştir (5, 6). 1933’te Potter tarafından çocuklukta ortaya çıkan şizofreni ölçütleri ortaya atılmıştır. Heller’in daha önce tanımladığı “Dementia infantilis” daha sonra DSM-IV’te “Dezintegratif bozukluk (DB)” olarak yerini almıştır. 1943’te Leo Kanner tarafından ilk kez 11 olguluk bir seri tanımlanmış ve “bebeklik otizmi” olarak adlandırılmıştır (7,8). Olgu sayısı az olmasına rağmen görülme sıklığının daha fazla olduğunu belirtmiştir. Otizmi doğumsal olarak tanımlayan Kanner; ciddi derecede iletişim sorunları, konuşmanın gecikmesi, sığ duygulanım durumu, zayıf göz teması, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışları kapsayan bir klinik görünümü ortaya koymuştur (9,10). Kanner otizmin anne-babanın çocuğa iyi bir yaşam sunamamasından kaynaklandığını düşünmekteydi. Fakat zamanla otizmde birçok faktörün rol oynadığı anlaşılmıştır. Kanner ayrıca otizmin şizofreni ve zeka geriliği ile sıklıkla karıştırıldığını ifade etmiştir. Kanner’in tanımladığı birçok özellik günümüzde geçerliliğini korumaktadır (11,12).

1944’te Asperger tarafından Kanner’in tanımladığı sendroma benzer davranışlara sahip bir gurupla ilgili olarak “otistik psikopati” ifadesi kullanılmıştır.

Kanner'den farklı olarak bu makalede sosyal etkileşimi bozuk olan fakat normal zeka düzeyine sahip bireyler tanımlanmıştır (13, 14). 1947'de Bender "çocukluk şizofrenisi" kavramını kullanmış, Kanner'in tarif ettiği belirtilerin hiçbir hastalığı tanımlamadığını, bunların erken şizofreni belirtisi ya da organik bir bileşenin parçası olabileceğini ifade etmiştir (15,16). 1955'te Rank "atipik çocuk " kavramını kullanmış ve daha sonraki yıllarda otizm ve nedenleri ile ilgili kavram karmaşıklığı iyice belirginleşmiştir. Özellikle otistik bozukluk (OB) ve çocukluk şizofrenisi arasında tanısal ve terminolojik belirsizlik yeni bir sınıflandırma ihtiyacını doğurmuştur (17, 18).

Rutter 1978'de otistik bozukluğu tanımlayan bir sınıflamadan bahsetmiştir. Bu sınıflamada özellikle hastalık başlangıcının 30 aydan önce olması şartından bahsedilmektedir. Yetişkin psikiyatrisinde sınıflandırmada kullanılan DSM ve ICD sistemi çocuklar için de kullanılmaktadır. Fakat çocuklar için DSM-I'de (APA 1952) ve ICD-9'da (1978) ayrı bir yer verilmemiştir. Çocuk ve ergen psikiyatrik bozuklukları ile ilgili ilk ayrı kategorilendirme DSM II'de (APA 1968) yapılmıştır. Otizm ilk defa 1980 yılında DSM-III'te, yeni tanımlanmış bozukluk kümesi olan, YGB başlığı altında yer almıştır. 1987 yılında, DSM-III-R'de, YGB başlığının altındaki alt başlıklar, OB ve "Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk (BTA-YGB)" şeklinde olmuştur. 1994 (DSM-IV)'te bu alt başlıklara, "Rett Sendromu (RS)", "Çocukluğun Dezintegratif Bozukluğu (ÇDB)" ve "Asperger Sendromu (AS)" da dahil edilmiştir. Otistik bozukluk DSM-IV ve ICD-10'da YGB ana başlığında sınıflandırılmış ve iki kılavuzda da benzer biçimde tanımlanmıştır (19). YGB, altında temelde birbirine benzeyen otizm ile ilişkili değişik bozuklukları barındıran bir kavramdır. Uygulama alanında YGB yerine "otistik spektrum bozuklukları (OSB)" terimi de kullanılmaktadır (18).

Amerikan Psikiyatri Birliğinin sınıflandırmada son şeklini verdiği DSM-IV (APA 1994), ICD-10 ile oldukça benzerlik göstermektedir. Bu tanı sınıflandırmasına göre YGB;

1. Otistik bozukluk
2. Rett sendromu
3. Çocukluğun dezintegratif bozukluğu

4. Asperger sendromu
5. Başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk

alt başlıklarına ayrılmaktadır (20).

2.3. Epidemiyoloji

Otizm ile ilgili yapılan çalışmalarda gittikçe artan prevalans oranlarından bahsedilmektedir. Bu artışın nedenleri arasında tanı yöntemlerindeki değişim ve yeniliklerin yanında toplumsal bilinçlenmenin rolü yadsınamaz. Yapılan ilk çalışmalarda prevalans 4/10.000 olarak ifade edilmiştir. Yapılmış olan ilk çalışmaları derleyerek sunan Fombonne, 1990'ların sonuna kadar olan prevalans ortalamasını yaklaşık 4-5/10.000 (0,7-21/10.000 arasında değişen prevalans bildirimlerinin ortalaması) olarak bildirmiştir. Farklı çalışmalarda farklı değerlerin bildirilmesinin olası en önemli nedeni otizmin tanımlanmasındaki farklılıklardır. Daha kapsamlı tanımlamalar prevalanstaki yüksek oran değerlerini açıklayabilir (5,10).

OB ile ilgili ilk epidemiyolojik çalışma İngiltere'de 1966'da yapılmış, prevalans 4,5/10.000 olarak bildirilmiştir (21). İngiltere'de 2001'de yapılan bir çalışmada 2,5-6,5 yaş arası çocuklarda YGB prevalansı 62,6/10.000, OB prevalansı 16,8/10.000 olarak ifade edilmiştir (22). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise YGB için prevalans 34/10.000 olarak bildirilmiştir (23). Fombonne 2009'daki çalışmasında OB prevalansını 20,6/10.000, YGB prevalansını 60-70/10.000 olarak bildirmiştir (24).

Otizm erkeklerde kızlara oranla 3-4 kat daha fazla oranda görülmektedir. Fakat zeka düzeyi etkilenmesi oranları birbirine yakındır (25). Hindistan, Afrika, Çin, Latin Amerika, Ortadoğu'da YGB'nin nisbeten daha az görüldüğü iddia edilmekle birlikte etnik köken, aile durumu, yaşam şekli gibi değişkenlerin sıklığı etkilemediği görülmüş; tüm dünyada prevalansın birbirine yakın olduğu anlaşılmıştır. İlk çalışmalarda otizmin yüksek sosyoekonomik düzey ile yakından ilişkili olduğu, bu ailelerde daha sık görüldüğü belirtilmesine karşın daha sonraki çalışmalar bu farkın olmadığını göstermiştir. Bu fark düşük sosyoekonomik düzeye sahip çocukların daha geç tanı almasına bağlanmıştır (26, 27, 28).

Yaygın Gelişimsel Bozuklukların kapsamının, dolayısıyla tanımının geniş ve heterojen olması araştırmaların önündeki sistematik engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Otistik bozukluk, yaygın gelişimsel bozukluklar ve çocukluk psikozlarının klinik ayrımları oldukça güçtür. YGB nadir görülen bir grup bozukluk olduğundan dolayı sağlıklı veriler elde edilebilmesi için daha geniş epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (29, 30).

2.4. Klinik Özellikler

Otizm; dil gelişimi, sosyal etkileşim, iletişim kurmada yetersizlikle tanımlanan, üç yaşa kadar gelişen ve yaşam boyu süreğen olarak değişen derecelerde kişiyi etkileyen nöropsikiyatrik bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Otistik bireyler dış uyaranlardan daha çok içi uyaranlara göre tepki verirler ve bu durum başkaları tarafından anormal davranış olarak değerlendirilir. Daha çok cansız nesnelere odaklanırlar. Belirtiler bireysel olarak değişkenlik gösterebildiği gibi yaş ve gelişim düzeyine göre de farklılıklar olabilir. Genellikle zihinsel geriliğin de eşlik ettiği otizm, davranış ve gelişim özellikleri ile diğer otistik spektrum bozukluklardan ayrılmaktadır. YGB'nin daha iyi tanımlanabilmesi için ortak görüş vardır, fakat mevcut tanı ölçütleri içinde otistik bozukluk ayrı bir tanı grubunu oluşturmaktadır (2, 5, 8).

Erken dönemde rastlanan bulgulara rağmen YGB'li çocuklar genellikle dil gelişimindeki gecikme belirgin oluncaya kadar klinik değerlendirmeye değer bulunmamaktadır. YGB'de semptomların başlangıcı çoğu olguda aynı anda olmamakta, kademeli olarak ortaya çıkmaktadır. Olgular konuşmaya başladıktan sonra dil yetisini kısa sürede kaybederler. Takip eden günlerde de mevcut düzeyde devam ettirdiği iletişim kurma (ör: tanıdığı kelimelere cevap verme) seviyesini de kaybeder. Normal olduğu halde işitme kaybından şüphelenilebilir. Basmakalıp ve tekrarlayıcı davranışlar hemen ortaya çıkabileceği gibi 3-4 yaşa kadar herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir (5, 31).

2.4.1. Başlangıç Yaşı ve Tanı

Otizm üç yaşından önce başlayan ve yaşam boyu süren, tekrarlayan-basmakalıp davranışlar, sosyal etkileşimde ve iletişimde gerilikle seyreden bir

hastalıktır. Belirtiler genellikle yaşamın ilk iki yılında aileler tarafından fark edilir. Ne kadar erken fark edilip tıbbi müdahalede bulunulursa öz bakım yetenekleri ve sosyal etkileşimde ilerleme o kadar hızlı ve nitelikli olur. Olguların %50-75'inde 5 yaşa kadar, özellikle konuşma yeteneği gelişmemiştir (32, 33).

Otizimde tanı nedene veya işleyiş durumuna göre değil davranışa göre konmaktadır. YGB'de doğru tanının konması klinik seyir ve prognoz açısından çok önemlidir. Bireyin erken dönem gelişim öyküsü aileden alınmalı ve psikiyatrik muayene tam olarak yapılmalıdır. Klinik tablo hastalar arasında farklılık gösterse de üç yaşından önce belirtiler ortaya çıkar ve tanı konur. Ayırıcı tanıda öncelikle YGB grubundaki diğer hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Tanı için değişik araçlar kullanılarak psikiyatrik ve ailevi etkenler değerlendirilerek ilgili tıbbi durumlar göz önünde bulundurulur. Üç yaşından önce tanı konan atipik otistik bireylerde ilerleyen dönemlerde otizm belirtilerinin devam etmemesi olasılığı az değildir (10, 34).

Otistik bozukluk ile ilgili DSM-IV tanı kriterleri Tablo 2.1'dedir.

Tablo 2.1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri (APA 1994)

A. En az ikisi (1)'inci maddeden ve birer tanesi (2) ve (3)'üncü maddelerden olmak üzere (1), (2) ve (3)'üncü maddelerden toplam altı (veya daha fazla) maddenin bulunması:	
1.	Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren sosyal etkileşimde nitel bozulma:
a.	Toplumsal etkileşim sağlamak için yapılan el-kol hareketleri, alınan vücut konumu, takınılan yüz ifadesi, göz göze gelme gibi birçok sözel olmayan davranışta belirgin bir bozulmanın olması.
b.	Yaşlılarıyla gelişimsel düzeyine uygun ilişkiler geliştirememesi.
c.	Diğer insanlarla eğlenme, ilgilerini ya da başarılarını kendiliğinden paylaşma arayışı içinde olmama (örn. ilgilendiği nesnelere göstermeme, getirmeme ya da belirtmeme).
d.	Toplumsal ya da duygusal karşılıklar verememesi.

Tablo 2.1. Otistik Bozukluk DSM-IV Tanı Kriterleri (APA 1994) (Devamı)

2.	Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren iletişimde nitel bozulma:	
	a.	Konuşulan dilin gelişiminde gecikme olması ya da hiç gelişmemiş olması (el, kol ya da yüz hareketleri gibi diğer iletişim yollarıyla bunun yerini tutma girişimi eşlik etmemektedir.).
	b.	Konuşması yeterli olan kişilerde, başkalarıyla söyleşiyi başlatma ya da sürdürmede belirgin bir bozukluğun olması.
	c.	Basmakalıp ya da yineleyici ya da özel bir dil kullanma.
	d.	Gelişim düzeyine uygun çeşitli, imgesel ya da toplumsal taklitlere dayalı oyunları kendiliğinden oynamama.
3.	Aşağıdakilerden en az birinin varlığı ile kendini gösteren davranış, ilgi ve etkinliklerde sınırlı, basmakalıp ve yineleyici örüntülerin olması:	
	a.	İlgilenme düzeyi ya da üzerinde odaklanma açısından olağandışı, bir ya da birden fazla basmakalıp ve sınırlı ilgi örüntüsü çerçevesinde kapanıp kalma.
	b.	Özgül, işlevsel olmayan, alışlageldiği üzere yapılan gündelik işlere ya da törensel davranış biçimlerine hiç esneklik göstermeksizin sıkı sıkıya uyma.
	c.	Basmakalıp ve yineleyici motor mannerizmler (örn. parmak şıklatma, el çırpma ya da burma ya da karmaşık tüm vücut hareketleri).
	d.	Eşyaların parçalarıyla sürekli uğraşıp durma.
B. Aşağıdaki alanlardan en az birinde, 3 yaşından önce gecikmelerin ya da olağandışı bir işlevselliğin olması:		
	1. Toplumsal etkileşim, 2. Toplumsal iletişimde kullanılan dil veya 3. Sembolik ya da imgesel oyun.	
C. Bu bozukluğun Rett Sendromu ya da çocukluk çağı dezintegratif bozukluğuyla daha iyi açıklanamaması.		

2.4.2. Sosyal Etkileşim

Otizm olan bireylerdeki en temel özellik iletişim ve etkileşimdeki beceri güçlüğüdür. Etkileşimde doğallık ve esneklik becerilerinde yetersizlik vardır. İçe çekilmiş, etrafa ilgisiz, olup bitenin farkında değilmiş görünümü verirler. Alışılmadık duygusal tepkiler, sebepsiz gülme ve ağlamalar, donuk yüz ifadesi görülebilir. Normal gelişim gösteren infantlar ilk aylarda dahi sosyalken, OB'deki sosyal gerilik altıncı aydan sonra dikkat çekici şekilde gözlemlenebilir. Bebekken sosyal gülümseme göstermezler (35, 36). Oyun çocukluğu döneminde etraflarındaki kişileri görmüyormuş izlenimi verirler. Seslere tepkileri yoktur ve yalnızlığı tercih ederler. Akranları ile ilişki kuramazlar. Tek başlarına oynayabilecekleri oyunları paylaşmazken, diğer çocukları sadece kendi amaçlarına araç olarak kullanırlar. İki kişinin aynı anda belirli bir hedefe yönelik dikkat göstermeleri olarak ifade edilen ortak dikkatteki farklılık daha küçük yaştaki otistik çocuklarda görülen önemli bir özelliktir (22, 32). Okul öncesi dönemde otizm; kısıtlı yüz ifadesi, konuşma gecikmesi, diğer çocuklara karşı ilgi yokluğu, zeka geriliği ve alışılmışın dışında göz teması ile tanınabilir. Normal zeka gelişimi ve dil yeteneğine sahip bireylerde dahi sosyal farkındalık durumu bozulmuştur. Ortalama iki yaş civarında otizm tanısı olan bireylerin çoğu normal bireylerden ayırt edilebilir. Geç çocukluk veya ergenlik döneminde arkadaşlık kurmak isteyebilirler, fakat özellikle empati yetenekleri gelişmemiş olduğu için genellikle başarılı olamazlar (37, 38, 39).

2.4.3. İletişim

Otizimde hem sözel hem de sözel olmayan iletişim becerileri etkilenmiştir. Dil ve konuşma gelişimi gecikmiştir ya da hiç gelişmemiştir. Ebeveynlerin doktora başvuru nedeni genellikle konuşmadaki yetersizliktir ve bu otizmin temel özelliğidir (10, 35). Otistik bireyler arasında dil gelişimi normalden oldukça farklıdır. Konuşma becerisi kazanabilmiş bireylerde sözel iletişimi başlatma ve devam ettirmede; ses tonunu, hızını ve ritmini ayarlamada anormallikler gözlenir. Konuşmalarında sıra ve bağlantı yoktur. Kendi kendilerine konuşma ve kelimeleri arka arkaya ekleme tarzında ifadeler kullanırlar. Dil kullanımında zamirleri karıştırırlar, söyleneni tekrar ederler, kelime uydururlar. Söylenene genellikle geç cevap verirler, bazen de yüksek

ses duyduklarında kulaklarını elleri ile kapatırlar. Böyle farklı tepkiler işitme sorununu akla getirebilmektedir (40, 41, 42). Anlama ve yorumlama kabiliyetleri geridir. Otistik çocukların yarısı konuşmayı ilk iletişim aracı olarak kullanmamaktadır fakat tedavi sürecinin hız ve etkinliğine bağlı olarak bu oran azaltılabilmektedir. Otizmi olan bireyler sadece dil gelişiminde değil sözel olmayan iletişimde de (yüz ifadesi, beden ve işaret dili, selamlaşma vb.) zorluklar yaşamaktadırlar (43, 44).

2.4.4. Davranış Anormallikleri

Otizm kelimesi anlam olarak bireyin kendine özgü iç dünyasında yaşıyor olması halidir. Otistik bozukluğun sınırları tam belli olmasa da tüm bireylerde görülen ortak özellikler vardır. Genel olarak hepsi katı ve duygusal olarak donuktur. Davranışları dış uyaranlardan daha çok iç uyaranlara göre şekillendiğinden verdikleri tepkiler tuhaf olarak değerlendirilir. Birinci derece yakınları ile hiçbir bağıları yokmuş izlenimi verirler. Dış dünya ile ilişkilerinde cansız nesnelere tercih ederler. Göz teması kurmak genellikle mümkün değildir. Anormal duygusal yanıtlar sıktır. Ebeveynler genellikle çocuklarının işitme kaybı olduğundan şüphe etmelerine rağmen konuşma dışındaki seslere (müzik sesi vb.) son derece duyarlı olabilmektedirler. Yaşamın ilk yıllarında normal bireylerde görülen merak edici davranış biçimi yoktur veya çok azdır. Oyuncak oynamama ya da oyuncakları farklı kullanma eğilimi vardır. Oyuncakların belirli kısımları ile oynamayı severler. Oyunları genellikle tekrar edici ve sıradandır. Ortam veya durum değişikliklerine direnç göstererek öfke nöbetleri yaşayabilirler. Özellikle zeka düzeyi düşük olan bireylerde kendilerine yönelik saldırgan, zarar verici davranışlar görülebilir (10, 32).

Otistik bireylerde stereotipik (basmakalıp) davranışlar, takıntılar, nesnelere yineleyici biçimde uğraşlar, kendi etrafında dönme, dönen nesnelere ilgi, kollarını kanat çırpma biçimde açıp kapama, eşyaları yan yana dizme şeklinde davranışlar görülür. Reklam tabelaları, belirli tarihler, takım tutma gibi kısıtlı ilgi alanlarına ilgili olabilirler (35, 45). Bazı günlük aktiviteleri aynı şekilde yapma eğilimi belirgindir: Belirli kıyafetleri giymek, aynı yolları kullanmak gibi. Oyun oynayabilme becerisi olanlarda ortak oynama genellikle gelişmez ve oyun kurma becerileri yoktur. Dönen nesnelere saatlerce seyredebilirler. Bazı nesnelere koklayıp ağızlarına alabilirler.

Ortamdaki aynılığın korunması konusunda taviz vermezler. Tüm davranış farklılıklarının ortaya çıkması yaş ve gelişim düzeyine göre değişkenlik göstermektedir (46, 47, 48).

2.5. Eşlik Eden Diğer Bozukluklar

Birçok psikiyatrik hastalık YGB’de görülebilir. Olguların önemli kısmında zeka düzeyi düşüktür. Otistik bozukluğu olanların yaklaşık %75’i işlevsel olarak geridir. Yüksek işlevli olgularda birlikte görülen bozukluklar puberte öncesi daha çok dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) iken, ergenlik döneminde depresif bozukluk olarak karşımıza çıkmaktadır (49). Zeka düzeyindeki düşüklük arttıkça YGB kapsamındaki davranışların da artışı beraberinde gelmektedir. Otizmde bazı çocukların erken çocukluk döneminde okuma öğrenmesi gibi zeka düzeyinden bağımsız olarak yetenekleri olabilir. Otizme zeka problemleri dışında en sık eşlik eden bozukluk depresyondur. Asperger bozukluğunda daha sık olmak üzere depresif bozukluk görülebilmektedir. Ergenlik döneminde oran biraz daha artmaktadır. YGB’de depresyona önemli oranda kaygı bozuklukları eşlik etmektedir. Yaş arttıkça depresyon ve kaygı bozukluğu görülme oranı da artmaktadır. Geçmiş dönemlerde otizm ve çocukluk psikozu aynı kavramlar olarak ifade edilmekte iken bugün YGB’nin gelişimsel bir bozukluk olduğu ifade edilmektedir (50). Otizmde epilepsi görülme oranı oldukça sıktır. Özellikle ağır zeka problemi olanlarda daha yaygındır. Yaşla birlikte epilepsi tablosunun ortaya çıkma ihtimali de artmaktadır (51).

