

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NON-SENDROMİK (PRİMER) OTİZM HASTALARINDA CGH-ARRAY
ÇALIŞMASI

Dr.ESEN ULAK GÜMÜŞLÜ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NON-SENDROMİK (PRİMER) OTİZM HASTALARINDA CGH-ARRAY
ÇALIŞMASI

Dr.ESEN ULAK GÜMÜŞLÜ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışmanlar: Yard.Doç.Dr. Naci ÇİNE
Doç.Dr.Bülent KARA

KOCAELİ
2010

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Non-sendromik (primer) otizm hastalarında CGH-array çalışması

Tez yazarı: Esen Ulak Gümüşlü

Tez savunma tarihi: 17 Mayıs 2010

Tez Danışmanları: Yard.Doç.Dr. Naci ÇİNE
Doç.Dr.Bülent KARA

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Yrd. Doç. Dr. Hakan Savlı	
ÜYE (DANIŞMAN):	Yrd. Doç. Dr. Naci Çine	
ÜYE:	Yrd. Doç. Dr. Cavit Işık Yavuz	

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2010

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

ÖZET

NON-SENDROMİK (PRİMER) OTİZM HASTALARINDA CGH-ARRAY ÇALIŞMASI

Otistik spektrum bozukluğu, önemli genetik etyolojisi olan nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizmlili hastaların %5-10 da sitogenetik anomaliler saptanmıştır. Kromozomal anomaliler, bir geni bozarak ya da genom dışında, mutasyon için uygun genetik koşulu sağlayarak otizme neden olabilirler. Otizm ile ilgili tek bir biyolojik veya klinik bulgu olmadığı gibi ortaya çıkmasında da tek bir gen sorumlu değildir; patogeneğinde onbeşten fazla tanımlanmış gen rol oynamaktadır.

Array CGH teknolojisi insanda genetik bozukluklara neden olan DNA kopya sayısı değişikliklerinin analizi için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknolojiyle bir hastanın bünyesine bulunan tüm genomu birkaç saat içinde tek bir deney ile taramak mümkündür. Yaptığımız çalışmada primer otizmlili hastaları yeni bir teknoloji olan array CGH yöntemi ile değerlendirdik. Bu sayede, söz konusu hastalığı moleküler sitogenetik düzeyinde var olan en duyarlı yaklaşımla taramayı amaçladık. Daha önce başka ekiplerce otistik hastalarda izlenmiş bir bölge olan (16p13.11,8p23.1) çalışmamızda da izlenmiştir. Ayrıca, gözlemlerimiz, oniki hastada 16p11.2, on hastada 1q21, sekiz hastada 2q21.1, yedi hastada 2p21, dört hastada 10q11.22 bölgelerinin delesyona uğradığını işaret etmektedir ve bu bulgular literatüre sunmak istediğimiz ilk verilerdendir. Tüm bu veriler ışığında, 16p13.11 bölgesi ve ilgili genlerinin bizim hasta grubumuzda da otizme yatkınlığı temsil ettiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda ayrıca izlenen 8p23.1 ve 16p11.2 bölgelerine ait genler de olası başka yatkınlık bölgeleri olarak işaret edilebilir. Çalışmamız otistik hastalarda yapılan ilk tam genom array CGH analizlerinden biridir ve daha geniş gruplara yayılması hastalığın oluş ve tedavi mekanizmalarında vereceği ipuçları açısından önemlidir.

Verilerin verifikasyonu ve aynı bölgeye ait, gen anlatım ve proteomiks çalışmaları hastalığın patogenezi mekanizması ve tedavi stratejileri açısından önemli ipuçları sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: nonsendromik (primer) otizm, CGH-array

SUMMARY

CGH-ARRAY STUDY IN NON-SYNDROMIC (PRIMARY) AUTISM PATIENTS

Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders with a strong genetic etiology. Cytogenetic abnormalities have been detected in 5-10% of the patients with autism. Chromosomal abnormalities may cause autism by disrupting a gene or by providing a permissive genetic environment for mutations elsewhere in the genome. As there is no specific biological or clinical finding for autism, also there is no specific gene responsible for it. Over than 15 genes plays role in the etiology of the autism.

Technology of array CGH is a method which analysis DNA copy number variations that cause genetic deformities in human. By this method its possible to scan whole genom in one experiment in a few hours. In our clinic we evaluate primary autism patients by using array CGH. In this way, we aimed to scan these diseases by the most sensitive molecular cytogenetic approach. Autistic patients previously monitored by other teams, some defined regions (16p13.11, 8p23.1) was also seen in our study. In addition, our observations pointed out in twelve patients 16p11.2 deletion, in ten patients 1q21 deletion, in eight patients 2q21.1 deletion, in seven patients 2p21 deletion, four patients 10q11.22 deletion regions, and these findings are the first data that we offer to the literature. In light of all this data, we can say that 16p13.11 region and related genes also represents a predisposition to autism in our group of patients. Our study is one of the first whole genome array CGH analysis study in patients with autism, and in wider group studies of the disease, it will give important tips about treatment and mechanisms of the disease. Analysis of gene expression in patients with the same data support to analyse molecular pathogenesis of the disease will lead to significant gains achieved.

Verification of data belonging to the same region, gene expression and proteomics studies of mechanisms of disease pathogenesis and treatment strategies may provide important clues.

Keywords: non-syndromic (primer) autism, array-CGH

TEŞEKKÜR

Başta, bilimsel birikimini akademik eğitimime başladığım ilk günden itibaren özenle paylaşan ve büyük desteklerini gördüğüm, bugünlere gelmemi sağlayan hocam **Yard.Doç. Dr.Hakan Savlı'ya,**

Kendisinden çok şey öğrendiğim, üzerimde büyük emekleri olan, tez çalışmam sırasında gösterdiği özen, çaba, enerji ve desteği için danışman hocam **Yard.Doç.Dr.Naci Çine'ye ,**

Yüksek Lisans çalışmamın her aşamasında deneyimini esirgmeden paylaşan, beni destekleyen danışmanım **Doç.Dr.Bülent Kara'ya** teşekkürlerimi sunuyorum.

Desteğini doğduğum günden beri hissettiğim ve onların kızı olmaktan gurur duyduğum annem **Prof. Dr. Güner Ulak** ve babam **Op.Dr. Mustafa Ulak'a,**

Her zaman yanımda olan eşim **Dr. Bora Gümüşlü'ye**

Bilgi ve dostlukları ile bana her zaman destek veren arkadaşlarım **Nilüfer Üzülmez, Deniz Sünnetçi** ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Saygılarımla.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Otizm	3
2.1.1 Otizmin Tanımı	3
2.1.2 Sınıflandırma.....	4
2.1.3 Epidemiyoloji.....	4
2.1.4 Etiyoloji	5
2.1.5 Otizm ve Genetik İlişkisi.....	7
2.1.6 Nöroanatomi ve Görüntüleme Çalışmaları	8
2.1.7 Epilepsi ve Elektroensefalografi (EEG)	8
2.2 Otizmde erken tanının önemi	9
2.3 Otizmde Özgül Tarama ve Erken Tanı Yöntemleri	10
2.4 Tanıda İstenmesi Gereken Diğer Tetkikler.....	11
2.5 Klasik CGH Tekniği (Comparative Genomic Hybridization).....	12
2.6 Array-CGH Teknolojisi (Array Comparative Genomic Hybridization).....	15
2.6.1 DNA'nın İşaretlenmesi	20
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1 Yöntem.....	26
3.2 DNA İzolasyonu	26
3.3 Agaroz jel elektroforezi	28
3.4 DNA Lekeleme	28
3.5 Pürifikasyon.....	29
3.6 Hibridizasyon.....	30
3.7 Yıkama.....	30
3.8 Alet ve Cihazlar	30
3.9 Sarf Malzemeler.....	31
3.10 Array-CGH Hibridizasyonu.....	32
3.11 Veri Analizi.....	34
4 BULGULAR.....	35
4.1 Delesyon Bölgeleri	35
4.2 Hastaların Dağılımı.....	36
4.3 CGH Array Analiz Sonuçları.....	40
5 TARTIŞMA	44
6 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7 KAYNAKLAR DİZİNİ.....	48

ÖZGEÇMİŞ.....	52
---------------	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	World Health Organization (Dünya sağlık Örgütü)
DSM-IV	The Diagnostic and Statistical Manual of Mental-Disorders (Amerikan Psikiyatri Birliği: Psikiyatride Hastalıkların Tanımlanması ve Sınıflandırılması Elkitabı)
ICI-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (hastalıkların ve sağlık sorunlarının uluslararası sınıflama ölçünü)
PDD-NOS	Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified (Sınıflandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk)
CGH	Comparative Genomic Hybridization (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)
FISH	Floresans in situ Hybridization
EEG	Elektroensefalografi
aCGH	array Comparative Genomic Hybridization
ASD	Autism Spectrum Disorder (Otizm Spektrum Bozuklukları)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	CGH mikroarray.....	12
Şekil 2.2	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH).....	13
Şekil 2.3	CGH Metafaz Plağı.....	14
Şekil 2.4	CGH Karyotip	14
Şekil 2.5	CGH ile belirlenebilen kromozom anomalileri.....	15
Şekil 2.6	2010 da güncel bilimde kullanımda olan Array Slide Formatları.....	16
Şekil 2.7	Array Slide Formatları.....	17
Şekil 2.8	Probların Genel Görünümü.....	17
Şekil 2.9	CGH Analiz Programı Görünümü.....	18
Şekil 2.10	CGH ve A-CGH tekniklerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....	19
Şekil 2.11	Array CGH Şematik Gösterimi.....	20
Şekil 2.12	Nick translasyon yöntemi ile DNA'nın işaretlenmesi	21
Şekil 2.13	Rastgele primerler kullanarak DNA'nın işaretlenmesi.....	22
Şekil 3.1	DNA ölçümünde kullanılan spektrofotometre.....	27
Şekil 3.2	DNA hibridizasyon fırını.....	33
Şekil 3.3	Slide yıkama küveti.....	33
Şekil 3.4	Agilent Scanner.....	34
Şekil 3.5	Slide yüklenmesi.....	34
Şekil 4.1	16p13.11 delesyonu.....	40
Şekil 4.2	2q21.1-21.2 delesyonu.....	41
Şekil 4.3	16p11.2 delesyonu.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	İkincil otizm etyolojisinde yer alan hastalıklar.....	6
Çizelge 2.2	BAC Array-Oligo Array Karşılaştırılması.....	25
Çizelge 2.3	BAC Array-Oligo Array Limitasyonları.....	25
Çizelge 4.1	Otizmli hastalarda delesyon bölgeleri.....	36
Çizelge 4.2	Otizmli hastaların dağılımı.....	37
Çizelge 4.3	Dismorfik özellikler.....	38
Çizelge 4.4	Dismorfik özelliklerin delesyon bölgelerine göre dağılımı.....	39

1. GİRİŞ

Otizm, erken çocukluk döneminde başlayan, yaş ilerledikçe klinik bulgularda değişiklikler olabilen, yaşam boyu devam eden, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili komplike bir nörogelişimsel bozukluktur (Filipek,2000). Temel özellikleri sosyal ilişkide sorunlar, sözlü ve sözsüz iletişim bozuklukları, yineleyen davranış kalıpları ve kısıtlı ilgi alanıdır. Otizmin etyolojisi bilinmemekle birlikte, çevresel faktörler ile tetiklenebilen bir genetik yatkınlığın bulunduğu düşünülmektedir (Kiah Bertoglio et al 2009). Otizm ile ilgili tek bir biyolojik veya klinik bulgu olmadığı gibi ortaya çıkmasında da tek bir gen sorumlu olmadığı düşünülmektedir; bu gün için en az onbeş genin patogenezele ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Otizm taramasında kullanılan testlerden hiçbiri ideal değildir ve onsekiz ayın üstündeki çocuklarda uygulanabilmektedir. Testler bu dönemde sosyal gelişim açısından kritik önemi olan ortak dikkat, hayali oyun ve sosyal oryantasyonun sorgulanması üzerine yapılandırılmıştır (Johnson, 2008). Onsekiz ayın altındaki çocuklarda da kullanılabilen otizme özgül tarama testlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Özgül tarama testleriyle otizmden şüphelenildiğinde daha ileri gelişimsel değerlendirme ve bilişsel testlerin yapılması gerekir (Prater, 2002).

Kromozomların incelenme tekniklerinin geliştirilmesi ile otistik çocukların bir kısmında mikrolelesyon ve duplikasyon olarak bilinen kromozomlardaki yapısal bozukluklara rastlanmıştır. Zeka geriliği ile seyreden bu bozukluklara paralel olarak otistik bulguların da arttığı gösterilmiştir. Otizmde rol oynayan genetik faktörler üzerinde yapılan çalışmalar, insan genomundaki hemen hemen bütün kromozomların rol oynadığını ileri sürmekle birlikte en fazla 7q,2q ve 15q kromozomları öne çıkmaktadır (Santagnelo,2005).

Otizm ile ilgili tek bir beyin bölgesi yada patofizyolojik mekanizma da bildirilmemiştir.Postmortem bulgular,hayvan modelleri ve nörogörüntüleme çalışmaları serebellum,frontal korteks,hipokampus,ve özellikle amigdala üzerinde yoğunlaşmıştır. Serebello-talamo-kortikal yolak da otizm de rol oynayabilir. Otizmin araştırılmasında, gen

ekspresyonunun anormal regülasyonunun araştırılması, proteomiks, ve postmortem beyin analizleri gibi yeni tekniklerin kullanılması da önerilmektedir.

Deneilerimizde kullanılan 'array CGH' yöntemi, mikrodizilim slaytları kullanılarak, kromozomal DNA'da meydana gelen değişikliklerin saptanması esasına dayanır. Bu yöntem; tüm kromozomdan, tek bir bantın ince bir parçasındaki artıştan veya azalmadan kaynaklanan genetik dengesizliği aynı anda birçok lokusu inceleyerek belirleyen bir yöntemdir. Array CGH yöntemi, klasik karşılaştırmalı genomik melezleştirme yönteminin (CGH) avantajları ile, ileri bir teknoloji olan mikroarray'in birleştirilmesi ile ortaya çıkmış bir yöntemdir. Array CGH tüm genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimleri incelenir. Bu teknik, kazanım (duplikasyon, insersiyon veya amplifikasyon) veya net kayıp (materyalde delesyon) gibi kromozom anomalilerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar. Birden fazla genomun birbirleri ile karşılaştırılabilmelerine olanak sağlanması, az miktarlarda DNA örneğinin yeterli olması, metafaz plağı gerekli olmaması, yüksek kararlılık ve verim sağlanması, DNA üzerindeki tek baz değişikliklerinin bile saptanabilmesi bu yöntemin sağladığı avantajları arasındadır (Bruder et al 2001; Oostlander et al 2004; Vissers et al 2003)

Söz konusu çalışmamız, bir insan tüm genom tarama çalışmasıydı. Çalışmamız hastalardan alınan kan örneklerinden izole edilen DNA materyali üzerinde gerçekleştirildi. Bu ve benzeri çalışmalar sonucunda yeni tanı ve tedavi belirteçlerine ulaşılması olasıdır. Bu olasılık nedeniyle tam genom analizlerinin güncel bilim açısından eşsiz bir önemi bulunmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 OTİZM

2.1.1 Otizmin Tanımı

Otizm, erken çocukluk döneminde başlayan, yaş ilerledikçe klinik bulgularında değişiklikler olabilen, yaşam boyu devam eden, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili kronik bir sorundur (Filipek et al.2000). Temel özellikleri sosyal ilişkide sorunlar, sözlü ve sözsüz iletişim bozuklukları, yineleyen davranış kalıpları ve kısıtlı ilgi alanıdır (Filipek 2000, American Psychiatric Association, 1994; WHO International statistical classification of diseases and related health problems, 1992).