2.6. Tanı ve Tarama Araçları

Otizm tanısının konulabilmesi için ebeveynden alınan öyküye, belirtilerin değerlendirilmesine ve bireyin gözleminin iyi yapılmasına ihtiyaç vardır. Otistik bireyleri tanımlayabilmek için farklı davranış biçimleri ortaya konmuştur. Bu davranışların tamamı hiçbir bireyde ve aynı anda gözlemlenmez. Her bir bireyde belirtilerin görülme zamanı değişmektedir (15, 52). Böyle farklı otistik tabloların görülmesindeki neden otizmin farklı klinik spektruma sahip olmasıdır. Bu durum özellikle yaşı küçük olan bireylerin tanısının kesinleşmesini zorlaştırmaktadır. Tanının konabilmesi için tekrarlayan değerlendirmelerin bütüncül olarak ele alınması gerekmektedir (53). Değerlendirmede gelişim basamakları ve zeka düzeyi verileri

özellikle işlevselliğin belirlenmesi açısından erken dönemde tanıya giden yolda önem arz etmektedir (54, 55, 56).

Otizm tanısı koyabilmek için belirli semptomlar olsa da değişik tarama araçları ve DSM-IV veya ICD-10 ölçütleri rehber olarak kullanılmalıdır. Tanı ve belirtileri değerlendirmede geliştirilmiş görüşme araçları olan; Otizm Tanısal Gözlem Çizelgesi (Autism Diagnostic Observation Scale-ADOS), Otizm Tanı Görüşmesi-Düzenlenmiş (Autism Diagnostic Interview-Revised; ADI-R), Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (The Childhood Autism Rating Scale-CARS) ve The Behavioral Summarized Evaluation (Davranış Değerlendirme Ölçeği-BSE) sıkça kullanılan ölçeklerdir. Özellikle Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği (The Childhood Autism Rating Scale-CARS) doğruluğu kabullenilmiş, uygulaması kolay ve hızlı olması yönleriyle öne çıkmıştır. Otizm Davranış Kontrol Listesi (Aberrant Behavior Checklist-ABC) ve Gilliam Otizm Skorlama Ölçeği (Gilliam Autism Rating Scale-GARS) de diğer kullanılan ölçeklerdendir (57, 58). Yürüme Çağındaki Çocuklarda Otizm Kontrol Listesi (The Modified Checklist for Autism in Toddlers; M-CHAT) 18 aylık çocuklarda tarama amacıyla en sık kullanılan araçtır (59, 60).

2.7. Etyoloji

Merkezi sinir sisteminin gelişimsel bir bozukluğu olarak ifade edilen otizmin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Kanner otizmi tanımladıktan sonra YGB'nin etyolojisine dair çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Kanner otizmi başlangıçta doğuştan gelen bir bozukluk olarak ele almıştır. Daha sonra ise anormal anne-baba davranışlarına karşı ortaya çıkan bir tepki olarak değerlendirmiştir. 1960'ların sonlarında otistik bozukluğun biyolojik temeli daha çok kabul görmüş, tıbbi bir hastalık ya da doğum öncesi-sonrası ile ilgili problemlerin sebep olduğu beyin hasarına bağlı olarak gelişen bir durum olduğu düşünülmüştür. Son dönemlerde ise etyolojide genetik faktörlerin yanında biyolojik, psikolojik, sosyal faktörler öne çıkmaya başlamıştır (61).

Otizimde epileptik bozukluklara, zeka geriliğine ve diğer tıbbi durumlara sık rastlanması; genetik etyolojiye yönelik çalışmaların umut verici şekilde ilerlemesi; nörokimyasal çalışmalarda, görüntüleme yöntemlerinde, otopsilerde farklı beyin bölgelerinde organik anormalliklerin bulunması biyolojik faktörlerin etken olduğu

bir bozukluk olma ihtimalini daha da güçlendirmiştir (62, 63). Otizmin organik bozukluklarla münasebeti tanı yaklaşımlarını değiştirmiş ve heterojen bir hastalık olduğunun kabullenilmesini gündeme getirmiştir (64, 65).

Etyolojisi karmaşık olan otizmde birçok olgunun altında yatan patoloji henüz bilinmemektedir. Son çalışmalarda genetik etkenler ve beyin fonksiyonlarının yanında bağışıklık faktörü, nörokimyasal etkenler ve çevresel etkenler de araştırılmaktadır (66).

Otizmin artan sayıdaki farklı ve nadir kişisel genetik nedenleri zeka geriliği ve beyin felcinde rolü olan birçok sendromla benzerliği ortaya koyar. Fakat kalıtsal değişikliklerdeki karmaşık ve henüz belirlenememiş küçük etkileşimler de muhtemel nedenler arasındadır. İkiz ve aile çalışmaları otizm genetiğini aydınlatmada yol gösterici olmuş, otizmde kalıtımın %90'dan fazla olabileceğinden bahsedilmiştir (22). Otizmlili bireylerin % 20'sinde genetik neden ortaya konabilmektedir. Çok az bir kısmında teratojenik etkenler suçlanırken vakaların çoğunda etyolojik altyapı aydınlatılamamaktadır.

Otizm sebebi bilinmeyen, çoklu faktörlerin etkisiyle meydana gelen bir bozukluk olarak düşünülmüş; yüksek kalıtsallık, otizme sebep olan genleri tanımlamada başarısızlık, erkek dişi oranınının 4/1 olması, kardeşlerde yaklaşık %4 tekrarlama riski temeli üzerinde çalışmaların devam ettiği bir hastalıktır (67).

2.7.1. YGB'de Sitogenetik Olarak Gözlenebilen Kromozomal Anomaliler

Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde kromozom anöploidilerini ortaya koymaktadır. Kromozom anomalilerininin %3-5'lik kısmı ise FISH teknikleri kullanılarak tayin edilebilmektedir. Beklendiği gibi dengesiz kromozom anomalileri genellikle otizm ve eşlik eden dismorfolojisi olan çocuklarda görülmektedir (8, 23, 68). Otizmde hemen her kromozomda anomali bulunmasına rağmen, bunlardan sadece bir kaçının otizm genleri için muhtemel lokusları içerdiği düşünülmektedir (24, 25, 26).

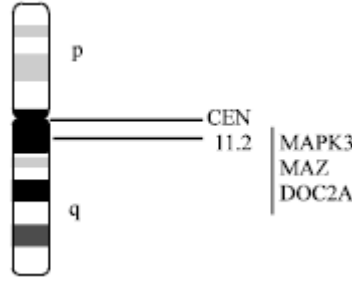
15q11-13 Bölgesi

Otizimde en sık saptanan kromozom anomalisi %1-3 ile anne kaynaklı Prader Willi/Angelman Sendromu kritik bölgesinin (15q11-q13) duplikasyonudur. 15q11-13 bölgesi diğer kromozomal bölgelere göre anomalilerin nisbeten daha sık görüldüğü bir bölgedir (69). Bu duplikasyon çoğunlukla de novo ilave izodisentrik 15q kromozomu ve daha az olarak da ebeveynlerdeki kromozom translokasyonunun dağılımı veya anne kaynaklı interstisyel 15q duplikasyonu sonucunda meydana gelir. Rutin sitogenetik analizler ile izodisentrik 15q tespit edilebilir fakat interstisyel duplikasyonların tanısı FISH ve / veya Array Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (aCGH) analizlerini gerektirmektedir. Anne kaynaklı 15q11-q13 interstisyel duplikasyonu otizmin oldukça yüksek oranda kalıtsal nedenidir, oysa baba kaynaklı duplikasyon bu bölgenin genomik damgalanmasının önemini belirtircesine fenotipik olarak ya çok az etkilidir ya da hiç etkili değildir (70). Bu bölgenin trizomisi ile sonuçlanan maternal 15q duplikasyonu fiziksel fenotipte belirgin değişikliklere neden olmaz, ancak ilave izodisentrik 15'i olan (15q bölgesinin dört kopyasına sahip olan çocuklar) tipik olarak daha fazla etkilenecek hipotoni, nöbetler, mikrosefali ve ciddi gelişme geriliği sergileyebilirler (69, 70, 71). Bu bölgenin delesyon veya duplikasyonlarında otistik bozukluk, epilepsi, kas hipotonisi ve motor koordinasyon problemleri, hafiften-ağıra kadar değişebilen zeka problemleri ve konuşma geriliği veya konuşamama gibi değişken bir klinikle karşılaşılmaktadır (70, 72, 73). Bu bölgede otizmle ilişkilendirilen bazı aday genler “Otizm ile İlişkilendirilen Genler ve Tek Gen Hastalıkları” başlığında detaylı olarak anlatılmıştır.

16p11 Bölgesi

16p11 bölgesindeki genomik değişiklikler otizmde aday bölge olarak farklı çalışmalarda bildirilmiştir. Bu bölgedeki MAPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3), MAZ (Myc-associated zinc finger protein) ve DOC2A (Double C2-like domain-containing protein, alfa) genleri beyin gelişimi esnasında ve sinir sisteminde eksprese olmaktadır. MAPK3 ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz ailesine dahil olan; hücre gelişimi, farklılaşması ve döngüsünde rol alan 9 eksonlu bir genidir. Kinazların aktive olmasıyla çekirdekte bulunan hedef bölgeler fosforillenir ve hücre içi düzenlenme sağlanır. Yapılan çalışmalarda MAPK3 negatif farelerde anormal sakinme davranışı,

hiperaktivite ve immün sistem anormallikleri gözlemlenmiştir. MAZ birçok dokuda özellikle de orta-frontal kortekste eksprese olan 6 eksonlu bir genidir. GABA sinyallerinin, nöronal farklılaşmanın ve serotonin yolağının düzenlenmesinde direk olarak etkilidir. Bu işlevini hem başlatıcı hem de sonlandırıcı rolü olan bir transkripsiyon faktörü aracılığıyla gerçekleştirir. DOC2A ise sinaptik keseciklerde yerleşik olup başlıca beyinde eksprese olan, kalsiyum bağımlı nörotransmitter salınımında rol alan 11 eksonlu bir genidir. DOC2A negatif farelerde sinaptik iletimde, öğrenmede değişikliklerle birlikte anormal pasif sakınma davranışı gözlemlenmiştir (74, 75).



Şekil 2.1. MAPK3, MAZ ve DOC2A genlerinin 16. kromozom üzerindeki lokalizasyonu (76).

16p11.2 delesyon sendromu gelişme geriliği, entellektüel yetersizlik ve/veya YGB ile karakterizedir. Gelişme geriliği motor yetersizlikten daha çok dil gelişim bozukluğu ve bilişsel fonksiyon ile ilişkilidir. Zeka bölümü (ZB) skorları hafif-orta entellektüel yetersizlikten normale kadar değişmesine rağmen, ortalama ZB skoruna sahip olan bireyler konuşma gecikmesi veya YGB gibi diğer gelişimsel durumlara sahiptir. İfade dili algılama dilinden daha fazla etkilenmiş olarak gözlemlenmektedir. 16p11.2 delesyonları veya duplikasyonları otizmlili bireylerin yaklaşık %1'inde, gelişme veya konuşma gecikmesi olan çocukların %1.5'inde rapor edilmiştir (77). 16p11.2 delesyonu genellikle de novo olarak ortaya çıkar, fakat ebeveynden çocuğa otozomal dominant olarak da geçebilir. Yine de dikkat çekici olarak; 16p11.2 kopya sayısı değişiklikleri (KSD) şizofreni, bipolar hastalık, nöbetler, DEHB, disleksi ve dış görünüş olarak etkilenmemiş aile bireylerinde de gözlenebilir; bu nedenle bu KSD'lerin önemini yorumlayıp izah etmek zor olabilir (75, 78, 79).

Down sendromlu çocuklar arasında otizm görülme sıklığı tahmin edilenden daha sık olup insidansı en az %7 olarak ifade edilmiştir (80).

Turner sendromlu olup; anne kaynaklı X kromozomuna sahip ($45,X^{mat}$) kızların sosyal ve bilişsel becerileri, baba kaynaklı X kromozomuna sahip ($45,X^{pat}$) olan kızlardan daha zayıftır (69).

Kromozom 2q37, 18q, 22q13.3, Xp22.3 delesyonları ve cinsiyet kromozomu anöploidilerinden 47,XYY, 47,XXY, 45,X in YGB olgularında yüksek sıklıkta gözlemlendiği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (81, 82, 83, 84). Kromozom 2q37 ve 22q13.3 ile ilgili rapor edilen tüm terminal delesyonlar dismorfik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (82, 85). Nedeni bilinmeyen otizmlili bireylerdeki 22q13.3 ve Xp22.3 delesyonlarıyla ilgili minimal kritik kromozom bölgelerinin belirlenmesi sırasıyla SHANK3 (86) ve NLGN4 (87) mutasyonlarının tanımlanması ile sonuçlanmıştır.

2.7.2. Kopya Sayısı Değişiklikleri

Array CGH otizmlili çocukların değerlendirilmesinde yüksek çözünürlüklü kromozom ve FISH analizi yöntemlerinin yerini almaktadır. Array CGH'de kullanılan ve klinik olarak hali hazırda elde bulunan platformlar ile bilinen delesyon/duplikasyon sendromlarında tüm genom değerlendirilirken bu platformlar ilave olarak subtelomerik bölgelerin değerlendirilmesinde de kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Bugün aCGH, sebebi bilinmeyen otizmlili bireylerdeki klinik olarak ilişkili de novo genomik dengesizliklerin %7-10'unu tanımlayabilmektedir (74, 88). Ancak yüksek rezolüsyonlu, tek nükleotid polimorfizm (SNP) tabanlı array analizlerinde normal kromozom kuruluşuna sahip, dismorfolojisi olan otistik bireylerde KSD oranı %27,5 oranında bildirilmiştir (89) ve bu yöntemle elde edilen veriler otoriteler tarafından "sendromik" otizm olarak tanımlanan bireylerde iyi bir kazanç olarak ifade edilmiştir.

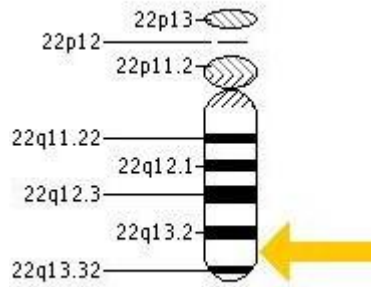
2.7.3. Otizm ile İlişkilendirilen Hastalıklar ve Tek Gen Hastalıkları

Tüm genom bağlantı ve asosiyasyon çalışmaları otizm genetiğinin karmaşıklığını ortaya koymuş olup günümüzde henüz bazı yatkınlık genleri dışında

tanımlanabilmiş herhangi bir spesifik marker belirlenememiştir. Bunun yanında bazı tek gen hastalıklarında otizm veya otistik özellikler tanımlanmıştır. Çoğu ciddi entellektüel yetersizlik ve değerlendirilmesi gereken dismorfolojik bulgular ile ilişkilidir.

SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) Geni

SHANK3 geni Shank geni ailesinin 23 eksonlu bir üyesi olup 22q13.3 kromozom bölgesinde yerleşiktir. Gen ürünü olan proteinler nörotransmitter reseptörlerini, iyon kanallarını ve diğer membran proteinlerini içeren postsinaptik bölgede bulunurlar ve nöronal sinyal iletiminde rol alırlar. Ayrıca sinaps oluşumu ve dendritik çıkıntılarının olgunlaşmasında da önemli işlev görürler. Yapılan farklı çalışmalarda otizmlili bireylerde SHANK3 mutasyonu görülme oranı ortalama % 1 olarak belirtilmiştir. Klinik değişken olmakla birlikte YGB, konuşma geriliği, öğrenme zorluğu ön plandadır. 22q13.3 bölgesinin delesyonlarında nörolojik bulgulardan asıl sorumlu olarak SHANK3 geni gösterilmektedir (74, 86).

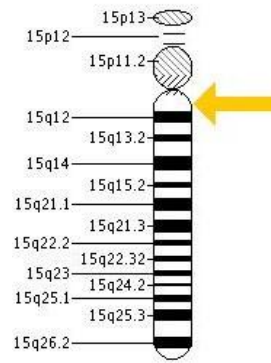


Şekil 2.2. SHANK3 geninin 22. kromozom üzerindeki lokalizasyonu (74).

UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A)

15q11.2 bölgesinde lokalize, 13 eksonlu bir gendir. Genin ürünü olan “ubiquitin protein ligaz” hücrede bazı proteinlerin yıkımını sağlamakla görevli olup bunu “ubiquitin” olarak adlandırılan küçük bir proteini ekleyerek yapar. Ubiquitin işaretli proteinler proteozomlarca tanınarak yıkılırlar. Yapılan çalışmalar UBE3A'nın

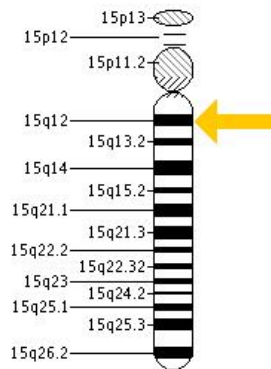
sinir sistemi gelişim ve fonksiyonunda kritik öneme sahip olduğunu ancak henüz rolünün tam olarak açıklanamadığını belirtmektedir. Her birey anne-babadan kalıtılan iki kopya UBE3A genine sahiptir. Her iki kopya da birçok dokuda aktif iken beynin bazı bölgelerinde ise sadece anneden kalıtılan kopya aktiftir. Bu ebeveyne özgü kalıtım şekli “genomik imprinting” olarak adlandırılan durumdan dolayı ortaya çıkmaktadır (74).



Şekil 2.3. UBE3A geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu (74).

GABRB3 (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3)

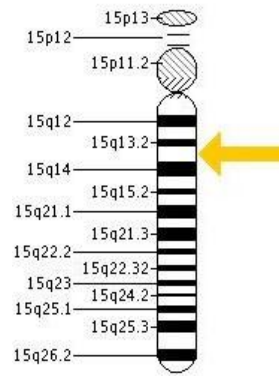
15q12’de lokalize, 10 eksonlu, ligand-kapılı iyon kanalı ailesine mensup bir gendir. Kodlanan protein en az 13 alt birimi olan klor kanallarından birisini kodlar ve sinir sisteminin ana inhibitörü olan GABA’nın reseptörü olarak görev yapar (74).



Şekil 2.4. GABRB3 geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu (74).

CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7)

CHRNA7 15q13.3'te lokalize, 10 eksonlu bir genidir. Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) ligand-kapılı iyon kanalı ailesine mensup olup sinapslarda hızlı sinyal iletiminden sorumludur. 15q13.3 delesyon sendromu entellektüel yetersizlik, epilepsi (72) ve YGB ile (73, 90, 91) ilişkilendirilmiştir ve klinik olarak değişken görünmektedir. Daha önceki çalışmalarda 15q13.3 mikrodelesyon sendromunun nörogelişimsel fenotipine CHRNA7'nin haplo-yetersizliğinin neden olduğu bildirilmiştir (92).



Şekil 2.5. CHRNA7 geninin 15. kromozom üzerindeki lokalizasyonu (74).