‘Otizm’ sözcüğü ilk olarak, İsveçli Psikiyatrist Eugene Bleuler tarafından, 1912 yılında ‘The American Journal of Insanity’ (Amerikan Ruhsal Hastalıklar Dergisi) adlı yayında kullanılmıştır. 1943 yılında Amerikalı çocuk psikiyatristi Leo Kanner otizmi ‘Erken Çocukluk Otizmi’ olarak adlandırmıştır (Prater 2002). Kanner’dan bağımsız olarak Asperger de, 1944’te otizmi, yaklaşık 10.000 çocuktan dördünde doğumda ya da doğumdan sonraki ilk otuz ayda görülen, davranışla ilgili bir sendrom olarak tanımlamıştır (Darıca ve ark. 1992). 1961 yılında, Dr. Mildred Creak başkanlığında geliştirilen ‘Dokuz Nokta’ teşhis ölçütüne göre otistik çocuğun, kendi kişisel kimliğinin farkında olmaması, belli nesnelere bağımlılık geliştirmesi, nesnelere amacına yönelik kullanamaması, içinde bulunduğu ortamdaki değişikliklere karşı tepki göstermesi, mevcut normal ya da özel zihinsel yeteneklere sahip olmanın yanısıra gözlenen genel bir gerilik olması gibi özelliklere bağlı olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler daha sonra O’Gorman (1967) tarafından tekrar geliştirilmiştir (Darıca ve ark. 1992).

Rutter ve arkadaşları otistik çocuklar ile ilgili tüm görüşleri 4 ana başlık altında toplamışlardır. Buna göre:

1. Otizmin belirtilerinin ortaya çıkma sıklığı genellikle 30 aydan önce görülür.
2. Otistik çocukların konuşma ve dil gelişiminde belirgin bir gecikme söz konusudur.
3. Zihinsel gelişimle (örneğin, matematik, resim, müzik, ezber konularında beceri gibi) ilgisi olmayan, ancak sosyal gelişimle ilgili (örneğin, sarılma - kucaklama gibi fiziksel teması reddetmek, insanlara karşı genel bir ilgisizlik ve göz kontağı kuramama gibi) yetersizlikler olduğu görülmektedir.
4. Kalıplaşmış oyun becerileri gözlenmekle birlikte aynılığı korumada ısrar etme ve

değişikliğe karşı tepki gösterme de belli başlı davranışlar arasında yer almaktadır (Darıca ve ark. 1992).

2.1.2 Sınıflandırma

Otizm, yaygın gelişimsel bozukluk (otistik spektrum bozukluğu, otistik yelpaze) ana başlığı altında incelenir. DSM-IV’te otistik bozukluk, ICD-10’da çocukluk çağı otizmi olarak adlandırılmıştır (Butter et al 2003). Klasik otizm terimi de kullanılabilir. Yaygın gelişimsel bozukluk sınıflamasında yer alan diğer hastalıklar Asperger sendromu, çocukluk çağı “disintegratif” bozukluğu, Rett sendromu ve sınıflandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (“PDD-NOS”) grubudur

Asperger sendromu bileşenleri

-dil gelişimi ve bilişsel fonksiyonlar klasik otizme göre daha iyi- “konuşan otistikler”

-dilin anlamsal (“semantik”) ve pratik (“pragmatik”) kullanımında sorunlar

-genellikle çocukluk döneminde yanlış tanıları konur, erişkin dönemde “tuhaf”-“değişik” kişiler olarak tanınırlar

Çocukluk çağı “disintegratif” bozukluğu bileşenleri

-normal sosyal, dil ve bilişsel gelişimi takiben, 2-10 yaşlar arasında aşağıdaki alanlardan en az 2 tanesinde gerileme;

- dil
- sosyal iletişim
- bağırsak veya mesane kontrolü
- oyun veya diğer motor beceriler

Rett sendromu bileşenleri

-X’e bağlı genetik bozukluk – “MECP2 gen mutasyonu”

-postnatal beyin büyümesinde etkilenme

-ağır mental ve motor gerileme; konvülsiyon

-“el yıkama” benzeri yineleyen hareketler; amaçlı el kullanımının kaybı

-erken dönemde sosyal ilişki kaybı, geç dönemde sosyal iletişimde göreceli düzelme

Sınıflandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (“PDD-NOS”) bileşenleri

- diğer yaygın gelişimsel bozukluk alt tiplerinin tanı ölçütlerini tam doldurmayan çocuklar için kullanılan bir tanı
- sosyal, iletişimsel ve davranışsal bozukluklar otizme benzer, ancak daha hafif (“otistik bozukluk ile Asperger sendromu arasında”)

2.1.3 Epidemiyoloji

Otizmin toplumda görülme sıklığının 5/10.000 ile 20/10.000 arasında olduğunu bildiren yayınlar olmakla birlikte, 1989 yılından sonra yapılan 11 çalışmayı kapsayan bir meta-analizde insidans 7/10.000 olarak bulunmuştur (Boyle et al 1994; Prater 2002; Tuchman 2003). Günümüzde, otizm sıklığı yaklaşık 1-2/1.000, otistik spektrum bozukluğu sıklığı yaklaşık 4-6/1.000 olarak tahmin edilmektedir. Erkek/kız oranı zeka bölümüne göre değişmektedir, mental geriliği ağır olanlarda oran 2:1 iken, hafif-orta olanlarda bu oran 4:1'e kadar artmaktadır (Prater, 2002).

2.1.4 Etyoloji

Otizmin etyolojisi bilinmemekle birlikte, çevresel faktörler ile tetiklenebilen bir genetik yatkınlığın bulunduğu düşünülmektedir (Kiah Bertoglio et al 2009). Otizmin genetik etyolojisinin kompleks ve çokgenli olduğu kabul edilmesine rağmen, rol oynayan genlerin özelliği ve sayısı bilinmemektedir. Rutin sitogenetik analizler ve tüm genom taramaları, hemen hemen bütün kromozomları içeren birçok aday gen bölgesinin varlığını göstermektedir.

Otistik çocukların %70-90'ında özgül bir neden belirlenemez (birincil), %10-30'unda ise altta yatan bir neden gösterilebilir (ikincil) (Çizelge 1). Otistik çocukların %0,4-3'ü tüberoz sklerozludur. Tüberoz skleroz ve mental gerilik birlikteliğinde %17-60, frajil-X sendromunda %3-25, Moebius sendromunda %25, 15. kromozom uzun kolunda bozukluk varlığında >%1, doğumsal metabolizma hastalıklarında <%5 sıklıkla otizm eşlik eder.

Enfeksiyonlar, doğumsal metabolik hastalıklar, immünolojik sorunlar, kurşun zehirlenmesi, fetal alkol sendromu gibi sorunların otizm gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Aşıların, özellikle kızamık-kızamıkçık-kabakulak aşısının, otizme neden

olabileceği tartışılmıştır, ancak İngiltere ve ABD’de yapılan çalışmalar bu ilişkinin varlığını gösterememiştir.

Genetik incelemede “array” CGH (“comparative genomic hybridization”) tekniklerinin geliştirilmesi ile otistik çocukların bir kısmında kromozomlardaki yapısal bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan mikrolelesyon ve duplikasyon sendromları tanımlanmaya başlanmıştır. Mental gerilikle seyreden 15q13.3; 15q24; 2p15-16.1; 20q13.13-q13.2 mikrolelesyon sendromlarında ek olarak otistik bulguların da sıklıkla eşlik ettiği gösterilmiştir (Slavotinek, 2008). Yakın gelecekte otizmle ilişkili yeni mikrolelesyon/duplikasyon sendromlarının tanımlanması olası gözükmektedir.

Çizelge 2.1 İkincil otizm etyolojisinde yer alan hastalıklar.

Nörokütan hastalıklar

- | | |
|-------------------|--------------------|
| -tüberoz skleroz | -hipomelanozis Ito |
| -nörofibromatozis | |

Metabolik hastalıklar

- | | |
|---|--------------------------------|
| -fenilketonüri | -hiperglisinemi |
| -organik asidüriler | -histidinemi |
| -mitokondriyal hastalıklar | -pürin metabolizması bozukluğu |
| -kolesterol biyosentez bozuklukları | -piridoksin bağımlılığı |
| -karbonhidratı eksik glikoprotein sendromları (CDG) | |

Edinsel beyin lezyonu

- | | |
|--------------------------------|-----------------|
| -hipoksik iskemik ensefalopati | -HSV ensefaliti |
| -konjenital Rubella sendromu | |

Epileptik sendromlar

- | | |
|----------------|--------------------------|
| -West sendromu | -Lennox-Gastaut sendromu |
|----------------|--------------------------|

Genetik hastalıklar

- | | |
|--------------------|-----------------------------|
| -tüberoz skleroz | -nörofibromatozis tip 1 |
| -frajil-X sendromu | -Joubert sendromu |
| -Moebius sendromu | -Aarskog sendromu |
| -Tourette sendromu | -Smith-Lemli-Opitz sendromu |
| -Williams sendromu | -hipomelanozis Ito |
| -Angelman sendromu | -mikrolelesyon sendromları |
-

2.1.5 Otizm ve Genetik İlişkisi :

Otizm, genetik ve çevresel etkilerin bir araya gelmesi ile ortaya çıkar. İkizler üzerinde yapılan çalışmalar ve kardeşlerde yineleme riskinin yüksek olması nedeniyle, otizmin genetik kökeni olduğu kabul edilmektedir. Yapılan aile ve ikiz çalışmaları otizmin %90 oranında katılsal komponentinin olduğunu göstermiştir(Zhao et al. 2007). Beyindeki bağlantıları sağlamada rol oynayan genlerdeki mutasyonların, çocuğun otizm olma ihtimalini artırdığı düşünülmektedir. Frajil-X sendromu, Down sendromu ve tüberoz skleroz gibi genetik kökenli hastalıklarda otizm sıklığı yüksektir (Baron-Cohen ve ark. 2000). Kalıtsal etkilerin toplumda görülme oranı %0.2-0.3 tür. Otistik bir çocuğun kardeşinin de otistik olma oranı %3-7'dir, yani risk 50-100 kat artmaktadır (Bennetto, 2001). Risk tek yumurta ikizlerinde %60, çift yumurta ikizlerinde %9 olarak bildirilmiştir Duplikasyon, delesyon, translokasyon inversiyon ve ring kromozom gibi sitogenetik bozukluklara otizm hastalarının % 5-10'unda rastlanmıştır (Vortsman et al. 2006)

Otizm ile ilgili tek bir biyolojik veya klinik bulgu olmadığı gibi ortaya çıkmasında da tek bir genin sorumlu olmadığı düşünülmektedir; bu gün için en az onbeş genin patogeneze ilişkili olduğu düşünülmüştür. Otizmin patogenezinde genetik faktörler predominant etkilidirler. Birçok gen arasındaki etkileşme "idiyopatik" otizme neden olur fakat epigenetik faktörler ve çevresel etkenlere maruz kalma otizm ile ilişkili değişik durumlarda rol oynar. Genetik polimorfizm ve fenotipik heterojenite, otizmi incelenmesi komplike bir bozukluk haline getirir. Otizmde rol oynayan şüpheli genlerin saptanmasında, birçok hastalığı bulunan çocukların aileleri üzerindeki genetik araştırmalar ve biyokimyasal mekanizma çalışmaları yol gösterici olmaktadır (Bayou et al, 2008). Otizmde rol oynayan genetik faktörler üzerinde yapılan çalışmalar, insan genomundaki hemen hemen bütün kromozomların rol oynadığını ileri sürmekle birlikte en fazla 7q,2q ve 15q kromozomları öne çıkmaktadır (Santagnelo,2005). Otizm ile ilgili tek bir beyin bölgesi yada patofizyolojik mekanizma da bildirilmemiştir. Postmortem bulgular, hayvan modelleri ve nörogörüntüleme çalışmaları serebellum, frontal korteks, hipokampus, ve özellikle amigdala üzerinde yoğunlaşmıştır. Serebello-talamo-kortikal yolak da otizm de rol oynayabilir. Otizimli bazı hastalarda bütün beyin bölgelerinde büyüme görülebilir. Günümüzde otizmde görülen sosyal veya pragmatik dil eksikliğini düzelten bir ilaç bulunmamaktadır. Otizmin araştırılmasında, gen ekspresyonunun anormal regülasyonunun araştırılması, proteomiks, ve postmortem beyin analizleri gibi yeni tekniklerin kullanılması önerilmektedir.

2.1.6 Nöroanotami ve Görüntüleme Çalışmaları

Nöroanatomik-nöropatolojik çalışmalarda limbik sistemde ve serebellar bağlantılarda değişiklikler gösterilmiştir. Limbik sistem hücrelerinin (hipokampus, amigdala, mamiller cisim, ön singulat girus) boyutlarında küçülme, birim volüm başına düşen hücre sayısında artış, serebellumda Purkinje hücrelerinde azalma saptanmıştır (Tuchman, 2003). Bu patolojiler gebeliğin erken dönemlerinde gelişimsel bozukluk şüphesini artırmıştır. Bazı çalışmalarda beyinsapı ve korteks anomalileri de gösterilmiş olmakla birlikte, otizmde tek bir hücre patolojisinden çok, beyindeki bağlantıların (“minikolumnar organizasyon”) ve bilgi işleme süreçlerinin rolü üzerinde durulmaktadır (Tuchman, 2003).

Kraniyal MR çalışmalarında arka çukur yapılarıyla ilgili anomaliler (özellikle, serebellar vermal lobül VI ve VII’de ve beyinsapında hipoplazi) gösterilmiştir (Courhesne et al 1988). Morfometrik çalışmalarda, otistik erkek çocuklarında beyin dokusunda ve yan ventriküllerde hacim artışı saptandığı bildirilmesine karşın, bazı çalışmalarda beyin dokusu hacmi normal bulunmuş, ancak amigdala ve hipokampus hacminde beyin dokusuna göre göreceli azalma bildirilmiştir (Tuchman, 2003).

2.1.7 Epilepsi ve Elektroensefalografi (EEG)

Otizmde epilepsi birlikteliği sıktır. Bilişsel ve motor işlevlerde gerilik varlığında ya da dilde gerileme gelişen çocuklarda epilepsi sıklığı artar (Tuchman, 2003). Landau-Kleffner sendromunda dilde gerileme ve davranış bozukluklarına epileptik aktivite eşlik etmesine karşın, epileptik nöbetlerle otizm arasındaki neden-sonuç ilişkisi tartışmalıdır.

Amigdalanın otizmdeki rolü üzerinde yoğunlaşılması (yüz tanımanın gelişiminde amigdalanın öneminin anlaşılması, vb.), aynı zamanda yüksek epileptojenik yapısının bilinmesi, otizm-epilepsi birlikteliği açısından ilginç bir özellik olarak dikkati çekmektedir.

Otistik çocuklarda klinik EEG çalışmalarında %13-83 oranında EEG bozukluğu saptanmıştır (Tuchman et al 1997). Geniş dağılımın eşlik eden diğer sorunlara, kullanılan tanı ölçütlerine, kayıt metodlarına ve EEG yorum farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Uzun süreli EEG çalışmalarıyla EEG bozukluğu saptama olasılığı rutin 1 saatlik incelemelere göre belirgin olarak artmaktadır. Gerileme öyküsü olan otistik çocuklarda, klinik nöbet olmamasına karşın, 23 saatlik video-EEG incelemesinde %46

oranında EEG bozukluğu saptanmıştır (Tuchman and Rapin 1997). Bu nedenle, en azından dilde gerileme öyküsü olan otistik çocuklarda uzun süreli EEG çalışması önerilmektedir.

2.2 Otizmde erken tanının önemi

ABD’de yapılan bir çalışmada her 4 çocuktan birinin psiko-sosyal açıdan sorunları olduğu gösterilmiştir (Glascoe, 2000). Bu nedenle, Amerikan Pediatri Akademisi her sağlam çocuk muayenesinde pediatristlerin standart tarama yöntemlerini kullanmalarını önermektedir. Çoğu pediatrist standart tarama yöntemleri kullanmaktansa klinik bulgularla karar verme eğilimindedir, oysa çalışmaların sonuçlarına göre klinik değerlendirmede mental gerilik, öğrenme güçlükleri, dil gerilikleri ve diğer gelişimsel bozuklukların ancak %30’dan azı tanınabilmektedir (Glascoe, 2000; Dworkin,1992).

Küçük bir çocukta yürüme ve konuşma gibi majör gelişim basamaklarının beklenmesi erken tanıda gecikmeye neden olabilir. Özellikle dil becerilerindeki gecikmelerin erken tanınması önemlidir, çünkü işitme geriliği olan çocuklarda erken tedavi şansı yaratır, aynı zamanda mental gerilik ve yaygın gelişimsel bozukluk gibi hastalıkların erken tanısına olanak sağlar (Guralnick,1997).