Sendromik otizme neden olan ve nisbeten daha sık gözlemlenen tek gen hastalıklarından bazılarının klinik ve genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

Frajil X Sendromu: Otizm tanısı alan çocukların %1-3'ü frajil X sendromuna sahiptir ve frajil X sendromlu çocukların en az yarısı göz temasından kaçınma, konuşma gecikmesi, tekrarlayıcı davranışlar, uyku düzeninde bozulma, öfke nöbetleri, kendine zarar verici davranışlar, hiperaktivite, düşünmeden harekete geçme, dikkatsizlik ve sese duyarlılık gibi bazı otistik davranışlar gösterirler. Frajil X sendromlu hastaların olduğu bir çalışmada OB ve BTA-YGB kriterlerinin oranı %30 olarak belirtilmiştir (93). Frajil X sendromu FMR1 genindeki CGG trinükleotid tekrarlarının tam mutasyonu olarak ifade edilen 200 tekrar sayısı veya daha fazla sayıda genişlemesi nedeniyle oluşur. Otizmlili çocuklarda dikkate değer oranda

FMR1 premutasyonları (55-200 CGG tekrar sayısı) bulunmuştur (76, 94, 95, 96, 97). Toplam 488 olguyu içeren çalışmada, on olguda tam mutasyon ya da premutasyon saptanmıştır. Tam mutasyonu olan beş olgudan birine OB tanısı konmuştur. Premutasyon taşıyıcısı beş olgudan dördünün tanısı OB iken birinin tanısı BTA-YGB olarak konulmuştur (68). Tüm bu veriler YGB açısından değerlendirilen tüm çocuklara FMR1 geni taramalarının yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

PTEN makrosefali sendromu: PTEN (Fosfataz ve Tensin Homoloğu) geni ilk olarak PTEN hamartoma tümör sendromu olarak bilinen geniş bir hastalık grubu ile (Cowden Sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba Sendromu, Proteus Sendromu ve Lhermitte-Duclos hastalığı) ilişkilendirilen, bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Yakın dönem çalışmalarda PTEN geni mutasyonlarının otizm ve makrosefali ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (98-102). Buna bağlı olarak PTEN geninin nöron yaşam süresi ve sinaptik bağlantı değişim mekanizmasını da içeren beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Her ne kadar YGB'ye sebep olan PTEN mutasyonlarının sıklığı tam olarak bilinmemekle birlikte; klinikte otizm ve makrosefali olarak takip edilen çocuklarda yapılan çalışmalarda mutasyon sıklığının %1-17 arasında değişkenlik gösterdiği literatürde bildirilmiştir (101-103). Bu popülasyonda hem de novo hem de ailesel PTEN mutasyonları tanımlanmıştır. Yapılan çalışmaların basit ya da geniş ailelerde olması önem arz edebilir. Tüm bunların yanında makrosefali ve entellektüel yetersizliği olan çocuklarda PTEN mutasyonları daha spesifik iken otizm için bunu söylemek mümkün değildir (103).

Sotos Sendromu: Otozomal dominant kalıtım gösteren Sotos Sendromu tipik yüz görünümü, aşırı büyüme (boy ve baş çevresi 2 SD'nin üzerinde) ve hafiften (temel eğitime katılabilme ve bağımsız erişkin olabilme) ciddiye (yaşam boyu ilgi ve destek gerektiren) değişebilen öğrenme güçlüğü gibi başlıca özellikler ile karakterizedir. Sotos sendromu davranış problemleri, konjenital kalp anomalileri, yenidoğan sarılığı, böbrek anomalileri, skolyoz ve nöbetler gibi ana problemler ile ilişkilidir. Sotos sendromu muhtemelen klasik otizmin önemli bir nedeni olmamasına rağmen, Sotos sendromlu çocuklar yaşlılarıyla ilişkilerde zorluk ve sosyal yönelim yeteneğindeki eksiklik gibi davranış problemleri nedeniyle otizm kliniklerine yönlendirilebilirler (104). Sotoslu bireylerin % 80-90'ında NSD1 mutasyonu veya delesyonu gözlenmektedir.

Rett Sendromu: DSM-IV'te tanımlanmış yaygın gelişimsel bozukluklardan spesifik genetik etyolojisi tanımlanan tek hastalıktır (105). Klasik Rett Sendromlu bireylerin %96'sında X kromozomu üzerinde yer alan MECP2 geninde mutasyon vardır (106). MECP2 mutasyonlu bireylerin çoğunluğu kız olmasına rağmen; infantil ensefalopati, motor gerilikle birlikte olan entellektüel yetersizlik ve erken başlangıçlı bipolar bozukluk ve şizofreni gibi gelişim bozukluklarına sahip erkek bireylerin de %1-2'sinde bu mutasyon görülebilmektedir.

MECP2 mutasyonu olan Rett Sendromu ile nedeni bilinmeyen otizm fenotipleri birbirine oldukça yakındır; her ikisine de sahip olan çocuklar genellikle normal bir gelişim döneminden sonra tekrarlayan el hareketleri ile birlikte konuşma kaybı sergilerler. Bununla beraber Rett sendromu; baş çevresi büyüme hızının azalması, yürüyüş şeklinde ilerleyici bozulma ve erken çocuklukta ellerini burarak sıkma hareketi ile klinik olarak ayırt edilebilir. İlk değerlendirmede Rett sendromu tanısı koymak zordur. Yapılan çalışmalar MECP2 mutasyonu tespit edilen Rett Sendromlu kızların sadece %17.6'sına otizm tanısının erken konulduğunu göstermektedir. Bu kızlarda erken dönemde anlamlı bir şekilde hafif belirtiler mevcutken, ağır belirtiler ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Bu veriler de otizm tanısı almış kızların başta baş çevresi izlemi olmak üzere Rett sendromu belirtileri açısından dikkatle takip edilmesi gerektiğini göstermektedir (107). Otizm tanısı konan çocuklarda MECP2 mutasyonları yaklaşık olarak %1 olarak bildirilmiştir (106, 108). Klasik otizm tanısı alan kızlarda bu testin güvenilirliği şu anda net olmayıp, uzman bir klinikte düzenli olarak takip edilmeleri gerekmektedir. Rett sendromlu ve otizmlili bireylerin beyinlerindeki MECP2 proteininin değişken ifadesinin kanıtı, MECP2 eksikliği ya da yetersizliğinde UBE3A ve GABRB3 genlerindeki ifadenin azalması olarak gösterilebilir. Bu durum iki bozukluk arasında nedensel bir ilişki olduğunu göstermektedir (109, 110).

Tübero Sklerozis Kompleksi (TSK): Entellektüel yetersizliği olan TSK tanılı bireylerdeki bulguların %25-50'si otizm tanı kriterleri ile örtüşmesine rağmen, bu bireylerin ilk tanısında yalnızca %1.1-1.3'üne YGB tanısı konabilmektedir (111-114). TSC2 mutasyonuna sahip olan çocuklarda, erken başlangıçlı infantil spazmlar ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)'de tespit edilen temporal urlar otizm gelişme ihtimalini artırmaktadır (115). TSK'li ve otizmlili çocuklar, yalnızca TSK'li

olan çocuklara göre bilişsel olarak daha geridirler (116). Otizmlilerde deri lezyonları (hipopigmente lekeler, köpekbalığı benekleri, adenoma sebaceum) ve TSK'yi düşündüren bulguların (nöbetler, deri lezyonları, entellektüel yetersizlik) otozomal dominant kalıtım kalıbıyla uyumlu bir aile öyküsü ile birlikte olması halinde verilerin değerlendirilmesi genellikle TSK tanısının konulması veya dışlanmasında yeterlidir. TSK'ye neden olan TSC1 ve TSC2 genleri için moleküler genetik testler klinik olarak mevcuttur. Tekrarlama riski; TSK ile ilişkili otizmlilerde çocuğu olan ailelerde, nedeni bilinmeyen otizmi olan ailelerdekine göre anlamlı düzeyde daha yüksektir. TSK'de otizmin altta yatan mekanizması bilinmemektedir.

Nörofibromatozis tip 1 (NF1): Otizmlilerde NF1 tanılanmasına rağmen, bu hastalıklar gerçekten ilişkili midir ya da çocuklukta nisbeten sık rastlanan iki hastalık bir arada mıdır soruları belirsizliğini korumaktadır (111, 117, 118). Otizm ile NF1 mutasyonları arasında genetik paralellik gösterilememiştir (119).

Timothy Sendromu: Timothy sendromu; ciddi QT uzaması, sindaktili, kalp defektleri, dismorfik yüz, gelişme geriliği ve otistik semptomlar ile karakterize ve CACNA1C genindeki mutasyondan kaynaklanan otozomal dominant kalıtılan bir kalsiyum kanal hastalığıdır (120).

Joubert Sendromu: Joubert sendromu MRG'de "azı dişi belirtisi" veren serebellar vermisin tam veya kısmi yokluğu, anormal nefes alıp-verme, anormal göz hareketleri, bilişsel fonksiyon bozukluğu ve davranış problemleri ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Joubert sendromunun tamamında olmasa da "joubertin" proteinini kodlayan AH1 geni ile ilişki saptanmıştır (121). Bir çalışmada Joubert sendromlu 11 çocuktan üçünün otizm ve birinin BTA-YGB tanı kriterlerini karşıladığı ifade edilmiştir (122). Joubert sendromu ve otizmin davranış ve genetik farklılıkları nedeniyle etyolojik olarak başka hastalıklar olduğu yönünde çalışmalar da mevcuttur (123). Joubert sendromlu tek yumurta ikizleri ile ilgili başka bir çalışmada ise daha ciddi serebellar anomalisi olan ikizde otizm varlığı, henüz tanımlanmamış otizm bölgeleri veya beyin bağlantılarının etkilenmesi ile otizm fenotipinin ortaya çıkma potansiyeli fikrini ortaya atmıştır (124).

Kliniğe otizm ön tanısı ile nadiren yönlendirilen tek gen hastalıklarından bazıları aşağıda belirtilmiştir:

Cohen Sendromu (125), Cole Hughes makrosefali sendromu (126) San Filippo Sendromu, Cornelia De Lange Sendromu, Angelman Sendromu (127, 128), Williams Sendromu (129) ve bunun genetik olarak aksi 7q11.23 mikroduplikasyon sendromu (130-132) 17p11.2p11.2 duplikasyon sendromu (133, 134), 22q11 delesyon sendromu (135), WAGR (Wilms tümörü, aniridi, genitoüriner anomaliler ve mental retardasyon) sendromu (136) Duchenne Müsküler Distrofisi (137).

2.7.4. Metabolik Durumlar

Mitokondriyal Hastalıklar: Otizmde mitokondriyal solunum zinciri bozuklukları çok nadir bildirilmesine rağmen, artmış plazma laktat konsantrasyonları daha sık rapor edilmiştir (138, 139). Toplam 69 otizimli çocukta yapılan bir çalışmada artmış plazma laktat konsantrasyonu %20 olarak ifade edilmiştir; kas biyopsisi yapılan 11 çocuktan beşinde bir veya daha fazla solunum zincir kompleksinde enzimatik kompleks aktivitesini normalin %20'sinin altına düşüren genellikle de kompleks I, IV ve V'in eksikliğinden bahsedilmiştir (140). Bu verinin doğrulanması durumunda bu grup, otizmin en geniş alt grubu olabilir. Mitokondriyal bir bozukluğu hipotoni, gelişme geriliği ve aralıklı klinik gerileme durumları gibi atipik özellikleri olan otistik çocuklarda tanımlamak, bu bulguların olmadığı çocuklara göre daha muhtemeldir. Mitokondriyal bozukluğu olup ön tanısı da otizm olan 25 kişiyi içeren bir çalışmada anormal nörolojik muayene ve/veya artmış plazma laktat konsantrasyonları temelinde nedeni bilinmeyen otizmlerin ayırt edilebileceği ifade edilmiştir (141). Bunların yanında, mitokondriyal disfonksiyonun ilave nörolojik özellikleri olmayan YGB'li bireylerde de olduğu rapor edilmiştir (142, 143).

Fenilketonüri (FKÜ): Tedavi edilmemiş FKÜ ve YGB birlikteliği tarif edilmiştir fakat otizm tanısı, bu çocuklarda bulunan ciddi entellektüel yetersizlikten dolayı genellikle karmaşık ve güçtür. Bir çalışmada erken tedavi almış FKÜ tanılı 62 bireyden hiç birinin otizm tanı kriterini karşılamadığı gösterilirken, FKÜ tanılı 35 bireyden ikisinin (%5,7) YGB tanı kriterlerini ilerleyen dönemlerde karşıladığı ve tanılandığı belirtilmiştir (144).

Adenilosüksinat Liyaz Eksikliği: Bu nadir görülen otozomal bozukluk de novo pürin sentezi sonucu vücut sıvılarında süksinilpürinlerin birikimi sonucunda

meydana gelir. Etkilenmiş bireylerin yarısına yakınında gelişme geriliği, nöbetler ve göz teması kuramama, tekrarlayan davranışlar, huzursuzluk, öfke nöbetleri ve saldırganlık gibi otizm bulgularını da içeren değişken klinik tablo ile karşılaşılabilmektedir (145). Yapılan bir çalışmada YGB tanılı 420 çocuktan birinde adenilosüksinat liyaz eksikliği bildirilmiştir (146).

Kreatin Eksikliği Sendromları (KES): Kreatin metabolizması bozuklukları doğuştan itibaren meydana gelirler bunlar guanidinoasetatmetiltransferaz (GAMT) eksikliği ve L-arjinin:glisin amidinotransferaz (AGAT) eksikliği (veya GATM eksikliği) ve kreatin taşıma yetersizliği olan SLC6A8 eksikliği olarak sınıflandırılabilir. Her üç KES'te entellektüel yetersizlik ve nöbetler ortak olarak bulgulardır. GAMT eksikliği olan olguların yaklaşık %80'inde otistik davranış ve kendine zarar verme şeklinde davranış bozuklukları; yaklaşık %45'inde ise piramidal/ekstrapiramidal bulgular mevcuttur. AGAT eksikliği olan birey sayısı beş olarak rapor edilmiştir. Etkilenmiş erkeklerde SLC6A8 eksikliği fenotipi hafif-orta entellektüel yetersizlik ve konuşma gecikmesinden ciddi entellektüel yetersizlik, nöbetler ve davranış bozukluklarına kadar değişmektedir. Başlangıç yaşı değişkendir. Heterozigot SLC6A8 eksikliği olan dişi bireylerin yaklaşık %50'sinde öğrenme ve davranış problemleri mevcuttur. KES yaygınlığı YGB'li bireylerde daha düşük olarak gözlemlenmiştir. SLC6A8 geninin dizilendiği YGB'li 100 erkek bireyde, hastalığa yol açan herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (147).

Smith-Lemli-Opitz Sendromu (SLOS): Çoklu doğumsal anomali ve entellektüel yetersizlik bulgularının öne çıktığı SLOS, kolesterol sentezinde temel bir enzim olan 7-dehidrokolesterol redüktaz eksikliği nedeniyle meydana gelen otozomal resesif bir hastalıktır. SLOS otizm, tekrarlayıcı-kendine zarar verici davranışlar, algısal hiperaktivite, vücut sıcaklığındaki düzensizlikler ve uyku bozuklukları gibi farklı davranış özellikleri ile ilişkili olabilir (148, 149). SLOS'li bireylerde otistik davranış sıklığı %50'-%80'e olarak bildirilmiştir (150). Bir çalışmada SLOS tanılı çocukların dörtte üçünde %50'sinin OB, diğer kısmının ise BTA-YGB olarak YGB'ye dahil olduğu tespit edilmiş; anormal metabolitler ile otistik semptomların varlığı veya ciddiyeti arasında bir ilişki ortaya konamamıştır (151).

2.7.5. Çevresel, Ailesel ve Diğer Etkenler

Otistik bireylerin ebeveynleri genellikle sosyoekonomik düzeyi yüksek, takıntılı, çocuğa yeterli zaman ayırmayan, nisbeten duyarsız kişiler olarak tanımlanmalarına rağmen yeterli veri mevcut değildir. Bu durum sağlık hizmetlerine ulaşabilme ve bu hizmetleri kullanabilme bilinci ile ilişkili olabilir (152). İleri baba yaşının çocuklarda otistik bozukluk ve diğer bazı psikiyatrik bozukluklar ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu durumda germ hücrelerinde artmış genetik bozukluk ihtimalinin sonraki nesilde risk oluşturduğu kanaatine varılmıştır (153). Otistik bireylerin ailelelerinde normal popülasyona göre daha fazla sosyal zorluklar, anksiyete bozuklukları ve duygusal değişiklikler olduğu belirtilmiş (154) olup bunun otistik bireyin aileye etkisine bağlı olarak gelişebileceği düşünülse de ebeveynlerde görülen depresyon kliniğinin otizmin ortaya çıkmasından önce var olduğu ifade edilmektedir (155). Son çalışmalarda ise otistik bireylerin ebeveynlerinin diğer gelişimsel bozukluklara sahip bireylerin ebeveynlerinden, çocuk büyüme ve kişilik yapısı gibi yönleriyle farklı olmadığı anlaşılmıştır. Fakat ebeveynler çocuk kaynaklı olarak daha sonradan farklı psikiyatrik bulgular gösterebilmektedirler (156).

Son yirmi yılda dikkat çekici şekilde artan otizm yaygınlığı ve tek yumurta ikizlerinde otizm için tam olmayan uyum nedeniyle otizmin çevresel nedenleri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Otizmlili bireylerin düşük tehdidi, mekonyum aspirasyonu, annede kanamalar gibi perinatal etkenlere daha sık maruz kaldıkları tespit edilmiştir (157). Ayrıca düşük doğum ağırlığı ve zor doğuma bağlı durumlara da sık rastlanmaktadır (158). Yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) yaygın kullanımı ve terbutalin, mizoprostol gibi tokolitik ajanlar otizm nedenleri arasında değerlendirilirken; anne karnında valproik asit, talidomid gibi ilaçlara maruziyetin de otizme neden olduğu anlaşılmıştır (159, 160). Uzun süreli, 632 çocukta yapılan bir çalışmada gebelik esnasında anti epileptik ilaçlara (AEİ) maruz kalanlar değerlendirildiğinde; valproata maruz kalanlarda otizm gelişme riskinin AEİ'lere maruz kalmayanlara göre yedi kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu çalışma valproat kullanan kadınların gebelikteki otizm riski nedeniyle bilgilendirilmesi gerektiğini göstermiştir (161). Geçirilmiş enfeksiyonlar, radyasyon maruziyeti, gebelikte kanlanma değişiklikleri de muhtemel çevresel nedenler arasındadır.

Otizimde immünolojik faktörlerin de rol alabileceği düşüncesiyle bu yönde çalışmalar yapılmış ve halen devam etmektedir. Farklı antikor eksiklikleri nedeniyle takip edilen bir gurup otistik çocukta, intravenöz immün globülin (IVIG) tedavisi sonrası otistik bulgularda azalma gözlenmiştir (162). Otoimmünitinin otizm etyolojisinde rol oynayabileceğine dair çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır (163).

Çocukluk çağı aşıları yavaş başlangıçlı otizmin anlaşılmasına başlandığı dönemlerde uygulanması itibarıyla ilgi odağı olmuştur. Koruyucu olarak %50 oranında thimerosal içeren organik civalı aşılarda, hiç civa içermeyen kızamık-kabakulak-kızamıkçık (KKK) gibi aşılarda çalışılmıştır. Yapılan çoklu çalışmalar ve bilimsel kanıtlar aşılama ve otizm arasında herhangi bir ilişkinin varlığını desteklememiştir (164, 165, 166, 167).

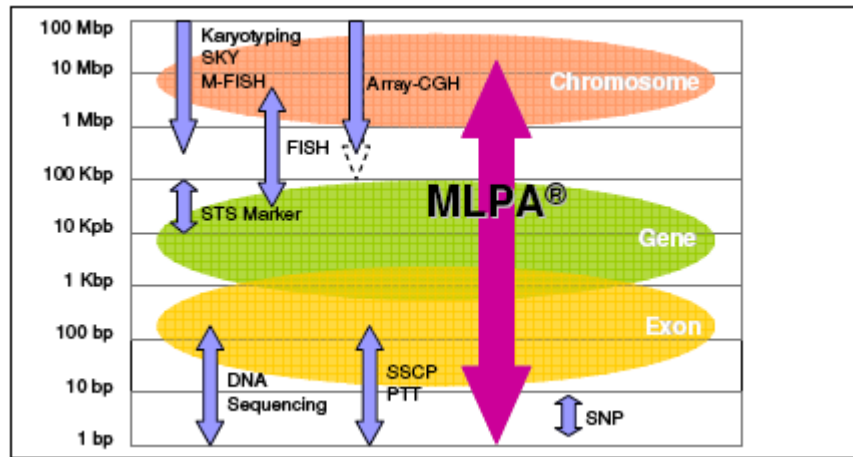
Otistik bireylerde plazma serotonin düzeylerinin düşüklüğünden bahsedilmiş ancak bu durum zihinsel yetersizliği olan bireylerde de gözlemlendiği için özgün bir bulgu olarak değer kazanmamıştır. Otizmle ilişkisi olduğu düşünülen beyin bölgeleri glutamat açısından zengin olup antagonist uygulamasıyla otizm bulgularının ortaya çıktığı ifade edilmiştir (168). Laktik asidoz ve karnitin düşüklüğünün az olmayan oranda görülmesi otizmin mitokondriyal bir hastalık olabileceğini akla getirmiştir (169). Dopaminin başlıca metaboliti olan homovanilik asidin beyin-omurilik sıvısında (BOS) yüksekliği basmakalıp davranışlar ve klinik gerileme ile ilişkili olarak bildirilmiştir (159).

Yapılan bir çalışmada bazı otistik bireylerde melatonin salgılanma bozukluğundan bahsedilmiş olup bu durumun serotonine bağlı sorunlarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (170). Tiroid salıverici hormon (TRH) uyarı testi sonrası tiroid uyarıcı hormon (TSH) tavan düzey düşüklüğünü ve tersi olarak tiroid hormon fonksiyonlarının normal olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (171).