Çocuklarda gelişim çevreden etkilendiğinden sorunlara erken müdahale etmek önemlidir. Erken müdahale yapılan çocuklarda liseyi bitirme, iş sahibi olma, bağımsız yaşayabilme daha yüksek, adolesan gebeliğinden korunma ve suç işleme daha düşük bulunmuştur (Glascoe, 2000).

Erken müdahale için erken tarama şarttır. Rutin sağlam çocuk izleminin yapıldığı birinci basamak poliklinikleri 5 yaşından önce gelişimsel-davranışsal tarama için en uygun ortamdır (Committee on Children With Disabilities. Developmental surveillance and screening of infants and young children. Pediatrics 2001). Anne-babanın dil, ince motor, bilişsel ve duygusal davranış gelişimi açısından şüpheleri gerçek sorunlar açısından yüksek oranda öngörücüdür (Glascoe and Dworkin 1995). Buna dayanılarak birinci basamakta kullanılan en etkin tarama testlerinde genellikle anne-babadan bilgi edinilir. Bu testler bekleme odasında uygulanabilir, evlere gönderilebilir, direkt veya telefon görüşmesiyle gerçekleştirilebilir. Çalışmaların sonuçlarına göre sorular iyi yapılandırılırsa, ailelerin eğitim durumu, sosyo-ekonomik özellikleri, yaşadıkları bölge ne olursa olsun çocuk hakkında yeterli bilgi edinilebilmektedir (Glascoe,2000).

Hastalığın pervaziv ve refrakter özellikleri ile psikolojik ve eğitimsel tedavilerdeki yeni gelişmeler nedeniyle olguların olabildiğince erken tanınması ve etkin tedavi merkezlerine

yönlendirilmeleri önemlidir. Davranışsal eğitim stratejileri genel olarak tüm yaşlarda etkili olabilirse de, zorlu davranışlarla savaşmak ve yeni beceriler kazandırmak erken yoğun davranışsal müdahaleye olabildiğince erken başlamakla olasıdır (Lovaas,1997). Bu durum nörogelişimsel faktörlere, özellikle de küçük yaşlarda beyin plastisitesinin daha fazla oluşuna bağlanabilir (McEachin,1993). Erken müdahalede çocuk negatif ya da patolojik davranışları daha kısa bir süredir yapmakta olduğundan, bu davranışların değiştirilmesi daha kolay olur. Aynı şekilde agresif davranışların kontrol altına alınması, azaltılması ve tekrarlarının önlenmesi küçük çocuklarda daha kolay olmaktadır.

Yapılan bir çalışmanın uzun süreli sonuçları, otistik spektrum bozukluğu ve gelişimsel geriliği olan çocukların oldukça büyük bir kısmının erken çocukluk döneminde kendi yaşitlarının öğrendikleri konusunda yakalama (“catch-up”) yapabildiklerini göstermiştir (McEachin,1993). Yakalama bazı çocuklarda kendi yaşitlarına uygun düzeye kadar olabilmektedir. Başlangıçta zeka bölümü (IQ) normal olan çocuklarda kazanımlar genellikle daha iyi olmaktadır. Erken müdahale, daha fazla etkin eğitim ve ailenin tedavi sürecine tam katılımı başarı oranlarını artıran en önemli faktörlerdir (Schopler, 1994).

2.3 Otizmde Özgül Tarama ve Erken Tanı Yöntemleri

Otizm taraması için ortak görüş her toplumun kendine en uygun tarama modelini seçmesi, tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, 18-24 ay arası yapılması ve aile bildirimine öncelik verilmesi yönündedir. Amerikan Pediatri Akademisi, tüm çocukların 18-24 ay arası rutin sağlam çocuk izlemlerinde otizme özgül bir tarama testiyle taranmasını önermektedir.

Günümüzde, otizm tanısını destekleyen biyolojik bir gösterge yoktur. On ikinci ayda parmakla işaret etme ve bay-bay, baş-baş gibi jestlerin olmaması, 16. ayda tek kelime, 24. ayda iki kelimeli cümle konuşmaya başlanılmaması ya da herhangi bir yaşta daha önce öğrenilen dil ve sosyal becerilerde kayıp otizm açısından değerlendirme endikasyonlarıdır (Filipek et al 1999). Anne-babanın genellikle 18. ay civarında konuşma ve dil gelişiminde gerilik nedeniyle duyduğu kaygılar ciddiye alınmalıdır (Prater, 2002). Sağlam çocuk muayenesinin bir parçası olarak uygulanan gelişimsel izlem gelişimsel bozuklukların tanı olasılığını artırır. ‘Denver gelişimsel tarama testi’ rutin gelişimsel izlem için birinci basamakta sık olarak kullanılmakla birlikte, gelişimsel bozuklukların tanısında duyarlılık ve özgüllüğü düşüktür (Frankenburg, 1992). Bu amaçla PEDS (Parents’ Evaluation of

Developmental Status) gibi daha uygun genel tarama testlerinin kullanılması önerilmektedir. Otizme özgül tarama testleri ise CHAT (Checklist for Autism in Toddlers), M-CHAT (“modified CHAT”), Q-CHAT (“quick and quantitative CHAT”), ESAT (“early screening for autistic traits”) ve PDDST’dir (Pervasive Developmental Disorders Screening Test-Stage I) (Baron-Cohen, 1992).

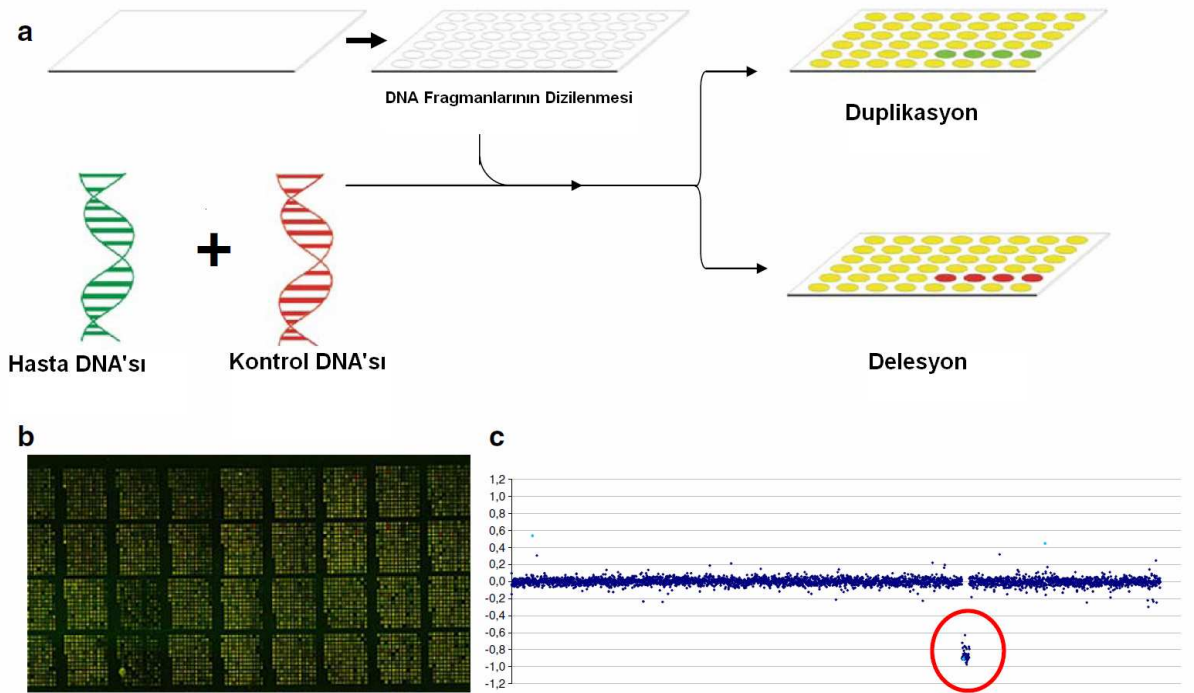
Otizm taramasında kullanılan testlerden hiçbiri ideal değildir ve 18 ayın üstündeki çocuklarda uygulanabilmektedir. Testler bu dönemde sosyal gelişim açısından kritik önemi olan ortak dikkat, hayali oyun ve sosyal oryantasyonun sorgulanması üzerine yapılandırılmıştır (Johnson, 2008). On sekiz ayın altındaki çocuklarda da kullanılabilecek otizme özgül tarama testlerinin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Erken dönemlerdeki riskli davranışların değerlendirildiği bir çalışmada, otistik çocukların %50’sinin 14 aya kadar tanınabildiği bildirilmiştir (Sigman, 2004). Özgül tarama testleriyle otizmden şüphelenildiğinde daha ileri gelişimsel değerlendirme ve bilişsel testlerin yapılması gerekir (Prater, 2002).