2.8. Otizm ve Genetik Analizler

Otizm etyolojisinde rol oynayan genetik değişiklikler bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı yöntemlerle incelenmiştir. Bunlardan MLPA yöntemi spesifik DNA dizilerinin kopya sayısı değişikliklerini belirlemeye yönelik bir yöntemdir. MLPA küçük DNA dizilerinin KSD'lerini incelemeye kullanılan aCGH ve SNP microarray yöntemlerine göre daha ucuz, basit, hızlı, uygulaması ve yorumlaması

kolay bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Tek primer çiftiyle 50 kadar probun aynı anda amplifiye edilebilmesi birden fazla gende farklı bölgelerin değerlendirilebilmesini sağlar. MLPA yöntemi nokta mutasyonları gösterebilen ancak KSD'ler hakkında bilgi vermeyen dizi analizine göre avantajlıdır. FISH tekniği daha büyük delesyonları gösterebilen bir yöntemdir. MLPA'nın çoklu bölgelerde daha küçük dizileri analiz edebilmesi FISH tekniğine göre önemli bir üstünlüktür. MLPA tüm genom araştırmalarında uygun bir teknik olmasa da farklı küçük dizileri aynı anda değerlendirmeye olanak tanınması geniş kullanım alanı bulmasını sağlamıştır.



Şekil 2.6. MLPA yönteminin diğer yöntemlerle karşılaştırması (172)

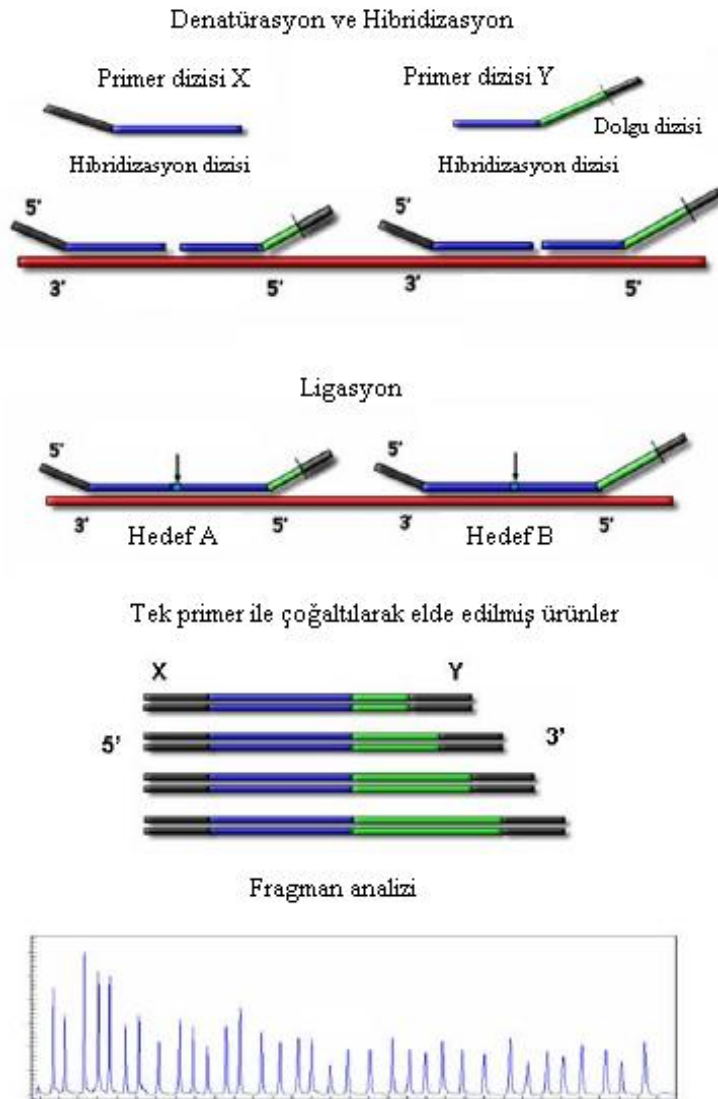
2.9. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Yöntemi

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi 2002'de Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanarak relatif kantitatif Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi olarak tariflenmiştir (173). MLPA; 50'ye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PCR'dan sonra eş zamanlı olarak anormal kopya sayısı değişikliklerinin değerlendirilebildiği bir yöntemdir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. Tek bir evrensel primer çifti kullanılır. Oluşan fragment uzunlukları 130-480 baz çifti (bç) arasında olduğundan jel paternine uygundur. Sonuçlar kontrol örnekleriyle karşılaştırılarak hangi dizinin delesyon,

insersiyon veya nokta mutasyonu taşıdığı tespit edilir. MLPA reaksiyonunda amplifikasyon için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterli olmaktadır. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu hızlı, ucuz ve uygulanması kolaydır. Gerekli ekipmanlar ise çoğu moleküler laboratuvarında bulunabilmektedir (172). Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış problemler 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe spesifik olan dizi bulunur. Probun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 3' oligonükleotid parçasının uzunluğu dolgu dizisinden dolayı 440 nükleotid uzunluğuna ulaşabilmekte ve 100 nükleotidi aşan oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından dolayı kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA'sı kullanılmıştır. M13 DNA'sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA'yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' uçundan kesmektedir. 35-42 prob içeren kitler genellikle problemler arasında 6 yada 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problemler farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı problemlerin birbirleri ile heterodupleks formasyonunu önlemek için problemlerin sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren M13 kaynaklı MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziye spesifik sentetik oligonükleotidler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki problemler amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. M13 kaynaklı

oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları sayesinde analizde avantaj sağlanmıştır. Hibridize olan hedefe spesifik kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (173).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problemler için bir çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi FAM [N-(3- fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmiştir (174). MLPA yöntemi mRNA araştırmalarında, birçok hastalık grubundaki genomik değişiklikleri saptamada da kullanılabilir (172).



Şekil 2.7. MLPA yönteminin bütüncül görünümü (172)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Aletler

Pipet takımı (Gilson)

Vorteks (Heidolph)

Derin Dondurucu (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

Spektrofotometre (Nano Drop 1000)

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI 3130)

Mikrosantrifüj (Sigma)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

ABI 3130 36 cm Kapiller (ABI)

Eppendorf Tüpü 1,5 ml (Eppendorf)

ABI 3130 yükleme tüpleri (ABI)

0.2 ml PCR tüpü

PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA Ekstraksiyon Kiti (Qiagen p/n 69504)

Salsa MLPA SHANK3 ve Autism-1 Probe Mix (Salsa P339 A1/P343 C1-MRC Holland)

Performans Optimize Edici Polimer 7 (POP7 TM) (ABI)

10X EDTA lı Buffer (ABI)

Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Mineral Yağ (Roche)

Proteinaz K (Qiagen)

Distile Su

Etanol (95%) (Tekel)

3.1.3. SALSA MLPA P339-A1 (lot1209) ve P343-C1 AUTİSM-1 (lot0310)

Prob Kitleri

P339-A1 kiti uzunlukları 130-490 nükleotid (nt) arasında değişen 47 farklı probu içerir. İlave olarak içerdiği 120 nt'den küçük dokuz kontrol probunun dördü miktar fragmentleri (Q-fragments) iken üç tanesi DNA denatürasyon kontrol fragmentidir. Mevcut kit 23 eksonlu SHANK3 geninin her eksonu için bir prob ve 5, 8, 10 ve 19.-23. eksonlar için iki veya daha fazla sayıda prob içermektedir (172).

P343-C1 kiti ise uzunlukları 124-500 nt arasında değişen 49 adet prob içermektedir. İlave olarak içerdiği 110 nt'den küçük dokuz kontrol probunun dördü miktar fragmentleri (Q-fragments) iken üç tanesi DNA denatürasyon kontrol fragmentidir. P343-C1 kiti üç farklı kromozomal bölge için prob içermektedir. Bunlar; 15q11-13 (15q11'de lokalize UBE3A, 15q12'de lokalize GABRB3 ve CHRNA7'yi içeren 15q13 mikrolelesyon bölgesi) bölgesi, 16p11 mikrolelesyon bölgesi ve 22q13'te bulunan SHANK3 genidir. 15q11 bölgesi için 18, 15q13 bölgesi için 8, 16p11.2 bölgesi için 11, 22q13 bölgesi için 3 ve referans olarak da 9 prob içermektedir (172).

Tablo 2.2. Salsa MLPA P339-A1 SHANK3 Prob Kiti Bölgeleri (172)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	other	SHANK3
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 05745-L05183	1p12		
139 ±	SHANK3 probe 14165-L15775			Exon 10
147 ±	SHANK3 probe 14166-L15776			Exon 17
154 ±	SHANK3 probe 14167-L15777			Exon 7
160 ± ✕	SHANK3 probe 14168-SP0145-L15778			Exon 11
166 ±	SHANK3 probe 14719-L15794			Exon 13
173 ±	SHANK3 probe 14169-L17279			Exon 1
178 ±	SHANK3 probe 14170-L17280			Exon 4
184 ±	SHANK3 probe 14171-L17281			Exon 12
190 ±	SHANK3 probe 14172-L15782			Exon 19
196 ±	SHANK3 probe 14173-L15783			Exon 5
202	Reference probe 01482-L01090	16q24		
208 ±	SHANK3 probe 14721-L15799			Exon 22
214 ±	SHANK3 probe 14175-L15785			Exon 10
220 ± ✕	SHANK3 probe 14176-SP0146-L15786			Exon 20
226 ±	SHANK3 probe 14177-L15787			Exon 8
232 ± ✕	SHANK3 probe 14178-SP0147-L15788			Exon 5
238 ±	TCFL5 probe 10533-L11097		20q13 salt reference probe	
246 ±	SHANK3 probe 14179-L17853			Exon 16
253 ± ✕	SHANK3 probe 14180-SP0148-L17852			Exon 19
260 ±	SHANK3 probe 14181-L17851			Exon 3
266 ±	SHANK3 probe 14182-L15792			Exon 9
274	Reference probe 08883-L08939	18q21		
281 ±	SHANK3 probe 14183-L15793			Exon 21
290 ∩	MAPK8IP2 probe 05111-L04495		22q13.33	
297 ∩	ARSA probe 02707-L14005		22q13.33	
304 ±	SHANK3 probe 14185-L15795			Exon 23
312	Reference probe 05718-L05157	6p11		
319 ∩	ACR probe 06087-L05542		22q13.33	
326 ±	SHANK3 probe 14720-L15798			Exon 21
337 ∩	ACR probe 06735-L05557		22q13.33	
346 ±	SHANK3 probe 14187-L15797			Exon 14
355	Reference probe 08052-L07833	5p15		
364	Reference probe 08584-L08585	17q23		
373 ±	SHANK3 probe 14718-L15796			Exon 2
382 ∩	RABL2B probe 06734-L05558		22q13.33	
391 ±	SHANK3 probe 14190-L15800			Exon 15
400 ± ✕	SHANK3 probe 14191-SP0149-L15801			Exon 6
409	Reference probe 05555-L05044	13q14		
418 ±	SHANK3 probe 14192-L15802			Exon 23
427 ±	SHANK3 probe 14193-L15803			Exon 18
436	Reference probe 13473-L11733	2p25		
445 ±	SHANK3 probe 14195-L15805			Exon 20
462 ±	SHANK3 probe 14196-L15806			Exon 22
474 ±	SHANK3 probe 14197-L15807			Exon 8
483 ±	SHANK3 probe 14198-L15808			Exon 23
490	Reference probe 12463-L13464	9q31		

Tablo 2.3. Salsa MLPA P343-C1 Prob Kiti Bölgeleri (172)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	15q11-q13 / exon	16p11 SHANK3
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
124	Reference probe 09176-L09350	17q11 - salt reference probe; reduced signal → salt present!		
130	Reference probe 09727-L10077	12q24		
136	ATP10A probe 12964-L14669		15q12 Exon 1	
142	UBE3A probe 10883-L11553		15q11 Exon 9	
148	GABRB3 probe 10872-L11542		15q12 Exon 7	
154	Reference probe 09431-L09680	11q13		
160	UBE3A probe 04620-L14668		15q11 Exon 7	
166	KLF13 probe 08376-L08230		15q13 Exon 2	
172	HIRIP3 probe 11667-L14670			Exon 3
178	NDNL2 probe 08377-L08231		15q13 Exon 1	
184	GABRB3 probe 10868-L11538		15q12 Exon 5	
190	Reference probe 09979-L10438	19p13		
197	UBE3A probe 10880-L11550		15q11 Exon 6	
202	APBA2 probe 01314-L00867		15q12 Exon 14	
208	SEZ6L2 probe 11668-L12439			Exon 1
214	SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906		15q11	
220	GABRB3 probe 01315-L09339		15q12 Exon 10	
226	DOC2A probe 13162-L12447			Exon 4
232	SHANK3 probe 06787-L07383			Exon 22
238	MAZ probe 11669-L12440			Exon 5
244	UBE3A probe 10886-L14677		15q11 Exon 12	
250	Reference probe 02658-L02125	11q23		
256	UBE3A probe 01317-L00864		15q11 Exon 13	
265	Reference probe 10243-L02149	1q44		
270	ATP10A probe 11165-L12883		15q12 Exon 6	
286	CHRNA7 probe 12956-L08237		15q13 Exon 4	
292	GABRB3 probe 10875-L11545		15q12 Exon 9	
300	TJP1 probe 08389-L14671		15q13 Exon 1	
309	SHANK3 probe 06784-L06376			Exon 3
319	GABRB3 probe 10870-L11540		15q12 Exon 6	
328	Reference probe 05297-L04685	3q11		
337	CD2BP2 probe 11671-L12442			Exon 4
346	MVP probe 00550-L00372			Exon 1
355	GABRB3 probe 10867-L11537		15q12 Exon 4	
364	SPN probe 11672-L12443			Exon 2
373	TRPM1 probe 08397-L14672		15q13 Exon 27	
382	GABRB3 probe 10874-L11544		15q12 Exon 8	
391 *	SHANK3 probe 14190-L15800			Exon 15
409	Reference probe 07208-L06858	7p14		
418	MAZ probe 11673-L12444			Exon 6
427	SCG5 probe 12951-L14742		15q13 Exon 6	
436	OCA2 probe 02040-L01553		15q12 Exon 22	
445	OCA2 probe 02041-L03725		15q12 Exon 1	
454	HIRIP3 probe 11674-L12445			Exon 4
465	MAPK3 probe 11675-L12446			Exon 5
475	SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795		15q11	
481	LAT probe 11677-L12448			Exon 3
492	SCG5 probe 12954-L14464		15q13 Exon 3	
500	Reference probe 10218-L14675	7q22		

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hasta Gurubu

Bu çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na Aralık 2011-Nisan 2012 tarihlerinde başvuran, DSM-IV tanı kriterlerine göre otistik bozukluk ya da diğer YGB tanısı alan, Tıbbi Genetik Polikliniği'nde dismorfik açıdan değerlendirilerek kromozom ve Frajil X analizleri yapılan 80 olgu dahil edilmiştir. Olgulara ve ailelere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve her ebeveyne ve/veya olguya onam formu imzalatıldıktan sonra olgular çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 09.12.2011 tarih ve 2011/58 sayılı onay alınmıştır.

Olguların kan örnekleri EDTA'lı tüp içerisinde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Otizm açısından sağlıklı beş bireyin periferik kan örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Otistik bozukluk ya da diğer YGB tanısı alan olguların ve kontrol bireylerinin periferik kanlarından elde edilen DNA örnekleri 22q13'te bulunan SHANK3 geni, 15q11-13 bölgesi ve 16p11 mikrodelesyon bölgesi için delesyon ve duplikasyonlar açısından MLPA yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.2. 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.

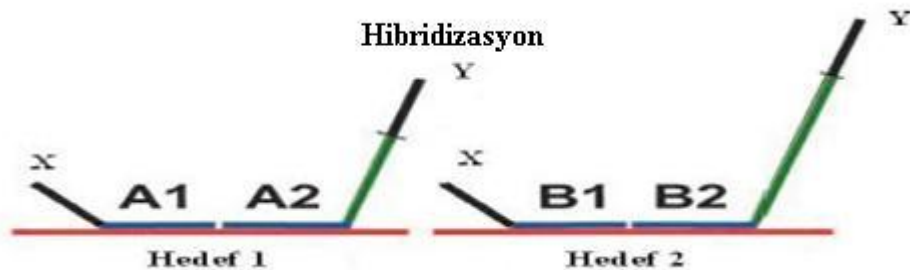
- 100 µl hasta kan örneği ependorf tüpüne eklenmiştir.
- PBS tamponu çalkalanıp karıştırıldıktan sonra ependorf tüpüne 120 µl eklenmiştir.
- Bu karışım 15 sn. vortekslenmiştir.
- 56 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Çok kısa süreli santrifüj edilmiştir.
- %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 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 filtratlı 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.

3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

DNA Denatürasyonu ve SALSA MLPA P339-A1 ve P343-C1 Probe Karışımları İle Hibridizasyonu

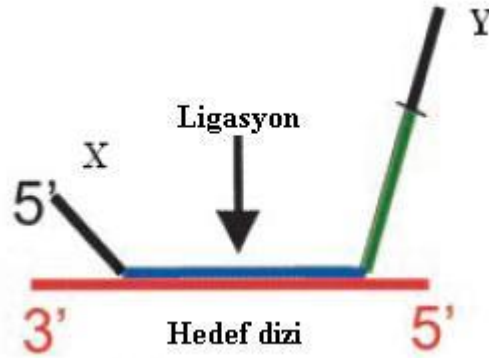
- Elde edilen DNA örneklerinden 5 µl (20-250 ng DNA) alınarak 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarılmıştır.
- 98 °C de 5 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlanmıştır.
- Sonrasında örnekler 25 °C'ye soğutulmuştur.
- 25 °C'deki DNA örneğinin üzerine 1,5 µl SALSA Probe Miks (P339-A1/ P343-C1) ve 1,5 µl MLPA Buffer ilave edilip pipetaj ile homojenize edilmiştir.
- Sonraki aşamada buharlaşmayı önlemek için PCR strip tüplerinin üzerine 5 µl mineral yağ eklenmiştir.
- Daha sonra örnekler 95 °C de 1 dk. inkübe edilip 60 °C de 16-18 saat hibridizasyona bırakıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. MLPA probunun hedef diziye hibridizasyonu (173)

Ligasyon Reaksiyonu

- Hibridizasyon süresinin sonunda termal cycler cihazının sıcaklığı 54 °C ye düşürüldü.
- Hibridizasyon ürününe 32 µl Ligaz-65 karışımı (25 µl steril su, 3 µl Ligaz-65 Buffer A, 3 µl Ligaz-65 Buffer B, 1 µl Ligaz-65) ilave edildi.
- 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra ligaz inaktivasyonu için 98 °C de 5 dk. bekletildi.
- Sıcaklık 4 °C'ye düşürülerek sabitlendi (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Proben iki parçası ligaz tarafından birleştirilmesi (173)

PCR

- Ligasyon reaksiyonu ürünleri bulunan strip tüplerine, hazırlanmış olan polimeraz karışımından (7,5 µl steril su, 2 µl SALSA PCR primer, 0,5 µl SALSA polimeraz) oda sıcaklığında 10 µl eklenerek pipetaj yapıldı ve PCR başlatıldı (Şekil 3.3).

-PCR şartları:

Denatürasyon 30 sn 95 °C
 Annealing 30 sn 60 °C
 Ekstansiyon 60 sn 72 °C

} 35 döngü

Son Ekstansiyon 20 dk 72 °C



Şekil 3.3. Prob amplifikasyon ürünleri (173)

ABI 3130 Cihazına Yükleme

- PCR bitiminde elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 0,7 µl alınarak ABI 3130 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.

- Daha sonra üzerlerine:

0.3 µl internal size standart (Rox 500)

9 µl formamid eklenerek pipetajla homojenize edildi.

- Örnekler 80 °C de 2 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.

- Devamında örnekler buz üzerine alındı.

- ABI 3130 cihazında; 36 cm kapillerlere 1,6 kV de 15 saniye enjeksiyon zamanı, 60 °C ve 10 kV de 30 dakika yürütme zamanı şartları sağlandı.

- Daha sonra ABI 3130 cihazına yüklenerek, Gene Mapper programında okutulmaya başlandı.

- Her örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları elde edildi.

Değerlendirme

Farklı uzunluktaki MLPA amplifikasyon ürünleri kapiller elektroforez ile ayrıştırıldı. Örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları GeneMapper v4.0 programı ile değerlendirildikten sonra excel dosyası formatında kaydedildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerine ait pik alanları Ezersoftware programına aktarıldı. Normal örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi. Ezersoftware programı tarafından test örneğinin bütün pik alanları, her bir pik alanının (internal kontrol pikleri) o çizgideki bütün piklerin toplam pik alanına bölünmesiyle birbirlerine göre oranları tayin edildi. Bu oranlar, sağlıklı olan ve kontrol olarak alınmış, örneklerle aynı testte çalışılmış beş örnekten elde edilen pik alanlarının (eksternal kontrol pikleri) ortalama sonuçları ile kıyaslandı ve doz tayinine gidildi.