2.4 Tanıda İstenmesi Gereken Diğer Tetkikler

Sağırılık ve ağır işitme kaybında otizmle karışabilen klinik bulgular nedeniyle, otizm tanısı konan ya da konuşması geciken tüm çocuklarda işitme değerlendirilmelidir. İletişim kurulamayan çocuklarda “otoakustik emisyon” veya “BAER” en uygun yöntemlerdir. Letarji, siklik kusma, erken başlangıçlı konvülziyon, dismorfik özellikler veya mental geriliği olan çocuklarda doğumsal metabolik hastalık taramaları, pika öyküsü varlığında kurşun taraması yapılmalıdır. Çocuğun klinik bulguları tek başına otizmle açıklanamıyorsa kraniyal görüntüleme tekniklerinden yararlanılabilir (Filipek et al 1999). Klinik nöbet varsa, nöbet dışlanamıyorsa ve gerileme öyküsü varsa EEG istenmelidir. Tüberoz skleroz açısından cildin Wood’s lambasıyla incelenmesi gerekebilir. Ailede bilişsel işlevleri kısıtlı bireylerin varlığı ya da dismorfik özellikler genetik değerlendirme yapılmasını gerektirebilir. Mikrodelesyon sendromlarında her olguda tipik dismorfik bulguların olmadığı dikkati çekmiştir, bu nedenle otistik çocuklarda fenotip normal olsa da mikrodelesyon sendromlarını dışlamak açısından “array” CGH sitogenetik incelemelerini rutin tanıda uygulamaya başlayan klinikler bulunmaktadır.

2.5 Klasik CGH Tekniği (Comparative Genomic Hybridization)

CGH tekniği; temeli FISH'e dayanan, farklı floresan boya ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir sitogenetik yöntemdir. Genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimlerini inceleyerek hasta DNA' sında kromozomal kayıp (materyalde delesyon) veya belli bir bölgenin kazanımı (duplikasyon, insersiyon veya amplifikasyon) gibi kromozom anomalilerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar. Bu teknik ilk olarak Kallioniemi ve ark. (1992) tarafından kullanılmıştır.



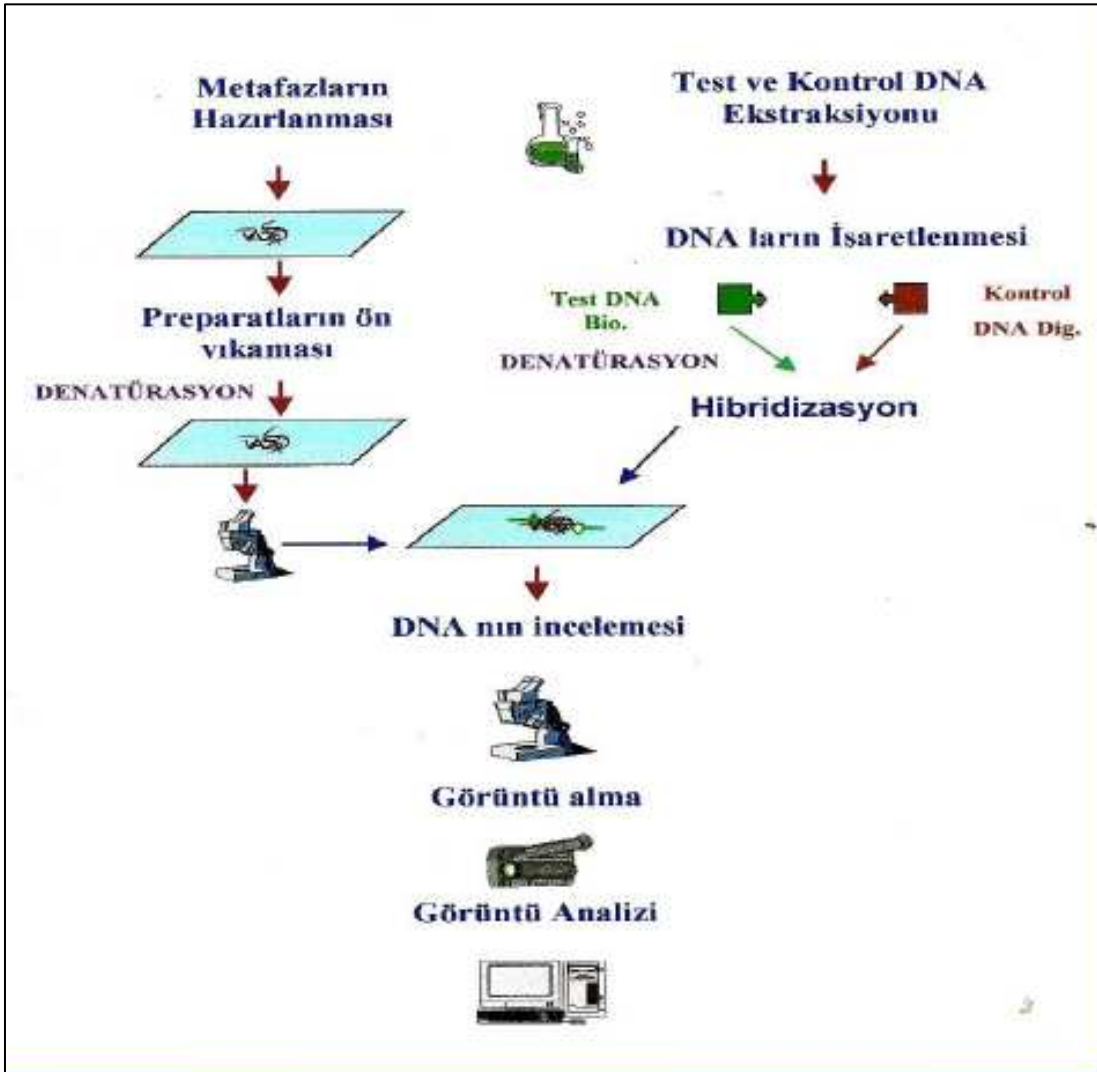
Şekil 2.1 CGH mikroarray (Whats New in Karyotyping. Thomy J. L. et al 2007)

Klasik CGH tekniğinin aşamaları:

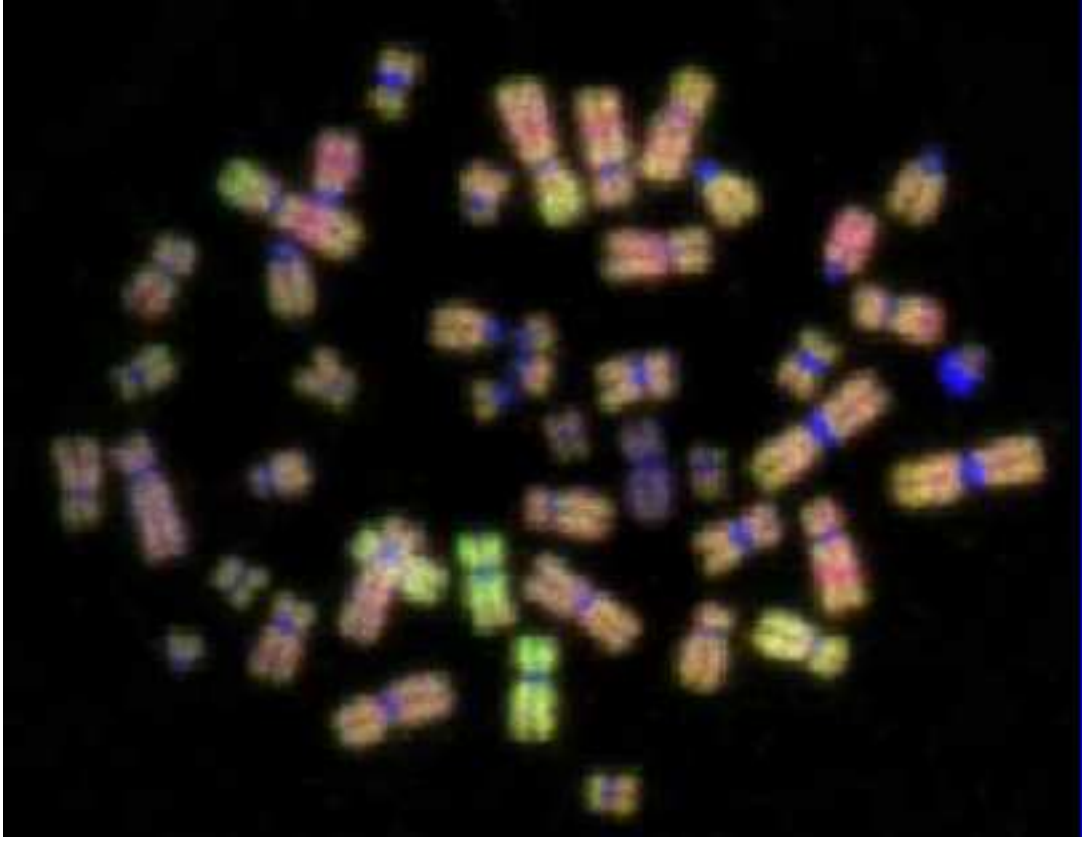
- Test ve referans hücrelerden genomik DNA elde edilmesi,
- Elde edilen DNA örneklerinin farklı renkte florokromlarla [Cy 3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı)] işaretlenmesi,
- Ard arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeleri önlemek için Human Cot-1 DNA ile muamele edilmesi,
- Normal hücrelerden metafaz plağı elde edilmesi ve denatürasyonu,