Kontrol olarak otizm açısından normal olduğu bilinen vakaların pikleri eksternal kontrol olarak kullanıldı. Her testte 5 eksternal kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı. Relatif kantitatif PCR yöntemi olan MLPA ile değerlendirme yapılırken Ezersoftware programı otomatik olarak internal kontrol ve ekstrenal kontrol pik değerleri ile aşağıdaki formülü kullanarak her bir prob spesifik bölge için doz tayini yapmaktadır:

$$\begin{array}{c}
 \text{Hasta T. P. A. D.} \\
 \hline
 \text{Hasta P. A. T. D. (İ.P.A.)} \\
 \hline
 \text{Doz Oranı} = \frac{\text{1. Kontrol T. P. A. D.} \quad \text{2/3/4. Kontrol T. P. A. D.} \quad \text{5. Kontrol T. P. A. D.}}{\text{1. Kontrol P. A. T. D.} \quad \text{2/3/4. Kontrol P. A. T. D.} \quad \text{5. Kontrol P. A. T. D. (E.P.A.)}} \\
 \hline
 5
 \end{array}$$

T. P. A.D. :Test Piki Alan Değeri

P. A. T.D. :Pik Alanları Toplam Değeri

İ. P. A. :İnternal Pik Alanları

E. P. A. :Eksternal Pik Alanları

Yöntem gereği olarak, program tarafından test edilen prob bölgesi için, doz oranı 0,7 ve 1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, 0,5'den küçük değerlerde delesyon yani doz eksiği olduğu, 1,8'den büyük değerlerde amplifikasyon yani doz fazlası olduğu belirtilmektedir. 0,5 ile 0,7 ve 1,3 ile 1,8 arası değerlerde ise gri alan olarak değerlendirilmektedir.

Gri alan olarak belirlenmiş değer aralıklarındaki bölgeler, Ezersoftware programında yer alan doğrulama bölümünde gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı yönünde tekrar incelenmişlerdir. Burada elde edilen pik değerlerinin gerçek bir delesyon veya amplifikasyon olup olmadığı, bu pik değerinin elde edildiği hastanın sentetik prob büyüklüğü ile kontrollerin sentetik prob büyüklükleri karşılaştırılarak doğrulanmaktadır. Gri alan formülü şu şekilde tanımlanabilir:

Hasta Spesifik Prob Alanı

Hasta Mutasyonlu Prob Alanı

Gri Alan Formülü:

Kontrollerin Ortalama Spesifik Prob Alanı

Kontrollerin Ortalama Hasta Mutasyonlu Alana
Karşılık Gelen Bölge Alanı

Gri alan formülü uygulanmış bölgenin sonuçları, doz oranı 0,7 ve 1,3 değerleri arasında hesaplandığında örneğe ait bu bölgenin normal dozda olduğu, $\leq 0,7$ değerlerinde bölgede kesin delesyon yani doz eksiği olduğu, $\geq 1,3$ değerlerinde ise kesin amplifikasyon yani doz fazlası olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda DSM-IV tanı kriterlerine göre otistik bozukluk ya da diğer YGB tanısı alan 80 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların detaylı fizik muayenesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniğinde, kromozom analizi ve MLPA analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Olguların demografik ve tanı bilgileri hasta dosyalarından temin edilmiştir.

4.1. Araştırma Grubu Olgularının Demografik Özellikleri

Çalışma gurubumuza dahil edilen hastaların 64'ü erkek, 16'sı kızdı (Tablo 4.1). Bireylerin yaş ortalaması $8,89 \pm 3,94$ yıl olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. Olguların cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	N	%
Kız	16	20
Erkek	64	80
Toplam	80	100,0

4.2. Araştırma Grubu Olgularının Klinik ve Sitogenetik Özellikleri

Çalışmamızda DSM-IV'e göre YGB ana tanısı altında olguların 56'sına OB, 13'üne atipik otistik bozukluk (AOB), 5'ine AS, 3'üne Rett sendromu ve 3'üne DB tanısı konuldu. 7 olguda ise YGB'ye DEHB eşlik ettiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda olguların 3'ünde konvansiyonel yöntemlerle yapılan analizlerde sitogenetik anomali saptanmış olup diğer olgularda yapısal ve sayısal kromozomal anomali tespit edilmemiştir. Olguların cinsiyetleri, yaşları gibi demografik bilgileri yanında kromozom ve MLPA analizi sonuçları ve olguların DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom ve MLPA analizi sonuçları ve DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları

Protokol No	Cinsiyet	Yaş	Kromozom Analiz Sonucu	MLPA Analiz Sonuçları	Tanı
1	E	18	45,XY,rob(13;14)	N	OB
2	E	13	46,XY	N	OB
3	E	4	46,XY	N	OB
4	E	9	46,XY	N	OB
5	E	8	46,XY	N	OB
6	E	10	46,XY	N	OB
7	E	12	46,XY	N	OB
8	E	11	46,XY	N	OB
9	E	10	46,XY	N	OB
10	E	4	46,XY	N	OB
11	E	13	46,XY	N	OB
12	E	9	46,XY	N	OB
13	E	5	46,XY	N	OB
14	E	7	46,XY	N	OB
15	E	4	46,XY	N	OB
16	E	5	46,XY	N	OB
17	E	12	46,XY	N	OB + DEHB
18	E	12	46,XY	N	OB
19	E	9	46,XY	N	AOB
20	E	7	46,XY	N	OB
21	E	9	46,XY	N	AS + DEHB
22	E	9	46,XY	N	OB
23	E	8	46,XY	N	OB + DEHB
24	K	14	46,XX	N	OB
25	E	7	46,XY	N	AOB
26	E	10	46,XY	Del 16p11.2	OB
27	E	6	46,XY	N	AOB + DEHB
28	E	6	46,XY	N	AOB
29	E	11	46,XY	N	OB + DEHB
30	K	11	46,XX	N	OB

Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom ve MLPA analizi sonuçları ve DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları (Devamı)

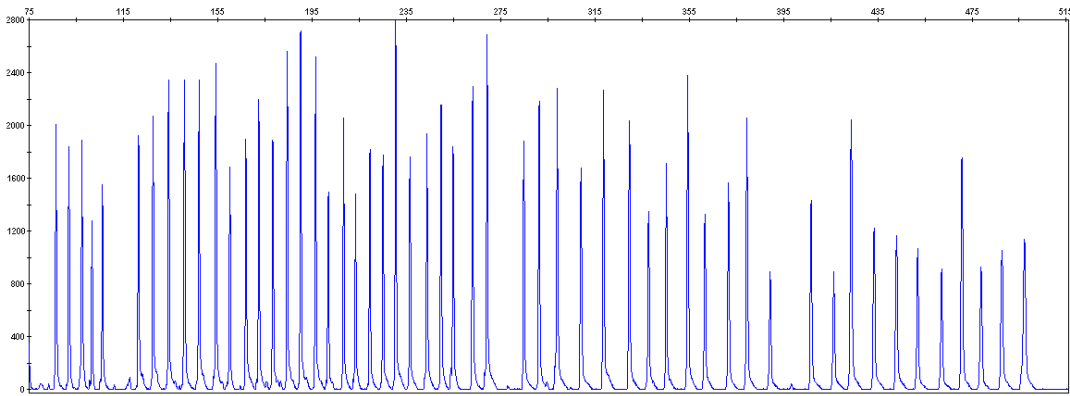
31	E	6	46,XY	N	OB
32	E	16	46,XY	N	AOB
33	E	9	46,XY	N	OB
34	E	8	46,XY	N	AS
35	K	16	46,XX,invdupdel(8)	N	OB
36	E	6	46,XY	N	OB
37	K	13	46,XX	N	AS
38	K	7	46,XX	N	OB
39	K	10	46,XX	N	OB
40	K	4	46,XX	N	OB
41	E	7	46,XY	N	OB
42	E	10	46,XY	N	AOB
43	E	4	46,XY	N	OB
44	E	5	46,XY	N	OB
45	E	11	46,XY	N	OB
46	K	4	46,XX	N	Rett Sendromu
47	K	12	46,XX	N	OB
48	E	5	46,XY,inv(X)	N	OB
49	E	7	46,XY	N	AOB
50	K	9	46,XX	N	AS
51	E	9	46,XY	N	OB
52	E	11	46,XY	N	OB
53	E	13	46,XY	N	OB
54	E	16	46,XY	N	OB
55	E	4	46,XY	N	AOB
56	E	11	46,XY	N	OB
57	K	17	46,XX	N	Rett Sendromu
58	K	6	46,XX	N	Rett Sendromu
59	E	10	46,XY	N	OB
60	E	4	46,XY	N	AOB
61	E	12	46,XY	N	OB
62	E	7	46,XY	N	AOB
63	K	7	46,XX	N	OB
64	E	6	46,XY	N	OB

Tablo 4.2. Olguların Cinsiyetleri, Yaşları, Kromozom ve MLPA analizi sonuçları ve DSM-IV-TR'ye göre konulan tanıları (Devamı)

65	E	7	46,XY	N	AOB
66	E	7	46,XY	N	AOB
67	K	23	46,XX	N	AS
68	E	12	46,XY	N	OB
69	E	15	46,XY	N	DB
70	E	4	46,XY	N	OB
71	E	6	46,XY	N	OB
72	E	7	46,XY	N	DB
73	E	13	46,XY	N	OB
74	E	10	46,XY	N	OB
75	K	10	46,XX	N	OB
76	E	4	46,XY	N	DB
77	E	3	46,XY	N	OB
78	K	6	46,XX	N	AOB
79	E	3	46,XY	N	OB
80	E	6	46,XY	N	OB

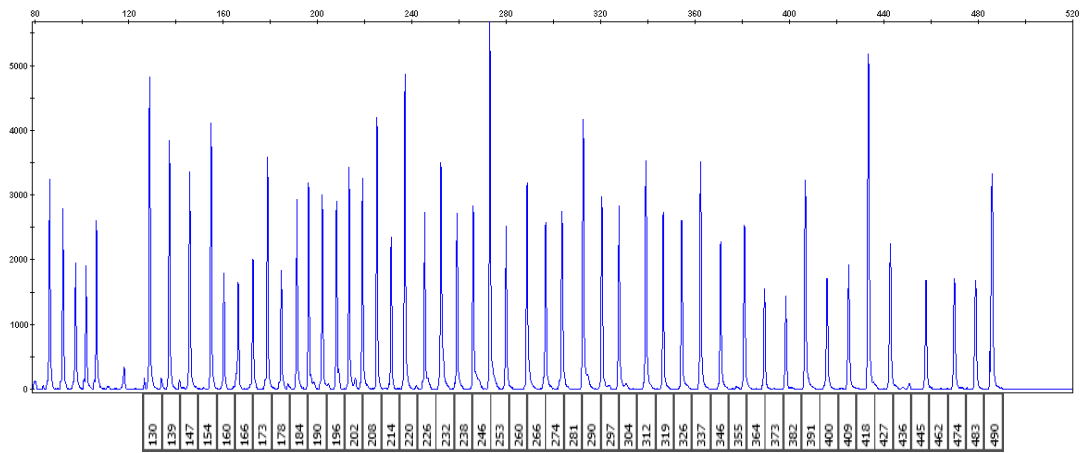
4.3. Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları

Çalışma grubundaki olguların periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde MLPA P339-A1 (lot1209) ve P343-C1 AUTİSM-1 (lot0310) kitleri kullanılarak MLPA yöntemi çalışıldı. Örnekler ABI 3130 kapiller elektroforez cihazına yüklenerek GeneMapper v4.0 programı ile incelendi. PCR işlemi sonucunda elde edilen ve fragment uzunlukları farklı olan ürünler program tarafından kolayca ayırt edilerek fragment miktarı ve büyüklüğüne göre pik olarak görüntülenir (Şekil 4.1).

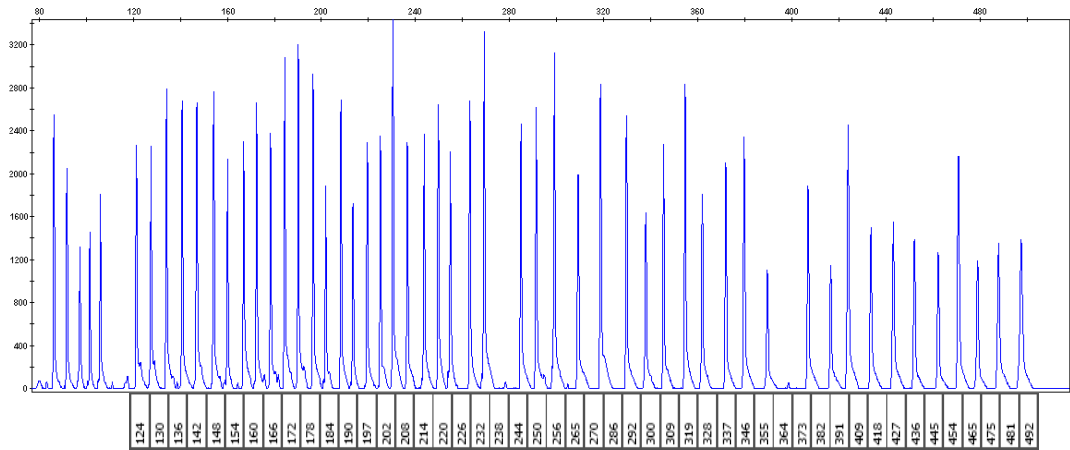


Şekil 4.1. Örnek analiz pik görüntüsü

Mevcut pik alanları nonspesifik pikler silindikten sonra Excel programına aktarılarak kaydedildi. Daha sonra Excel formatına alınan pik alanları, yine Excel tabanlı çalışan Ezersoftware programında değerlendirmeye alındı. Bu programda kontrol pikleri ile hasta pikleri karşılaştırılarak ortalama bir değer elde edilir. Bu değer 0,7'nin altında ise delesyon yönünde, 1,3'ün üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilir. Genemapper programında elde edilen piklerin boyutu öncelikli olarak DNA miktarıyla orantılıdır. Kaliteli ve yeterli miktarda (50- 500 ng) DNA elde edilemeyen örneklerde pikler düşük ve nonspesifik olabilmektedir. DNA miktarının düzeyini belirleme işlemi, başlangıç prob pikleri olan DQ (DNA Quantity) fragmentlerine göre yapıldı. Bu pikler 64, 70, 76, 82 bç uzunluğunda, ligasyon olmasa da görülen piklerdir. Elde edilen prob piklerine göre bu kontrol piklerini karşılaştırarak DNA miktarı belirlenebilmektedir. Böylece bu kontrol pikleri elde edilen prob piklerine göre büyükse DNA miktarının yeterli olmadığını göstermekte, eğer bu kontrol pikleri prob piklerinden küçük veya görünmüyor ise DNA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir. Her çalışmada sağlıklı olduğu bilinen 5 bireyin periferik kanından elde edilen DNA örnekleri internal kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışmada kullanılan kontrollere ait pik görüntüleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

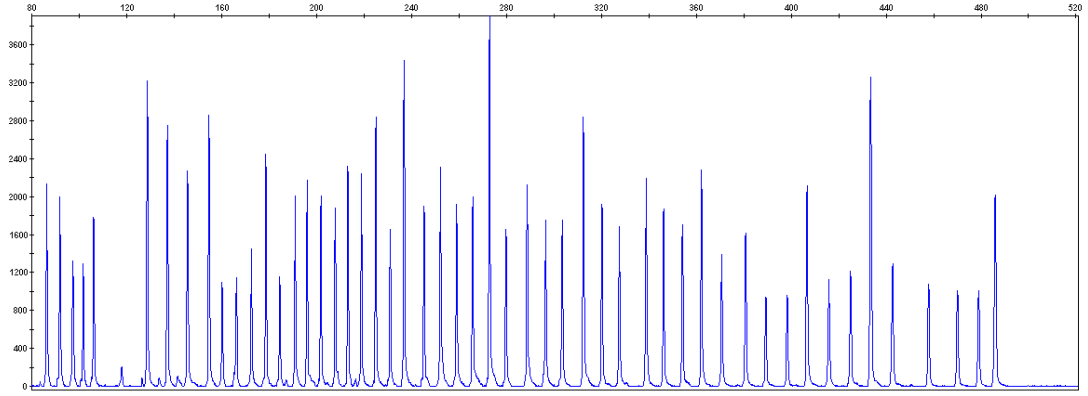


Şekil 4.2. Kontrollere ait MLPA Salsa P339-A1 pik görüntüleri

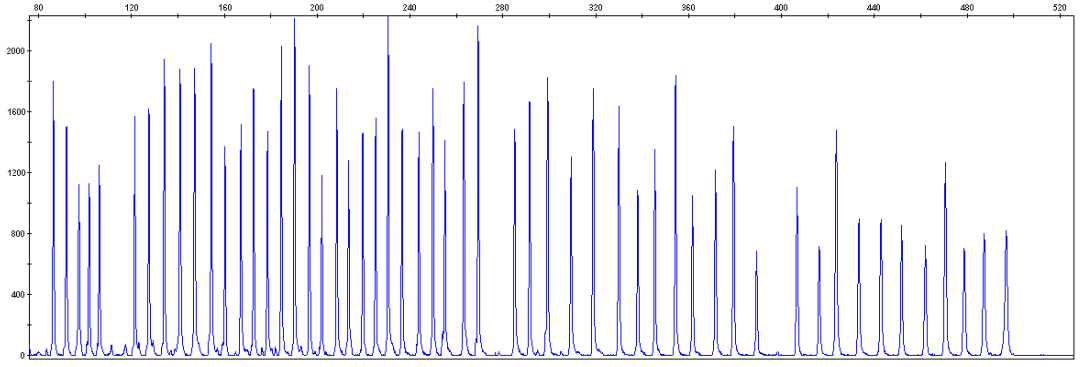


Şekil 4.3. Kontrollere ait MLPA Salsa P343-C1 pik görüntüleri

Olguların ve kontrol bireylerinin periferik kanlarından elde edilen DNA örnekleri 22q13'te bulunan SHANK3 geni, 15q11-13 bölgesi ve 16p11 mikrodelsiyon bölgesi için delesyon ve duplikasyonlar açısından incelenerek pik görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen piklerin alanları kontrollerin alanları ile karşılaştırılmak üzere Ezersoftware programına aktarılmış ve değerlendirilmiştir. Pikler hem görsel olarak hem de program aracılığıyla analiz edilmelidir. Şekil 4.4 ve 4.5'te normal bireylere ait pikler görülmektedir. Yazılım değerlendirmesi sonrası elde edilen normal bireylere ait örnek sonuçlar ise Tablo 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Normal bir bireye ait MLPA Salsa P339-A1 pik görüntüleri



Şekil 4.5. Normal bir bireye ait MLPA Salsa P343-C1 pik görüntüleri

Tablo 4.3 ve 4.4'te son sütunda yer alan değerler, hasta ile kontrollerin karşılaştırılması sonucu elde edilen oranları göstermektedir. Bu oranlar 0,5'in altında ise kesin delesyon, 1,8'in üstünde ise kesin amplifikasyon olarak değerlendirilir. Ezersoftware programında yer alan bir özelliğe göre de 0,5-0,7 ve 1,3-1,8 arasındaki değerler gri zon olarak tanımlanmakta ve örnekler doğrulama işlemi için yeniden değerlendirmeye alınmaktadır.

Tablo 4.3. Normal bir olguya ait P343-C1 Prob piklerinin analiz görüntüsü

Length	SALSA MLPA probe P343-C1	Chr# Pos# Ref#	exon	SONUÇ
92	D-fragments			0,9717
124	Reference probe 09176-L09350			1,0487
130	Reference probe 09727-L10077	12q24		1,0815
136	ATP10A probe 12964-L14669	15q12	Exon 1	1,0087
142	UBE3A probe 10883-L11553	15q11	Exon 9	1,0465
148	GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	Exon 7	1,0590
154	Reference probe 09431-L09680	11q13		1,0511
160	UBE3A probe 04620-L14668?	15q11	Exon 7	1,1023
166	KLF13 probe 08376-L08230	15q13	Exon 2	0,9604
172	HIRIP3 probe 11667-L14670		Exon 3	1,0227
178	NDNL2 probe 08377-L08231	15q13	Exon 1	1,0963
184	GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	Exon 5	1,1009
190	Reference probe 09979-L10438	19p13		1,0002
197	UBE3A probe 10880-L11550	15q11	Exon 6	0,9565
202	APBA2 probe 01314-L00867	15q12	Exon 14	1,0785
208	SEZ6L2 probe 11668-L12439		Exon 1	1,0592
214	SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11		1,0682
220	GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	Exon 10	1,0401
226	DOC2A probe 13162-L12447		Exon 4	1,1238
232	SHANK3 probe 06787-L07383			0,9292
238	MAZ probe 11669-L12440		Exon 5	1,0777
244	UBE3A probe 10886-L14677	15q11	Exon 12	1,0329
250	Reference probe 02658-L02125	11q23		1,0801
256	UBE3A probe 01317-L00864	15q11	Exon 13	0,9703
265	10243-L02149	1q44		0,8807
270	ATP10A probe 11165-L12883	15q12	Exon 6	0,9925
286	CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13	Exon 4	1,0312
292	GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	Exon 9	0,9684
300	TJP1 probe 08389-L14671	15q13	Exon 1	1,0834
309	SHANK3 probe 06784-L06376			0,9879
319	GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	Exon 6	1,0441
328	Reference probe 05297-L04685	3q11		1,0039
337	CD2BP2 probe 11671-L12442		Exon 4	0,9297
346	MVP probe 00550-L00372		Exon 1	0,9562
355	GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	Exon 4	0,9662
364	SPN probe 11672-L12443		Exon 2	1,0709
373	TRPM1 probe 08397-L14672	15q13	Exon 27	1,0538
382	GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	Exon 8	0,9078
391	SHANK3 probe 14190-L15800			0,8886
409	Reference probe 07208-L06858	7p14		0,9866
418	MAZ probe 11673-L12444		Exon 6	0,9620
427	SCG5 probe 12951-L14742	15q13	Exon 6	0,8963
436	OCA2 probe 02040-L01553	15q12	Exon 22	0,9063
445	OCA2 probe 02041-L03725	15q12	Exon 1	0,9222
454	HIRIP3 probe 11674-L12445			0,9853
465	MAPK3 probe 11675-L12446			0,9243
475	SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11		0,9120
481	LAT probe 11677-L12448		Exon 3	1,0224
492	SCG5 probe 12954-L14464	15q13	Exon 3	0,9722
500	Reference probe 10218-L14675			0,9216

Bu tabloda 22q13'te bulunan SHANK3 geni, 15q11-13 bölgesi ve 16p11 mikrolelesyon bölgesi kromozomal bölgelerine karşılık gelen problemlerin analiz sonuçları gösterilmiştir. Tabloda gösterilen bu hastada herhangi bir delesyon ya da

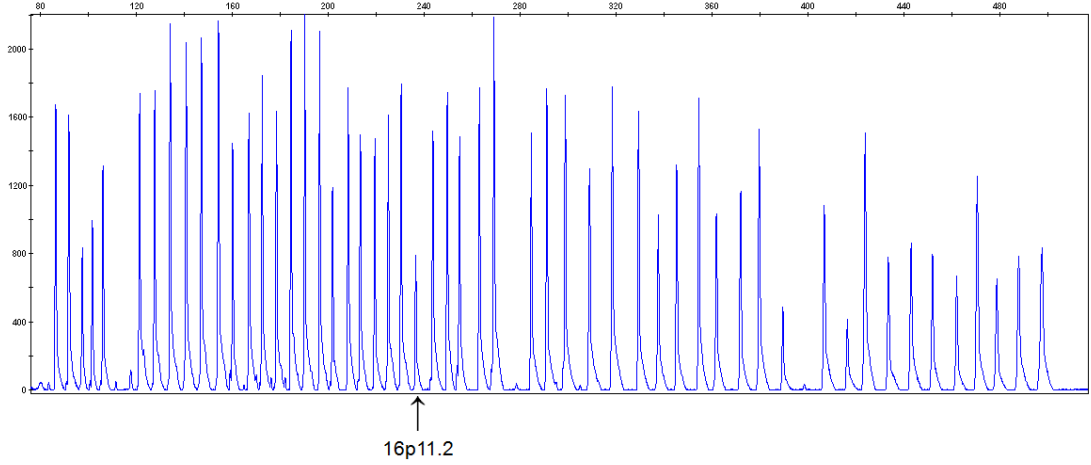
amplifikasyon görülmemiştir. Yeşil renk ile gösterilen bölgeler normal olarak değerlendirilmiş bölgelerdir.

Tablo 4.4. Normal bir olguya ait P339-A1 Prob piklerinin analiz görüntüsü

Length	SALSA MLPA P339-A1 probe	Chr# Pos# Ref#	exon	SONUÇ
92	D-fragments			1,0552
130	05745-L05183	01p12		0,9691
139	14165-L15775	22q13.33	Exon 10	1,0064
147	14166-L15776	22q13.33	Exon 17	0,9734
154	14167-L15777	22q13.33	Exon 7	0,9629
160	14168-SP0145-L15778	22q13.33	Exon 11	0,9441
166	14719-L15794	22q13.33	Exon 13	0,9567
173	14169-L17279	22q13.33	Exon 1	0,9966
178	14170-L17280	22q13.33	Exon 4	0,9532
184	14171-L17281	22q13.33	Exon 12	1,0178
190	14172-L15782	22q13.33	Exon 19	0,9507
196	14173-L15783	22q13.33	Exon 5	0,9671
202	01482-L01090	16q24.3	Exon 10	0,9658
208	14721-L15799	22q13.33	Exon 22	0,9148
214	14175-L15785	22q13.33	Exon 10	0,9558
220	14176-SP0146-L15786	22q13.33	Exon 20	1,0126
226	14177-L15787	22q13.33	Exon 8	1,0132
232	14178-SP0147-L15788	22q13.33	Exon 5	0,9483
238	10533-L11097	20q13.33		1,0278
246	14179-L17853	22q13.33	Exon 16	0,9606
253	14180-SP0148-L17852	22q13.33	Exon 19	1,0130
260	14181-L17851	22q13.3322q13.33	Exon 3	1,0068
266	14182-L15792	22q13.33	Exon 9	1,0098
274	08883-L08939	18q21.32	Exon 1	1,0724
281	14183-L15793	22q13.33	Exon 21	0,9588
290	05111-L04495	22q13.33	Exon 12	1,0196
297	02707-L14005	22q13.33	Exon 1	0,9907
304	14185-L15795	22q13.33	Exon 23	0,9485
312	05718-L05157	06p11.2		1,0524
319	06087-L05542	22q13.33	Exon 3	1,0132
326	14720-L15798	22q13.33	Exon 21	0,9441
337	06735-L05557	22q13.33	Exon 1	0,9917
346	14187-L15797	22q13.33	Exon 14	1,0578
355	08052-L07833	05p15.2	Exon 62	0,9748
364	08584-L08585	17q23.2	Exon 18	1,0561
373	14718-L15796	22q13.33	Exon 2	0,9932
382	06734-L05558	22q13.33	Exon 9	1,0021
391	14190-L15800	22q13.33	Exon 15	0,9541
400	14191-SP0149-L15801	22q13.33	Exon 6	0,9671
409	05555-L05044	13q14.3	Exon 21	1,0000
418	14192-L15802	22q13.33	Exon 23	0,9667
427	14193-L15803	22q13.33	Exon 18	1,0052
436	13473-L11733	02p25.3	Exon 17	1,1023
445	14195-L15805	22q13.33	Exon 20	0,9517
462	14196-L15806	22q13.33	Exon 22	1,1358
474	14197-L15807	22q13.33	Exon 8	0,9977
483	14198-L15808	22q13.33	Exon 23	0,9722
490	12463-L13464	09q31.2	Exon 2	1,0518

Bu tabloda 22q13'te bulunan SHANK3 genine karşılık gelen problemlerin analiz sonuçları gösterilmiştir. Tabloda gösterilen bu hastada herhangi bir delesyon ya da

amplifikasyon görülmemiştir. Yeşil renk ile gösterilen bölgeler normal olarak değerlendirilmiş bölgelerdir.



Şekil 4.6. 16p11.2 mikrolelesyon bölgesinde delesyon saptanan hastaya ait MLPA pik görüntüleri ve delesyon görülen prob bölgesi

Araştırma gurubundaki olgulardan birinde (26 no'lu olgu) saptanmış olan 16p11.2 mikrolelesyon bölgesindeki delesyonun pik görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Delesyonlu pikin diğer piklere göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu olgudan elde edilen piklerin alanları kontrollerin alanları ile karşılaştırılmak üzere Ezersoftware programına aktarılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. 16p11.2 mikrolelesyon bölgesine ait saptanan delesyonun Ezersoftware programında değerlendirme sonuçları

Length	SALSA MLPA probe P343-C1	Chr# Pos# Ref#	exon	SONUÇ
92	D-fragments			0,9936
124	Reference probe 09176-L09350			1,0435
130	Reference probe 09727-L10077	12q24		0,9262
136	ATP10A probe 12964-L14669	15q12	Exon 1	1,2413
142	UBE3A probe 10883-L11553	15q11	Exon 9	1,1378
148	GABRB3 probe 10872-L11542	15q12	Exon 7	0,9980
154	Reference probe 09431-L09680	11q13		1,1542
160	UBE3A probe 04620-L14668?	15q11	Exon 7	0,9757
166	KLF13 probe 08376-L08230	15q13	Exon 2	1,1065
172	HIRIP3 probe 11667-L14670		Exon 3	1,1866
178	NDNL2 probe 08377-L08231	15q13	Exon 1	1,2686
184	GABRB3 probe 10868-L11538	15q12	Exon 5	0,9718
190	Reference probe 09979-L10438	19p13		0,8544
197	UBE3A probe 10880-L11550	15q11	Exon 6	0,8799
202	APBA2 probe 01314-L00867	15q12	Exon 14	1,1032
208	SEZ6L2 probe 11668-L12439		Exon 1	1,1778
214	SNRPN-HB2-85 probe 12718-L13906	15q11		1,0526
220	GABRB3 probe 01315-L09339	15q12	Exon 10	0,9292
226	DOC2A probe 13162-L12447		Exon 4	1,1639
232	SHANK3 probe 06787-L07383			0,7200
238	MAZ probe 11669-L12440		Exon 5	0,5394
244	UBE3A probe 10886-L14677	15q11	Exon 12	1,1235
250	Reference probe 02658-L02125	11q23		1,0819
256	UBE3A probe 01317-L00864	15q11	Exon 13	1,0405
265	10243-L02149	1q44		0,8360
270	ATP10A probe 11165-L12883	15q12	Exon 6	0,8900
286	CHRNA7 probe 12956-L08237	15q13	Exon 4	0,9325
292	GABRB3 probe 10875-L11545	15q12	Exon 9	0,9976
300	TJP1 probe 08389-L14671	15q13	Exon 1	1,0676
309	SHANK3 probe 06784-L06376			1,2174
319	GABRB3 probe 10870-L11540	15q12	Exon 6	1,2635
328	Reference probe 05297-L04685	3q11		1,0187
337	CD2BP2 probe 11671-L12442		Exon 4	0,9505
346	MVP probe 00550-L00372		Exon 1	1,0820
355	GABRB3 probe 10867-L11537	15q12	Exon 4	0,8773
364	SPN probe 11672-L12443		Exon 2	1,2186
373	TRPM1 probe 08397-L14672	15q13	Exon 27	1,0498
382	GABRB3 probe 10874-L11544	15q12	Exon 8	0,9029
391	SHANK3 probe 14190-L15800			0,7477
409	Reference probe 07208-L06858	7p14		0,9836
418	MAZ probe 11673-L12444		Exon 6	0,7147
427	SCG5 probe 12951-L14742	15q13	Exon 6	0,9458
436	OCA2 probe 02040-L01553	15q12	Exon 22	0,9246
445	OCA2 probe 02041-L03725	15q12	Exon 1	0,9927
454	HIRIP3 probe 11674-L12445			1,0739
465	MAPK3 probe 11675-L12446			0,9874
475	SNRPN-HB2-85 probe 12720-L13795	15q11		0,8980
481	LAT probe 11677-L12448		Exon 3	0,9840
492	SCG5 probe 12954-L14464	15q13	Exon 3	1,1268
500	Reference probe 10218-L14675			0,8924

Bu tabloda 22q13'te bulunan SHANK3 geni, 15q11-13 bölgesi ve 16p11 mikrolelesyon bölgesi kromozomal bölgelerine karşılık gelen problemlerin analiz sonuçları gösterilmiştir. Tabloda gösterilen bu hastada 16p11.2 mikrolelesyon

bölgesinde delesyon saptanmıştır. Yeşil renk ile gösterilen bölgeler normal olarak değerlendirilmiş bölgelerdir. Gri zon ile uyumlu değerlerde doğrulama formülü kullanılarak saptanan delesyonun gerçek bir delesyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tüm olgular aynı kriterlerle değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Otizm; yaşamın ilk dönemlerinde başlayan, sosyal ilişki ve etkileşimde bozulma, sözel ve sözel olmayan iletişimde gerilik, tekrarlayıcı ve basmakalıp davranışlarla karakterize, etkileri yaşam boyu devam eden YGB kapsamında değerlendirilen çevresel ve genetik faktörlerin ortak rol oynadığı nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizmde zeka geriliğine ve diğer bazı farklı tıbbi durumlara sık rastlanması, genetik etyolojiye yönelik çalışmaların umut verici şekilde ilerlemesi biyolojik faktörlerin etken olduğu bir bozukluk olma ihtimalini daha da güçlendirmiştir (7, 8). Kalıtsal değişikliklerdeki karmaşık ve henüz belirlenememiş küçük etkileşimler de muhtemel nedenler arasındadır. İkiz ve aile çalışmaları otizm genetiğini aydınlatmada yol gösterici olmuş, otizmde kalıtımın %90'dan fazla olabileceğinden bahsedilmiştir (10). Otizmlili bireylerin % 20'sinde genetik neden ortaya konabilmektedir. Çok az bir kısmında teratojenik etkenler suçlanırken vakaların çoğunda etyolojik altyapı aydınlatılamamaktadır. Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi YGB'li çocukların yaklaşık %5'inde kromozom anöploidilerini ortaya koymaktadır. Kromozom anomalilerinin %3-5'lik kısmı ise FISH teknikleri kullanılarak tayin edilebilmektedir. Otizmde hemen her kromozomda anomali bulunmasına rağmen, bunlardan sadece bir kaçının otizm genleri için muhtemel lokusları içerdiği düşünülmektedir. Otizm tanısı farklı kriter ve ölçeklerin kullanıldığı yöntemlerle klinik olarak konulmaktadır ve henüz kesin tanı konulabilecek bir moleküler yöntem mevcut değildir (11, 12). Otizmin genetik etyolojisinin aydınlatılmasına yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Farklı teknikler kullanılan bu çalışmalarda otizmle ilişkilendirilmiş farklı genler tanımlanmış ve tanımlanmaya devam etmektedir.

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğine başvuran, DSM-IV kriterlerine göre değerlendirilerek YGB tanısı alan, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda kromozom analizi FMR1 geni taramaları yapılan 80 olgu dahil edilmiştir. 80 olgunun 56'sı OB, 13'ü AOB, 5'i AS, 3'ü Rett sendromu ve 3'ü DB olarak tanımlanmıştır. Olguların DNA örnekleri MLPA yöntemiyle, otizme yönelik hazırlanmış olan P339-A1 ve P343-C1 prob kitleriyle çalışılmış, incelenen prob bölgelerindeki

amplifikasyon ve/veya delesyonlar araştırılmıştır. Çalışmamızda YGB'de aday genleri içeren bölgeler olarak tanımlanan 15q11-13 (15q11'de lokalize UBE3A, 15q12'de lokalize GABRB3 ve CHRNA7'yi içeren 15q13 mikrolelesyon bölgesi) bölgesi, 16p11 mikrolelesyon bölgesi ve 22q13'te bulunan SHANK3 geni mutasyonlarının Eskişehir bölgesinde tanı alan olgulardaki sıklığının belirlenmesi, yöntemin avantaj-dezavantajlarının ortaya konması ve tanısal amaçlı kullanılabilirliği, elde edilen veriler ile moleküler etyolojisi belirlenmiş olan olgulara hastalığı ve mutasyonu ile ilgili genetik danışmanın verilmesi amaçlanmıştır. Böylece otizmin moleküler etyolojisinin anlaşılması, tanımlanan mutasyonlar dışında başka bir mutasyonun olup olmadığının belirlenmesi, Türk popülasyonuna ait veri tabanına da katkıda bulunulması sağlanacaktır.

Yüksek çözünürlüklü kromozom analizi ile YGB'li olgularda kromozom anomalilerinin görülme olasılığı yaklaşık %5 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda olguların 3'ünde konvansiyonel yöntemlerle yapılan analizlerde sitogenetik anomali saptanmış olup diğer olgularda yapısal ve sayısal kromozomal anomali tespit edilmemiştir. Kromozom anomalisi oranı % 3,75 olarak tespit edilmiştir ve bu oran literatür ile benzerlik göstermektedir. 1 nolu olguda saptanan 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)mat anomalisi daha önce bildirilmiştir (175). Ancak bu anomali toplumda sık görülmekte olup otizmle ilgisinin olmadığı düşünülmektedir. 35 nolu olguda 46,XX,invdupdel(8)(qter→p23.1::p23.1→p11.2:) anomalisi saptanmıştır. Literatürde konuşma geriliği, otizm ve öğrenme zorluğu kliniğiyle distal 8p duplikasyonu olan bir vaka bildirilmiştir. Ayrıca bizim olgumuza benzer şekilde mental retarde, yapısal beyin anomalileri olan 7 vaka bildirilmiştir. Bunların hepsinde inversiyon-duplikasyon(8) ve 3'ünde 8p telomer delesyonu saptanmıştır. 48 nolu olguda saptanan 46,XY,inv(X)(p22q22) anomalisi ile ilgili olarak otizm ve mental retardasyonu olup perisentromerik X kromozom inversiyonuna sahip olan bir vaka bildirilmiştir (176).

16p11.2 delesyon sendromunu ilk defa Ghebranious ve ark. multipl konjenital anomalisi (MKA) ve hafif-orta zeka geriliği olan tek yumurta ikizi kardeşlerde array CGH yöntemini kullanarak 2007'de tanımlamışlardır (177).

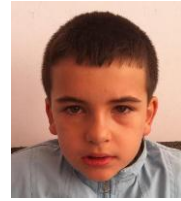
Otizimli hastalarda ilk tanımlayanlar ise Weiss ve ark. (77) ve Kumar ve ark.'dır (178). Weiss ve ark. (77) 16p11.2 delesyonlarını veya duplikasyonlarını

toplam 512 otizmlı olguda SNP array yöntemi ile değerlendirmişler, 5 olguda delesyon saptamışlardır. Olguların kliniğinde gelişme ve zeka geriliği ile birlikte YGB tanımlanmıştır. 1 olgudaki delesyon hafif mental retardasyonlu anne kaynaklı iken 4'ü de novo olarak belirtilmiştir. Sonuçta bu bölgenin nörogelişimsel olarak önemli olduğunu ve buradaki değişikliklerin otizme yatkınlıkta önemli olduğu yorumunda bulunmuşlardır.

Kumar ve ark. (178) array CGH yöntemi ile inceledikleri 712 olguda 2'si anne ve 2'si baba kaynaklı olduğu bildirilen toplam 4 tane 16p11.2 delesyonu saptamışlardır. Bir olguda aşağı dönük palpebral fissürler, öne doğru dönük kulaklar ve geniş burun köprüsü gibi minör dismorfik bulgulardan bahsedilirken diğerlerinde dismorfik özelliklerden bahsedilmemiştir. Pedigri analizlerine bakıldığında ebeveynlerin etkilenmemiş oldukları görülmektedir. 16p11.2 delesyonu otizme tek başına mı neden olmaktadır, yoksa diğer faktörlerin de katkısıyla çoklu bir etkenin parçası olarak mı etyolojide rol oynamaktadır sorusuna verilecek cevabın net olmadığını ifade etmişlerdir. Yine de mevcut bulguların otizm için önemli bir veri olduğunu ve bu bölgenin farklı mutasyonlarının ilerleyen zamanlarda incelenmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Rosenfeld ve ark. (79) toplam 820 YGB'li olguyu array CGH yöntemi ile incelemişler 6 olguda mikrodelesyon ve 3 olguda mikroduplikasyon saptamışlardır. Olgulara ait klinik veriler ayrı ayrı verilmemiş olup dismorfik bulguların da dahil olduğu geniş bir spektrumdan bahsedilmiştir. Olguların 3'ünün ebeveyn analizi yapılabilmemiş ve hepsinin de novo olduğu bildirilmiştir. 16p11.2 bölgesindeki değişikliklerin konuşma geriliği ve davranış problemleri üzerinde daha belirgin etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır. Delesyon saptanan olgumuzda konuşamama, hırçın davranışlar gösterme, algılamasının ifade etme yeteneğinden çok daha iyi seviyede olması bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu bölge ile ilgili değişikliklerin kliniğe farklı yansımaları sadece genetik faktörlerin değil diğer faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmekte olup; araştırmalarda farklı moleküler yöntemlerle birlikte diğer etkenlerin de incelenmesinin faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda 26 no'lu olguda 16p11.2 delesyonu saptanmıştır. Delesyon oranı %1,25 olup literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Olgumuzda konuşamama, YGB, hırçın davranışlar ve belirgin kulak lobları fenotipi mevcuttur. Bu yönüyle 16p11.2 delesyonu saptanan olguların tanımlanmış klinik verileriyle uyuşmaktadır. Olgumuzun ebeveyn analizi yapılmış olup, olgumuzda saptanan delesyonun de novo olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonucunda 16p11.2 bölgesinin nispeten sık ve öncelikli olarak bakılması gerekli olan bölgelerden olduğu kanaatine varılmıştır.