- Farklı renkte florokromlarla işaretli test ve referans hücrelerden elde edilen DNA materyalleri ile metafaz plağının co-hibridize edilmesi,
- Metafaz plağı üzerinde florokromlardan kaynaklanan renk farklılıklarına göre kromozomlardaki kayıpların veya kazançların yani amplifiye olan bölgelerin tespiti .

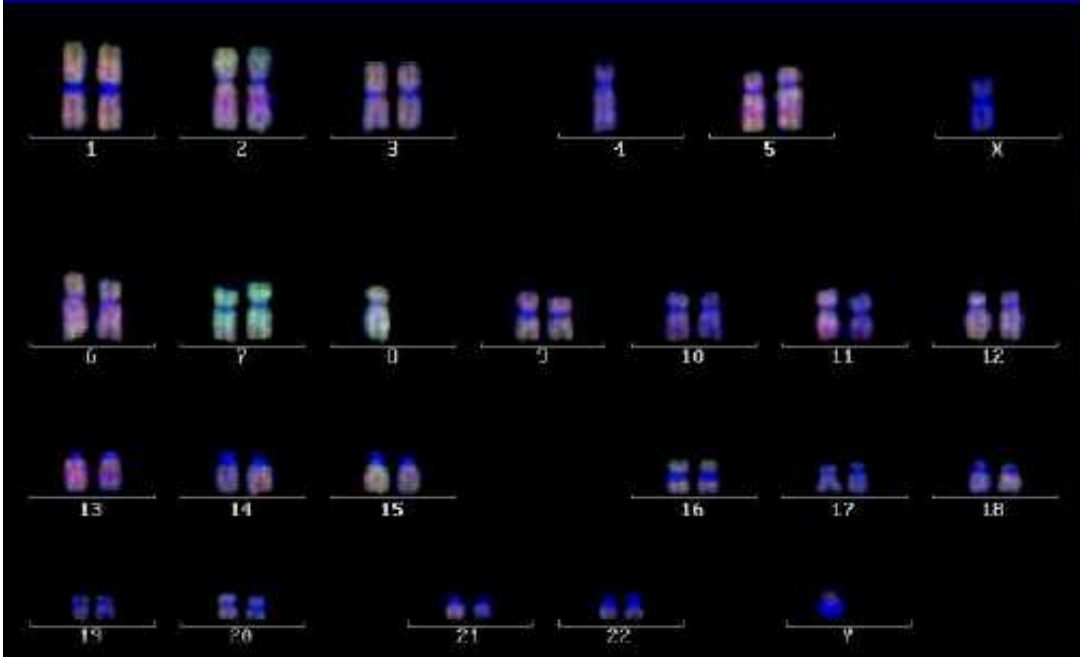
Tekniğin ana avantajı, iki renkli görüntüleme sistemi kullanılması sonucunda metafaz plağı üzerinde kromozom anomalilerinin normal karyotip analizine göre daha güvenilir saptanabilmesi ve en az iki genomun birbirleri ile karşılaştırılmasına olanak sağlaması iken, esas dezavantajı düşük kararlılık (10.000 – 20.000 kb) ve verimliliğidir. Bu teknik, kazanım (duplikasyon, insersiyon veya amplifikasyon) veya net kayıp (materyalde delesyon) gibi kromozom anomalilerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar.



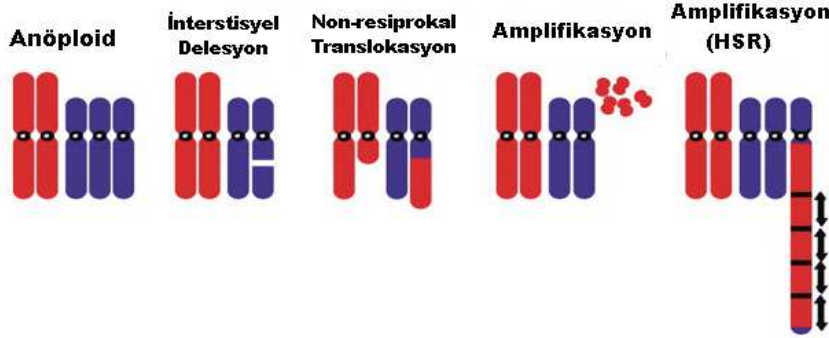
Şekil 2.2 Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH)(Özbaş H. AKU Tıbbi Genetik Doktora Programı)



Şekil 2.3 CGH Metafaz Plağı (Çine N. Savlı H, 1. Array CGH kursu 2010)



Şekil 2.4 CGH Karyotip (Çine N. , Savlı H, 1. Array CGH kursu 2010)



Şekil 2. 5 CGH ile belirlenebilen kromozom anomalileri (Albertson et al 2003)

2.6 Array-CGH Teknolojisi (Array Comparative Genomic Hybridization)

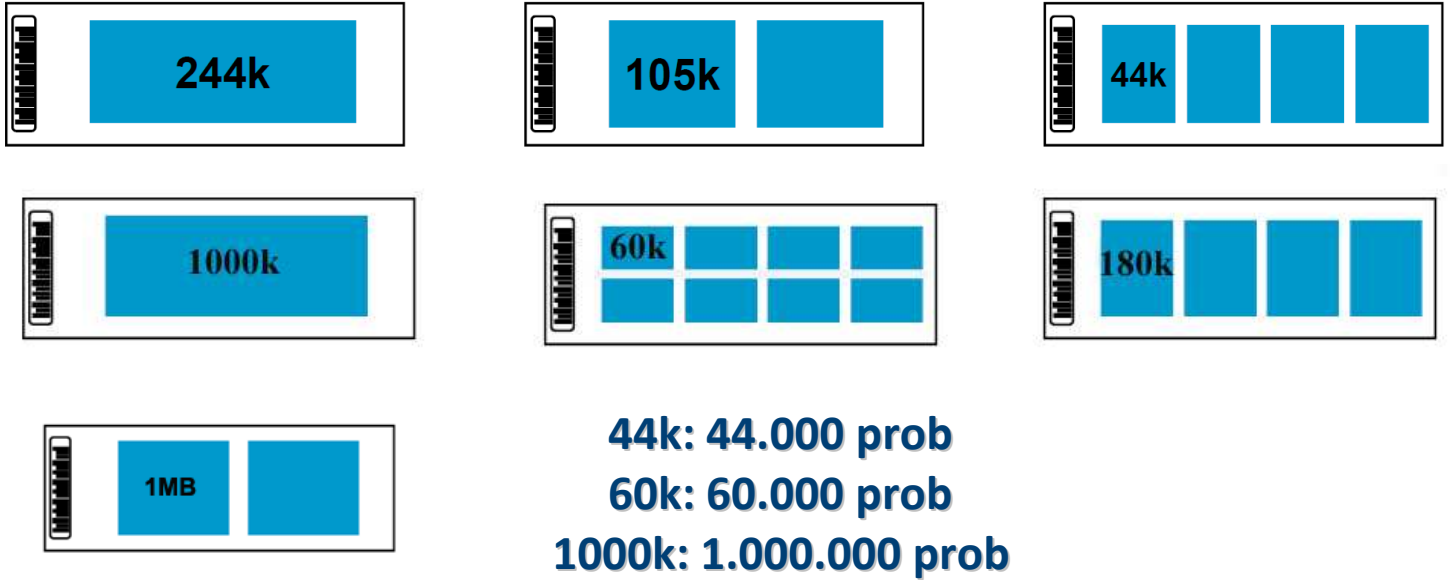
Moleküler biyolojideki geleneksel metotlarda genellikle “bir deneyde bir gen” ilkesi geçerlidir. Bu demektir ki gen fonksiyonlarının “bütün resmini” görmek geleneksel yöntemlerle zordur. Gen-çip teknolojisinin büyük bir ilgi ile karşılanmasının sebebi, bütün genomun basit bir çip üzerinde görüntülenmesini vaat etmesi ve bu sayede bilim adamlarının aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmesine olanak tanınmasıdır.