Bremer ve ark. 2009'da MLPA yöntemiyle 148 hastayı farklı genomik bölgeler üzerindeki değişik aday genlerin KSD'leri açısından incelemişler ve 2 olguda (%1,3) UBE3A ve GABRB3 genlerinin bulunduğu 15q11.2-15q12 bölgesinde duplikasyon saptamışlardır (179). Duplikasyon saptanan olguların birinde minör dismorfik bulgular mevcutken diğer olgunun muayenesi normal olarak bildirilmiştir. Aynı duplikasyona sahip olgularda farklı klinik bulguların varlığını bu bölgedeki duplikasyonların fenotipe değişken olarak yansımalarıyla açıklamışlardır. Bizim çalışmamız olgu sayısının sınırlı olması ve problemlerin farklı eksonlara özgü dizaynı nedeniyle bu değişiklikler açısından bilgi verici olmamıştır. 15q11-13 bölgesindeki penetrans yokluğu ve ekspressivite farklılığı gibi epigenetik faktörlerin incelenmesi açısından metilasyon spesifik çalışmaların yapılmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Cai ve ark. 2008'de toplam 279 otizmlili olguyu MLPA yöntemi ile incelemişler; 2 olguda TUBGCP5, MKRN3, NDN ve GABRB3 genlerinde, 1 olguda GABRB3 ve ATP10A genlerinde, 1 olguda da MKRN3 ve NDN genlerinde duplikasyon saptamışlardır. 2 olguda konuşma geriliği dışında herhangi bir klinik bulgudan bahsedilmemişken; 1 olguda dolikosefali, aşağı dönük palpebral fissürler, öne doğru çıkık gözler, geriye doğru açılanmış belirgin kulaklar, geniş burun kökü ile birlikte belirgin burun köprüsü, uzun-dar yüz görünümü, yüksek damak ve eklem gevşekliği gibi bulguların varlığı tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi GABRB3'ün otizme yatkınlıkta oynadığı rolün önemine tekrar değinildiğini bildirmişlerdir (180). GABRB3, ATP10A, OCA2 ve APBA2 bizim de bu çalışma ile ortak olarak değerlendirdiğimiz genlerdir. Çalışmamızda bu genlere ait

herhangi bir değişikliğin saptanamamasında prob bölgelerinin farklılığı ve sınırlı olgu sayısı faktörlerinin etken olduğu kanaatindeyiz.

Ben-Shachar ve ark. 2009'da yaptıkları bir çalışmada 8200 olguyu aCGH yöntemi ile değerlendirmişler 20 olguda 15q13.3 bölgesinde delesyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Olguların kliniğinde gelişme geriliği, zeka geriliği ve/veya sınırda zeka bölümü, YGB, konuşma geriliği, agresif davranışlar, DEHB ve diğer davranış anomalilerinden bahsedilmiş ve 8'inin ebeveyn analizini yapılabildiği bildirilmiştir. Saptanan delesyonlardan sadece 1 tanesi de novo, 3'ü anne ve 3'ü de baba kaynaklı olarak belirtilmiş olup; her 3 anne de fenotip olarak normalken babalardan 2'sinde öğrenme zorluğu ve bipolar bozukluk saptanmıştır. Ebeveyn analizi yapılamayan 1 olgunun kardeşinde de fenotipik bulguların varlığıyla birlikte delesyon saptanmasını delesyonun kalıtsal olduğu yönünde değerlendirmişlerdir (73). Delesyon saptanan annelerin normal fenotipe, babalardan 2'sinin ise öğrenme zorluğu ve bipolar bozukluğa sahip olması kalıtımda anne-baba farkının önemini düşündürmektedir. Cook ve ark. 15q11-13 bölgesinin maternal duplikasyonunun otizme yatkınlık oluşturan bir durum olduğunu, paternal duplikasyonunun etkisinin ise çok az olduğunu belirtmişlerdir (181). Maternal 15q kalıtımının nörogelişimsel bozukluklarla yakından ilişkili olduğunu Repetto ve ark. (182) ve Roberts ve ark. (183) da yaptıkları çalışmalar ile desteklemişlerdir. Aynı şekilde Christian ve ark. 2008'de yaptıkları bir çalışmada baba kaynaklı duplikasyonların fenotipe etkisinin kesin olmadığını belirtmektedir (184).

Christofolini ve ark. (185) 2012'de yaptıkları çalışmada bir olguda SNP array ile UBE3A ve GABRB3 genlerini içeren 15q11.2-q13.2 bölgesinde triplikasyon, CHRNA7 genini içeren 15q13.2-15q13.3 bölgesinde duplikasyon saptamışlardır. Ebeveyn array analizlerinin normal olarak sonuçlandığı ve böylece olgudaki genetik değişikliğin de novo olduğu bildirilmiştir. Tanısının DSM-IV kriterlerine göre otizmle uyumlu olduğu belirtilen olgunun klinik özellikleri yukarı dönük palpebral fissürle birlikte minör dismorfik özellikler, yüksek damak, hafif şaşılık ve öne dönük burun delikleri, tekrarlayıcı el ve baş hareketleri, göz temasından kaçınma ve entellektüel yetersizlik olarak ifade edilmiştir. GABA(A) reseptör geni alt birimlerindeki KSD'lerin farklı çalışmalarda (186, 187) epilepsi, otizm ve diğer nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirildiğini ancak henüz GABA

reseptörlerindeki artmış ekspresyonun hiçbir çalışmada direk olarak otizmle ilişkilendirilemediğini bildirmişlerdir. Scoles ve ark.'nın (188) yaptığı çalışmada maternal ekprese olan UBE3A geninde saptanan aşırı ekspresyonun 15q duplikasyonundaki otistik bulguların birincil sorumlusu olduğuna atıfta bulunarak bu çalışmada saptanan aynı genin triplikasyonunun otizm gelişiminde önemli olduğu yorumunu bulunmuşlardır. Rutin kromozom analizi çalışmalarında kolayca saptanamayan, otistik olgularda sık gözlenen 15q proksimal bölge duplikasyonlarının tespiti için moleküler yöntemlerin kullanılmasının gerekliliğini vurgulamışlardır. 15. kromozom ile ilgili yapılacak yeni çalışmaların otizm konusunda daha aydınlatıcı veriler sağlayabileceğinden bahsetmişlerdir.

Pagnamenta ve ark. (91) 3 olgu ile 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada SNP array yöntemiyle otizmdeki genomik değişimleri araştırmışlar ve 15q13.3 bölgesinde delesyon saptamışlardır. Olgularda konuşma geriliği, otistik bulgular, dismorfik bulguların olmaması ortak olarak mevcutken; hiperaktivite, disdiadokokinezi, hipotoni, obsesif davranışlar, denge bozukluğu, farklı zeka bölümü değerlerinin (72, 77, 96) olması gibi değişken klinik bulgulardan bahsedilmiştir. Bu klinik yansımaların değişkenliğine çevresel faktörlerin ve düzenleyici genlerin neden olabileceği düşüncesini öne sürmüşlerdir. Sharp ve ark.'nın (72) farelerde yaptıkları çalışmada bu bölgede lokalize, bir sinaptik iyon kanalı proteinini kodlayan CHRNA7 genindeki delesyonun epilepsi ve anormal elektroensefalografi (EEG) bulgularına neden olduğuna dikkat çekerek bu delesyonun yakın genlerde aşırı ekspresyona yol açtığını, 15q11-13 duplikasyonunda altta yatan moleküler sebebin de bu durum olabileceğini belirtmişlerdir. Nadir bir mikrodelesyon olmasına rağmen daha ileri çalışmaların gerekliliğini ifade etmişlerdir.

Çalışmamıza dahil olan 80 olguda 15. kromozoma ait genomik değişiklik saptanamamıştır. Uniparental dizomi (UPD)'nin ve genomik imprinting gibi epigenetik değişikliklerin önemi bir kez daha bu çalışma ile vurgulanmıştır. Baz dizisinde değişiklik olmayan olgularda MLPA analizi ile genetik değişiklik saptanamamış olabilir ancak epigenetik (ör: metilasyon spesifik) çalışmaların bu olguların tespitinde yararlı olacağı düşüncesindeyiz. Düzenleyici genler ve çevrenin de otizme katkısı unutulmamalıdır.

Moessner ve ark. (189) 2007'de yaptıkları çalışmada 400 YGB'li olgudan sözel olmayan iletişim ve sosyal etkileşimde gerilikle birlikte tekrarlayan davranışları olan 3'ünde dizileme ve mikroarray CGH yöntemini kullanarak SHANK3 geninde değişik büyüklüklerde mutasyonlar saptamışlardır. Düşük baş çevresi değeri ve hipertelorizm bulguları olan olgunun mutasyonu de novo olarak belirtilmiştir. Obezite, düşük frontal saç çizgisiyle birlikte hafif dismorfizm, yarı damak ve bifid uvula ile kliniği tanımlanan olgunun delesyonu, normal fenotipe sahip ve dengeli der(14) t(14;22)(q32.33;q13.31) translokasyonu taşıyıcısı olan baba kaynaklı olarak belirtilmiştir. YGB dışında herhangi bir bulgudan bahsedilmeyen ve erkek olan 3. olgunun annesinde ve kız kardeşinde de aynı delesyon saptanmış; kız kardeşinde birkaç kelimeyle konuşma ve sinir krizleri şeklinde fenotipik değişiklikler gözlemlenirken annesinde fenotipe yansıma gözlemlenmemesi dikkat çekici olup bu durum gonadal mozaikizm ile açıklanmıştır. Ayrıca SHANK3 geninin dil-konuşma gelişiminde ve/veya sosyal iletişimde kritik bir öneme sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Durand ve ark. (86) 2007'de 227 olguyu DNA dizi analizi ve FISH yöntemi ile değerlendirmişler; otizm ve konuşma geriliği bulgularına sahip 3 ailede değişik nitelik ve büyüklükte mutasyonlar (de novo intron 8 delesyonu, ekson 21 'de insersiyon ve babanın taşıyıcı olduğu t(14;22)(p11.2;q13.33 translokasyonu) saptamışlardır. İtron 8 delesyonlu olgunun klinik özellikleri konuşma yokluğu ve orta derecede zeka geriliği olarak belirtilmiştir. İnsersiyon saptanan olgunun kardeşinde de benzer mutasyon saptanmış olup klinik olarak her ikisinde de ciddi derecede konuşma ve zeka geriliği olduğu ifade edilmiştir. Babadan yapılan periferik kan analizi, anneden yapılan periferik kan ve bukkal smear analizleri normal olarak sonuçlanmıştır. Bu durumun annedeki germinal mozaiklik ile açıklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu insersiyon bölgesine ait problemler bizim çalışmamızda mevcut olmadığından çalışmamız bu bölge açısından bilgi verici olmamıştır. Dengesiz translokasyonlu, otizm ve ciddi derecede konuşma geriliğine sahip olgu FISH ve kantitatif PCR yöntemleri ile değerlendirilmiş ve subtelomerik delesyon gösterilmiştir. Klinik ve moleküler veriler ışığında SHANK3 geninin otizmde en güçlü aday gen olduğunu, otizmdeki ciddi bilişsel yetersizlik ve dil-konuşma geriliğinin SHANK3 geni dozajı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Dhar ve ark. (190) 2010'da gelişme ve konuşma geriliği olan, farklı dismorfik özelliklere sahip, daha önce farklı yöntemlerle 22q13.3 delesyonu saptanmış 13 olguyu aCGH ve FISH yöntemleri ile incelemişler; 12 olguda aCGH ile ve 1 olguda FISH ile 22q13.3 bölgesinde farklı boyutlarda delesyonlar saptamışlardır. Sonuçları genotip-fenotip ilişkisi çerçevesinde değerlendirerek SHANK3'e yakın bölgelerdeki henüz tanımlanmamış genlerin, SHANK3 içindeki düzenleyici bölge dizilerindeki değişikliklerin, bağlı olmayan genlerin ekspressivite farklılıklarının önemine değinmişlerdir.

Çalışmamıza dahil edilen 80 olgunun DNA örneklerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda hiçbir hastada 22q13.33 bölgesinde bulunan SHANK3 geninde KSD saptanmamıştır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız incelenen bölgeler açısından Türk toplumunda bir ilktir. Çevresel faktörler ve düzenleyici genlerin rolü de göz önünde bulundurularak olgu sayısının artırılmasının ve farklı tekniklerin kullanılmasının genomik değişikliklerin tespitinde yol gösterici olabileceği düşüncesindeyiz.

MLPA; PCR esasına dayalı, kolay uygulanabilen, tek bir primer çifti ile tek tüpte 50'ye yakın probun aynı anda çoğaltılabilmesine olanak veren ve birden fazla gen bölgesinin incelenebilmesini sağlayan maliyet-etkin bir yöntemdir. Daha küçük dizileri analiz edebilmesi, aynı anda çoklu bölgeleri analize olanak tanınması FISH tekniğine göre önemli üstünlük sağlar. Bir termal cycler ve elektroforez cihazı MLPA tekniğinin yapılabilmesi için yeterlidir. Örnek sayısına bağlı olarak sonuçlar yaklaşık 24 saatte elde edilebilmektedir. Literatürde MLPA ile yapılan çalışmaların azlığı yöntemle ilgili güvenilirlik ve karşılaşılabilecek sorunların çözümü açısından bir kısıtlılık olarak karşımıza çıkmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda YGB tanısı alan 80 olguda; YGB'de aday genleri içeren bölgeler olarak tanımlanan 15q11-13 (15q11'de lokalize UBE3A, 15q12'de lokalize GABRB3 ve CHRNA7'yi içeren 15q13 mikrolelesyon bölgesi) bölgesi, 16p11 mikrolelesyon bölgesi ve 22q13'te bulunan SHANK3 geni mutasyonlarının MLPA yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın sonunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. YGB tanılı olgularda 16p11.2 delesyonu %1,25 sıklıkta saptanmıştır.
2. Olgu gurubumuzdaki genetik değişiklik literatür ile uyumlu olarak bulunmuştur.
3. Otizmde en sık saptanan kromozom anomalisi %1-3 ile anne kaynaklı Prader Willi/Angelman Sendromu kritik bölgesinin (15q11-q13) duplikasyonu iken Türk hastalarda bu bölgede mutasyon saptanamaması anlamlıdır.
4. MLPA yöntemi uygulaması kolay, çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabildiği bir yöntemdir.
5. Çalışmamız bilindiği kadarıyla ülkemizde bir ilktir. Böylelikle ülkemize ait otizm etyolojisi veri tabanına katkıda bulunularak bu konuda yapılacak farklı çalışmalara referans olunabilecektir.
6. Genetik değişiklik saptanamayan gen bölgelerine ait problemler ilerleyen dönemlerdeki çalışmalardan elde edilecek verilere göre ülkemize özgü olarak dizayn edilebilecektir.
7. Otistik bireylere ve ailelerine genetik danışmanlık verilerek bilinç düzeyinin artırılmasına katkıda bulunulabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Greenspan, S. I. Reconsidering the diagnosis and treatment of very young children with autistic spectrum or pervasive developmental disorders. *Zero to Three*, 1992,13(2); 1-9.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed). Washington DC: APB Press. 1994
3. Charman T, Baird G: Practitioner review: Diagnosis of autism spectrum disorder in 2- and 3-year-old children. *J Child Psychol Psychiatry*. 2002,43(3):289-305.
4. Fred R. Volkmar, Catherine Lord, Ami Klin, and Ed Cook, Jr., *Autism and the Pervasive Developmental Disorders Chapter 46, Child and adolescent psychiatry, a comprehensive textbook*, editor Lewis M, 2002, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
5. Rutter M. *Infantile Autism and other Pervasive Developmental Disorders*: In: Rutter M, Hersov L. (eds) *Child And Adolescent Psychiatry*, London: Blackwell Scientific Publications, 1985; 545-566.
6. Gadia C A, Tuchman R, Rotta N T: Autism and pervasive developmental disorders. *Journal de Pediatria* 2004,80:83-94.
7. Kanner L: Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 1943;2: 217-250.
8. Cohen DJ, Volkmar FR, Paul R. Issues in the classification of pervasive developmental disorders history and current status of nosology. *J Amer Acad Child Psychiatry*,1986; 25:2:158-161
9. Brud L, Fisher W, Kerbeshain J. Childhood onset pervasive developmental disorder. *J Child Psychol Psychiatry*,1988;2 (2):155-163
10. Volkmar F. *Autism and the Pervasive Developmental Disorders*. In: Lewis M: *Child and adolescent Psychiatry A Comprehensive Textbook*, 3rd Ed. Philadelphia. Lippincot Willsams & Wilkins, 2002:587-597

11. Gökler B. Çocukluk psikozlarında tanı ve sınıflandırma. Kerimoğlu E (ed). Otizm, Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1993.
12. Tsai LY, Ghazuiddin M. Autistic disorder. In: Wiener JM, Dulcan MC (Eds). Textbook of Child and Adolescent Psychiatry, New York: The American Psychiatric Publishing, 1998:219-254
13. Rutter M, Schopler E: Classification of pervasive developmental disorders:some concepts and practical considerations. J Autism Dev. Disord. 1993, 23(3): 572-5.
14. Volkmar FR, Lord C, Bailey A, Shultz RT, Klin A: Autism and pervasive developmental disorders. J Child Psychol Psychiatry. 45: 135-170, 1985
15. Baron-Cohen S: Mindblindness an assay on autism and theory of mind. Cambiridge: MIT Press. 1. 1995
16. Pomery JC. Autism and childhood psychosis. In : Garfinkel BA, Carlson GA, Weller B (Eds): Psychiatric Disorders In Children And Adolescents. Philadelphia, 1990:271-290
17. Bender L: Childhood Schizophrenia J. Autism Childhood Schizophrenia. 1980;24:5:211-220
18. Volkmar, Fred R. (Editor) Paul, Rhea (Editor) Klin, Ami (Editor), Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders, Volume 1: Diagnosis, Development, Neurobiology, and Behavior (3rd Edition), John Wiley & Sons, Incorporated, 2005.
19. Dünya Sağlık Örgütü (WHO): ICD–10 Ruhsal ve Davranışsal Bozukluklar Sınıflandırması. Dünya Sağlık Örgütü, Cenevre, 1992'den çeviri, Ed: Öztürk MO, Uluğ B, Türkiye Sinir ve Ruh Sağlığı Derneği Yayını, Ankara,1993:238–245.
20. DSM- IV Mental Bozuklukların Tanımsal ve Sayımsal El Kitabı, Dördüncü Baskı Yeniden Gözden Geçirilmiş Tam Metin (DSM-IV-TR) , Amerikan Psikiyatri Birliği, Washington DC.2000, Köroğlu E. (çev. ed.). Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 2007.

21. Lowe LH, Families of children with early childhood schizophrenia. Selected demographic information, *Arch Gen Psychiatry*. 1966;14(1):26-30.
22. Chakrabarti S., Fombonne E., Pervasive developmental disorders in preschool children, *JAMA*, 2001;285, 24, 3093-3099.
23. Yeargin-Allsop M., Rice C., Karapurkar T., Doernberg N., Boyle C., Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. 2003, *JAMA*, 289, 49–55.
24. Fombonne E, Epidemiology of pervasive developmental disorders, *Pediatric Research*, 2009 Feb 11.
25. Szatmari P, Jones MB IQ and the genetics of autism. *J Child Psychol Psychiatry* 1991,32:897-908.
26. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (1st ed). Washington DC: APB Press.1953.
27. Bryson SE: Brief report: epidemiology of autism. *J Autism Dev Disord*. 1996, 26: 165-167.
28. Mesibov G, Adams L, Klinger L: Autism: Understanding the Disorder. New York: Plenum Pres.1985.
29. Waterhouse L, Fein D, Modahlc. Neurofunctional Mechanism in Autism. *Psychological Rev*, 1996; 103:457-489
30. Belmonte M, Carper R. Neuroimaging in Child Developmental Disorders. Garreau B(ED). Springer Verlag Press, 1997.
31. Stefanatos GA. Regression in autistic spectrum disorders. *Neuropsychol Rev*. 2008 Dec;18(4):305-19.
32. Tuchman RF, Rapin I, Shinnar S. Autistic and dysphasic children, I: clinical characteristics. *Pediatrics*, 1991;88(6):1211–1218.
33. Chris Plauché Johnson and Scott M. Myers Identification and Evaluation of Children With Autism Spectrum Disorders *Pediatrics* 2007;120;1183.
34. Eric London, MD Department of Psychology, Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, NY. The Role of the Neurobiologist

- in Redefining the Diagnosis of Autism. International Society of Neuropathology. *Brain Pathol* 2007;17:408–411.
35. Ghaziuddin M, Autism and Pervasive Developmental Disorders: An Overview, Chapter 1, *Mental Health Aspects of Autism and Asperger Syndrome*, Jessica Kingsley Publishers, 2005, 13-41.
 36. Maestro S, Muratori F, Cavallaro MC. Attentional skills during the first 6 months of age in autism spectrum disorders. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, 2002; 41(10):1239-1245.
 37. Tanguay, Peter E. Pervasive Developmental Disorders. A 10-Year Review. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2000, 39(9):1079-1095.
 38. Le Couter A, Rutter M, Lord C. Autism Diagnostic Interview . A semistructured Interview for Parents and Caregivers of Autistic Persons. *J Autism Dev. Disorder*. 1989;12:317-322
 39. Rapin I. (1991) Autistic children: diagnosis and clinical features. *Pediatrics*, 87, 751-760.
 40. Lord C, Rutter M. Autism and Pervasive Developmental Disorder. *Child and Adolescent Psychiatry: Modern Approaches*. 4th, Rutter M, Taylor E, Hersov L (eds). Blackwell Science Inc. Cambridge MA. 1995.
 41. Volkmar FR, Cohen DJ: Diagnosis of pervasive developmental disorders. In : Lahey B, Kazdin A (eds): *Advances in Clinical Child Psychology*, vol2. New York, Plenum Pres, 1988: 249-284.
 42. Klin A, Shepard BA. Psychological assesment of autistic children. *Child Adolescent Psychiatry Clin North Am*, 1994: 53-70.
 43. Dawson G, Osterling J. Early intervention in autism:Effectiveness and common elements of current approaches. In : Guralnick MJ (ed) . *The Effectiveness of Early Intervention*. Second Generation Research . Baltimore, Brooks 1997.
 44. Rogers S. Empirically supported comprehensive treatments for young children with autism. *J Clin Child Psychol*. 1998;27:167-168

45. Tanguay PE, Robertson j, Derrick A. A Dimensional Classification of Autism Spectrum Disorder by Social Communication Domains. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1998;37(3):271-277.
46. Baird G, Charman T, Baron-Cohen S, Cox A, Swettenham J, Wheelwright S, Drew A: A screening instrument for autism at 18 month of age: A six-year follow-up study. *J Am Acad Child and Adolesc Psychiatry*, 2000; 39, 694-702.
47. Schreibman L, Charlop MH: Teaching autistic children to use extra-stimulus prompts. *J Exp. Child Psychol.* 1982, 33(3): 475-91.
48. Charlop MH, Kurtz PF: Too much reinforcement, too little behavior assessing task interpersonal procedures in conjunction with different reinforcement schedules with autistic children. *J Appl Behav Anal.* 1992, 25(4):795-808.
49. Ghaziuddin M, *Psychiatric Comorbidity: An Introduction*, Chapter 5, *Mental Health Aspects of Autism and Asperger Syndrome*, Jessica Kingsley Publishers, 2005, 93-109.
50. Matson JL, Nebel-Schwalm MS, Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview, *Research in Developmental Disabilities*, 2007; 28(4):341-52.
51. Danielsson S, Gillberg C, Billstedt E ve ark. Epilepsy in young adults with autism: A prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood. *Epilepsia*, 2005, 46:918-923.
52. Minshew NJ, Payton JB: New perspectives in autism, Part I: the clinical spectrum of autism. *Curr Probl Pediatr.* 1988, 18:561-610.
53. Minshew NJ, Payton JB: New perspectives in autism, Part II: the different diagnosis and neurobiology of autism. *Curr Probl Pediatr.* 1988, 18:613-94.
54. Sullivan A, Lelso J, Steward M: Mothers' views on the ages of onset for four childhood disorders. *Child Psychiatry Hum Dev.* 1990, 20: 269-27.
55. Piven J, Gayle J, Chase GA: A family history study of neuropsychiatric disorders in the adult siblings of autistic individuals. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1990, 29(2):177-83.

56. Zwaingenbaum L, Bryson S, Rogers T, Roberts W, Brian J, Szatmari P: Behavioral manifestaion of autism in the first year of life. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2005, 23(2-3):143-152.
57. McDougle CJ. *Psychopharmacology*, chapter 32. Cohen DJ, Volkmar FR (editors). *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders*. 2nd edi. 1997 John Wiley& Sons.
58. Mukaddes NM, Otistik Bozukluk, Bölüm 25, Çuhadaroğlu Çetin F (yayın yönetmeni), *Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Temel Kitabı, Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Temel Kitabı*, 242-255.
59. Lord C, Rutter ML, Le Couteur A, the Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders, *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 1994, 24:659-685.
60. Gilliam JE. *Gilliam Autism Rating Scale (GARS)*. Austin, Texas: PRO-ED, Inc; 1995.
61. Lord C. Bailey A. Autism spectrum disorders. Rutter M., Taylor E. (eds) *Child and Adolescent Psychiatry*, 4th edn. Oxford, Blackwell Publishing, pp. 2002, 636–663.
62. Yavaş İ. Otistik Bozukluk. Güleç C, Köroğlu E (Ed). *Psikiyatri Temel Kitabı*, 1. Baskı, Ankara. Hekimler Yayın Birliği, 1998:1079-1098.
63. Challman TD, Barbaresi WJ, Katusic SK, Weaver A. The yield of the medical evaluation of children with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 2003;33(2): 187-92.
64. Yorbık Ö, Özdağ MF, Söhmen T. Otistik bozuklukta EEG, BBT ve MRI inceleme sonuçları. *Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi*, 2001;2:94-98.
65. Rutter M. Genetic studies of autism: From 1970's into the millennium. *J Abnormal Child Psychology*, 2000; 28:3-14.
66. Jane E Libbey, Thayne L Sweeten. William M McMahon: Autistic disorder and viral infections. *Journal of NeuroVirology* 2005, 11:1-10.

67. 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.
68. Takahashi TN, Miles JH. Diagnostic yield of a medical evaluation of children with autism and pervasive developmental disorders. In preparation 2009.
69. Skuse DH. Imprinting, the X-chromosome, and the male brain: explaining sex differences in the liability to autism. *Pediatr Res*. 2000;47:9–16.
70. Borgatti R, Piccinelli P, Passoni D, Raggi E, Ferrarese C. Pervasive developmental disorders and GABAergic system in patients with inverted duplicated chromosome 15. *J Child Neurol*. 2001; 16:911–4.
71. Dykens EM, Sutcliffe JS, Levitt P. Autism and 15q11-q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004;10:284–91.
72. Sharp AJ, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*. 2008;40:322–8.
73. Ben Shachar S, et al. Microdeletion 15q13.3: a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders *J Med Genet*. 2009;46:382–8.
74. Marshall CR, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 2008;82:477–88.
75. Shinawi M, et al. 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.
76. Cornish K, Kogan C, Turk J, Manly T, James N, Mills A, Dalton A. The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition. *Brain Cogn*. 2005;57:53–60.
77. Weiss LA, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008;358:667–75.

78. McCarthy SE, et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet.* 2009; 41:1223–7.
79. Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, Girirajan S, Eichler EE, Shaffer LG, Ballif BC. Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord.* 2010; 2:26–38.
80. 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.
81. Gillberg C. Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord.* 1998; 28:415–25.
82. Manning MA, Cassidy SB, Clericuzio C, Cherry AM, Schwartz S, Hudgins L, Enns GM, Hoyme HE. Terminal 22q deletion syndrome: a newly recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum. *Pediatrics.* 2004;114:451–7.
83. Jha P, Sheth D, Ghaziuddin M. Autism spectrum disorder and Klinefelter syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007;16:305–8.
84. 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.
85. 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.
86. Durand CM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007;39:25–7.
87. Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux 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.

88. Sebat J, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007; 316:445–9.
89. Jacquemont ML, et al. 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.
90. Miller DT, et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet*. 2009; 46:242–8.
91. Pagnamenta AT, Wing K, Akha ES, Knight SJ, Bolte S, Schmotzer G, Duketis E, Poustka F, Klauck SM, Poustka A, Ragoussis J, Bailey AJ, Monaco AP. A 15q13.3 microdeletion segregating with autism. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:687–92.
92. Shinawi M, et al. A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*. 2009b; 41:1269–71.
93. Harris SW, et al. Autism profiles of males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*. 2008; 113: 427–38.
94. Reddy KS. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Med Genet*. 2005;6:3.
95. Goodlin-Jones BL, Tassone F, Gane LW, Hagerman RJ. Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr*. 2004; 25:392–8.
96. Farzin F, et al. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr*. 2006; 27:S137–44.
97. Loesch DZ, et al. Molecular and cognitive predictors of the continuum of autistic behaviours in fragile X. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007; 31:315–26.
98. Zori RT, Marsh DJ, Graham GE, Marliss EB, Eng C. Germline PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Am J Med Genet*. 1998; 80:399-402.

99. Parisi MA, Dinulos MB, Leppig KA, Sybert VP, Eng C, Hudgins L. The spectrum and evolution of phenotypic findings in PTEN mutation positive cases of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *J Med Genet.* 2001;38:52–8.
100. Delatycki MB, Danks A, Churchyard A, Zhou XP, Eng C. De novo germline PTEN mutation in a man with Lhermitte-Duclos disease which arose on the paternal chromosome and was transmitted to his child with polydactyly and Wormian bones. *J Med Genet.* 2003;40:e92.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. Buxbaum JD, et al. Mutation analysis of the NSD1 gene in patients with autism spectrum disorders and macrocephaly. *BMC Med Genet.* 2007b;8:68.
105. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23:185–8.
106. Moretti P, Zoghbi HY. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16:276–81.
107. Young DJ, et al. The diagnosis of autism in a female: could it be Rett syndrome? *Eur J Pediatr.* 2008;167:661–9.

108. Lintas C, Persico AM. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *J Med Genet.* 2009;46:1–8.
109. Samaco RC, Nagarajan RP, Braunschweig D, LaSalle JM. Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 2004; 13:629–39.
110. Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:483–92.
111. 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.
112. Baker P, Piven J, Sato Y. Autism and tuberous sclerosis complex: prevalence and clinical features. *J Autism Dev Disord.* 1998;28:279–85.
113. Asano E, Chugani DC, Muzik O, Behen M, Janisse J, Rothermel R, Mangner TJ, Chakraborty PK, Chugani HT. Autism in tuberous sclerosis complex is related to both cortical and subcortical dysfunction. *Neurology.* 2001; 57:1269–77.
114. de Vries PJ, Hunt A, Bolton PF. The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC): a postal survey of UK families. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007;16:16–24.
115. Bolton PF. Neuroepileptic correlates of autistic symptomatology in tuberous sclerosis. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:126–31.
116. Jeste SS, Sahin M, Bolton P, Plouhidis GB, Humphrey A. Characterization of autism in young children with tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol.* 2008;23:520–5.
117. 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.
118. Schaefer GB, Lutz RE. Diagnostic yield in the clinical genetic evaluation of autism spectrum disorders. *Genet Med.* 2006; 8:549–56)
119. Zafeiriou DI, Ververi A, Vargiami E. Childhood autism and associated comorbidities. *Brain Dev.* 2007;29:257–72.

120. 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)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*. 2004; 119:19–31.
121. 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.
122. Ozonoff S, Williams BJ, Gale S, Miller JN. Autism and autistic behavior in Joubert syndrome. *J Child Neurol*. 1999;14:636–41.
123. Takahashi TN, Farmer JE, Deidrick KK, Hsu BS, Miles JH, Maria BL. Joubert syndrome is not a cause of classical autism. *Am J Med Genet A*. 2005;132:347–51.
124. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics*. 2004;113:e472–e486.
125. Howlin P, Karpf J, Turk J. Behavioural characteristics and autistic features in individuals with Cohen Syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2005; 14:57–64.
126. Naqvi S, Cole T, Graham JM. Cole-Hughes macrocephaly syndrome and associated autistic manifestations. *Am J Med Genet*. 2000;94:149–52.
127. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS, Glaze DG, German JR, Bird LM, Barbieri-Welge R, Bichell TJ, Beaudet AL, Bacino CA. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet*. 2006;43:512–6.
128. 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.
129. 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.
130. Berg JS. Et al. Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genet Med*. 2007;9:427–41.

131. Van der Aa N, et al. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 2009;52:94–100.
132. Sanders SJ, et al. 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.
133. Potocki L, et al. 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.
134. Gulhan Ercan-Sencicek A, et al. Searching for Potocki-Lupski syndrome phenotype: A patient with language impairment and no autism. *Brain Dev.* 2011;34(8):700-3
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. Coleman M. Advances in autism research. *Dev Med Child Neurol.* 2005; 47:148.
139. Correia C, et al. 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.
140. Oliveira G, et al. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47:185–9.
141. Weissman JR, Kelley RI, Bauman ML, Cohen BH, Murray KF, Mitchell RL, Kern RL, Natowicz MR. Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: a cohort analysis. *PLoS ONE.* 2008;3:e3815.

142. Pons R, Andreu AL, Checcarelli N, Vila MR, Engelstad K, Sue CM, Shungu D, Haggerty R, de Vivo DC, DiMauro S. Mitochondrial DNA abnormalities and autistic spectrum disorders. *J Pediatr*. 2004;144:81–5.
143. Smith M, Spence MA, Flodman P. Nuclear and mitochondrial genome defects in autisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1151:102–32.
144. Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M. Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord*. 2003;33:201–4.
145. Van den Berghe G, Vincent MF, Jaeken J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1997;20:193–202.
146. Stathis SL, Cowley DM, Broe D. Autism and adenylosuccinase deficiency. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000;39:274–5.
147. 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.
148. Tierney E, Nwokoro NA, Porter FD, Freund LS, Ghuman JK, Kelley RI. Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2001;98:191–200.
149. Tierney E, Bukelis I, Thompson RE, Ahmed K, Aneja A, Kratz L, Kelley RI. Abnormalities of cholesterol metabolism in autism spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B:666–8.
150. Manzi B, Loizzo AL, Giana G, Curatolo P. Autism and metabolic diseases. *J Child Neurol*. 2008;23:307–14.
151. Sikora DM, Pettit-Kekel K, Penfield J, Merkens LS, Steiner RD. The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A*. 2006;140:1511–8.
152. Schopler E, Andrews CE, Strupp K. Do autistic children come upper-middle class parents? *J Autism Dev Disord*. 1980; 10:91-103.
153. Fidan T, Esin S, Akgül Ceyhun H, Gürsoy S. Ebeveyn Yaşı ve Çocuklarda Görülen Psikiyatrik Bozukluklar Arasındaki İlişki. *Güncel Psikiyatri ve Psikonörofarmakoloji*, Ocak 2011; Cilt1-Say1.
154. Gousse V, Plumet MH, Chabane N, Fringe phenotypes in autism: a review of clinical, biochemical and cognitive studies. *Eur Psychiatry* 2002,17:120-128.

155. Piven J, Palmer P, Psychiatric disorder and the broad autism phenotype: evidence from a family study of multiple incidence autism families. 1999, *Am J Psychiatry* 156:557-563.
156. Cohen DJ, Pauls D, Volkmar FR. Recent research in autism. *Child Adolesc Psychiatry Clin North Am*, 1994; 3:161-171.
157. Finegan JA, Qumington B, Pre-peri and neonatal factors and infantile autism. *J Child Psychol Psychiatry* 1979,20:119-128.
158. Kayaalp L, Taştan Y, Demir T, Demir D, Ertan T, Otistik bozuklukta prenatal ve perinatal etkenler. *Türk Pediatri Arşivi* 1999,34:43-46.
159. Sadock BJ, Sadock VA, Pervasive developmental disorders, "Kaplan&Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences Clinical Psychiatry" içinde, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2003, s:1208-1222.
160. Schopler E, Reichler RJ, de Vellis RF, Daly K, Toward objective classification of childhoodautism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Dis* 1980, 10:91-103.
161. Rutter M, Genetic studies of autism: from the 1970s to the millenium. *J Abnorm Child Psychology* 2000, 28:3-14.
162. Gupta S, Agarwal S, Heads C, Brief report: dysregulated immune system in children with autism: beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *J Autism Dev Disord* 1996,26:439-452.
163. Gupta S, Immunological treatments for autism. *J autism Dev Disord* 2000, 30:475-479.
164. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G, Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002, 20:61-66.
165. Shattock P, Kennedy A, Rowell F, Berney T, The role of neuropeptides in autism and their relationship with classical neurotransmitters. *Brain dysfunction* 1990, 3:328.
166. Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci* 2004, 27:489-495.
167. Schechter R, Grether JK. Continuing increases in autism reported to California's developmental services system: mercury in retrograde. *Arch Gen Psychiatry*. 2008; 65: 19-24.

168. Carlson ML, Hypothesis: is infantile autism a hypoglutamergic disorder? Relevance of glutamate-serotonin interaction of phamacotherapy. *J Neurol Trans* 1998, 105:525-535.
169. Lombard J, Autism a mitochondrial disorder? *Med Hypothesis* 1998, 50:497-500.
170. Nir I, Meir D, Zilber N, Knobler H, Hadjez J, Lerner Y, Brief report:Circadian melatonin, tyroid stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *J Autism Dev Dis* 1995,25:641-654.
171. Hashimoto T, Aihara R, Tayama M, Reduced thyroid stimulating hormone response to thyrotropin releasing hormone in autistic boys. *Dev Med Child Neurol* 1991, 33:313-319.
172. www.mlpa.com
173. Schouten, J.P., McElgunn, C.J, Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Research*, 2002, 30-57 p.
174. Slater, H.R, Bruno, D.L, Ren, H., Pertile, M., Schouten, J.P, Choo, K.H.A, Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA), *J. Med. Genet.*, 2003, 40, 907–912 p.
175. 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.
176. 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.
177. Ghebranious N, Giampietro PF, Wesbrook FP, Rezkalla SH. A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 2007, 143A:1462–1471.
178. Kumar RA, Karamohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH, Dobyns WB, Christian SL.Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism.*Hum Mol Genet.* 2008;17:628–38.

179. Bremer A, Giacobini MB, Nordenskjold M, Brøndum-Nielsen K, Mansouri M, Dahl N, Anderlid BM, Schoumans J. Screening for Copy Number Alterations in Loci Associated with Autism Spectrum Disorders by Two-Color Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Am J Med Genet Part B* 2010, 153B:280–285.
180. Guiqing Cai, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for genetic screening in autism spectrum disorders: Efficient identification of known microduplications and identification of a novel microduplication in ASMT *BMC Medical Genomics*, 2008, 1 : 50.
181. Cook EH Jr, et al. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication, *Am J Hum Genet*, 1997; 60:928–34.
182. Repetto, et al. Intestinal duplications of chromosome region 15q11q13: Clinical and molecular characterization, 1998, *Am. J. Med. Genet.* 79:82-89.
183. Roberts S, Dennis N, Browne C, Willatt L, Woods C, Croos I, Jacobs P, Thomas N. Characterisation of interstitial duplications and triplications of chromosome 15q11-q13. *Human Genetics* 2002;110:227–234.
184. Christian SL, Brune CW, Sudi J, Kumar RA, Liu S, Karamohamed S, Badner JA, Matsui S, Conroy J, McQuaid D, et al. Novel Submicroscopic Chromosomal Abnormalities Detected in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*, 2008.
185. Christofolini DM, Meloni VA, Ramos MAP, Oliveira MM, de Mello CB, Pellegrino R, Takeno SS, Melaragno MI. Autistic Disorder Phenotype Associated to a Complex 15q Intrachromosomal Rearrangement. *Am J Med Genet Part B* 2012, 159B:823–828.
186. Griswold AJ, et al. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet* 2012, 21(15):3513–3523.
187. Kang JQ, Barnes G. A common susceptibility factor of both autism and epilepsy: Functional deficiency of GABA(A) receptors. 2012, *J Autism Dev Disord*.
188. Scoles HA, Urraca N, Chadwick SW, Reiter LT, Lasalle JM. Increased copy number for methylated maternal 15q duplications leads to changes in gene and protein expression in human cortical samples. *Mol Autism* 2011, 2(1):19.

189. Moessner, et al., Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81:1289–1297.
190. Dhar SU, et al. 22q13.3 deletion syndrome: Clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet Part A* 2010, 152A:573–581.