Bilgisayar teknolojisinin moleküler biyolojiye paralel olarak hızla gelişmesi, iki disiplini birbirine yaklaştırmıştır. Böylece, biyoteknolojinin kavramsal olarak ulaşabileceği son noktalardan biri olan gen-çip (mikroarray) ortaya çıkmıştır(Schena et al 1995).

Bir tarama yöntemi olarak önerilecek en değerli teknoloji, son yılların en gözde teknolojisi olan mikroarray teknolojisidir. İlk olarak kanserdeki genomik değişimleri araştırmak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Bejjani et al 2006). Ancak aCGH insanda genetik bozukluklara neden olan DNA kopya sayısı değişikliklerinin analizi içinde uygundur. Bu teknolojiyle bir hastanın bünyesine bulunan tüm genleri (insanda toplam gen sayısı otuz bindir) birkaç saat içinde tek bir deney ile taramak mümkündür. İlk kez 1997 de Solinas-Toldo ve ark. hedef (target) diziyi cam matriks üzerine immobilize ederek array-CGH'nin temelini atmışlardır. Daha sonra 1999 yılında Pollack ve ark. array

platformu üzerine cDNA dizisini (target) immobilize ederek genom düzeyinde DNA daki kopya sayısındaki değişmeleri incelemişler.

Mikroarrayler cam, plastik veya silikon ip gibi katı bir yzeeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır (Bejjani et al 2006). Bir mikroarray’de bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yzeeye tutturulan bu DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanmıştır. Bu yeni teknikte membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini fluoresan işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı artmıştır. Kısa sürede ve oldukça pratik olarak on binlerce genin analizini yapmak mümkündür. Otomasyona dayalı bir sistem olduğu için insan kaynaklı hataların ortaya çıkma ihtimali düşüktür (Savlı et al 2002,2008)



şekil 2.6 2010’da güncel kullanımda olan Array CGH slayt Formatları (Çine N. , Savlı H, 3. Array CGH kursu 2010)

Oligoarray

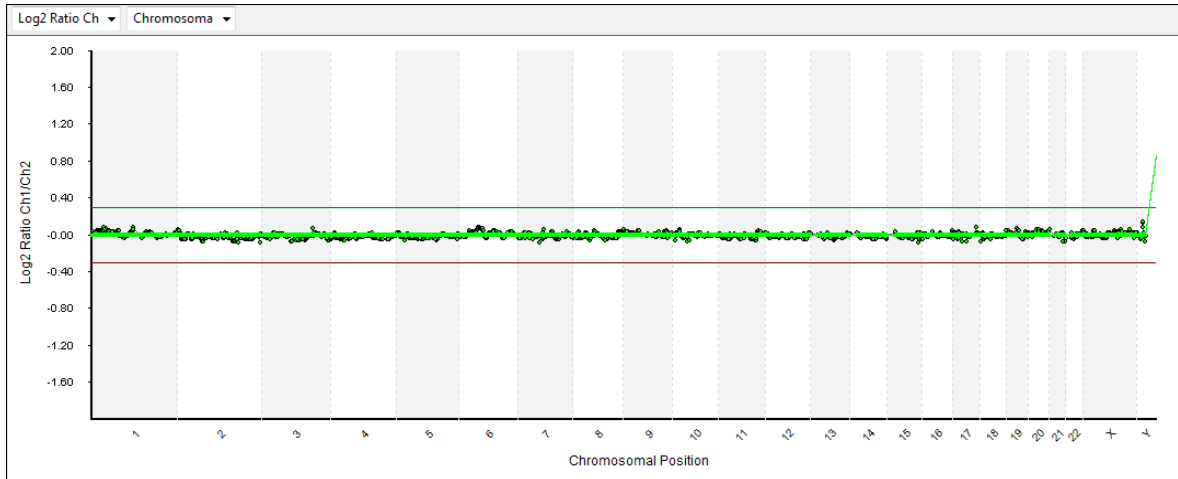


44k = 44.000 prob
44.000 X 65bp = 2.860.000bp
2.860.000 = 3MB lık kapsama
Genom = 3.000.000.000
Tüm genomu 1/1000 ölçeğe tarar

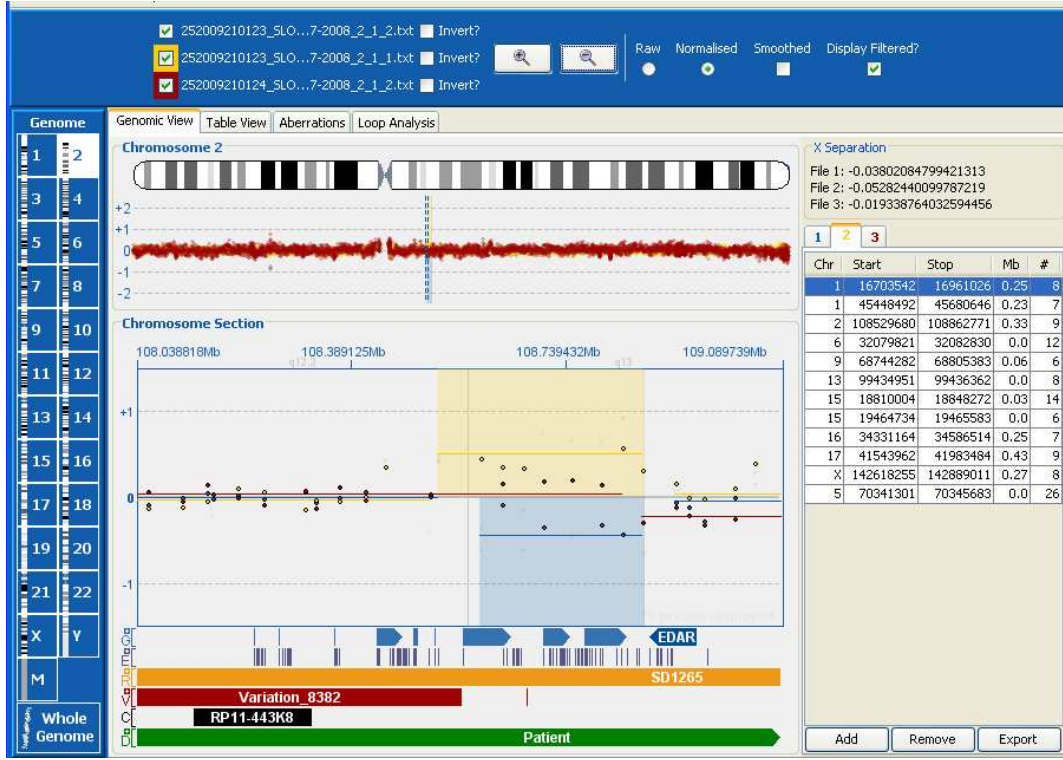


BACArray
Genomun 1/3000 ini görür

Şekil 2.7 Array Slide Formatları
(Çine N. , Savlı H, 3. Array CGH kursu 2010)



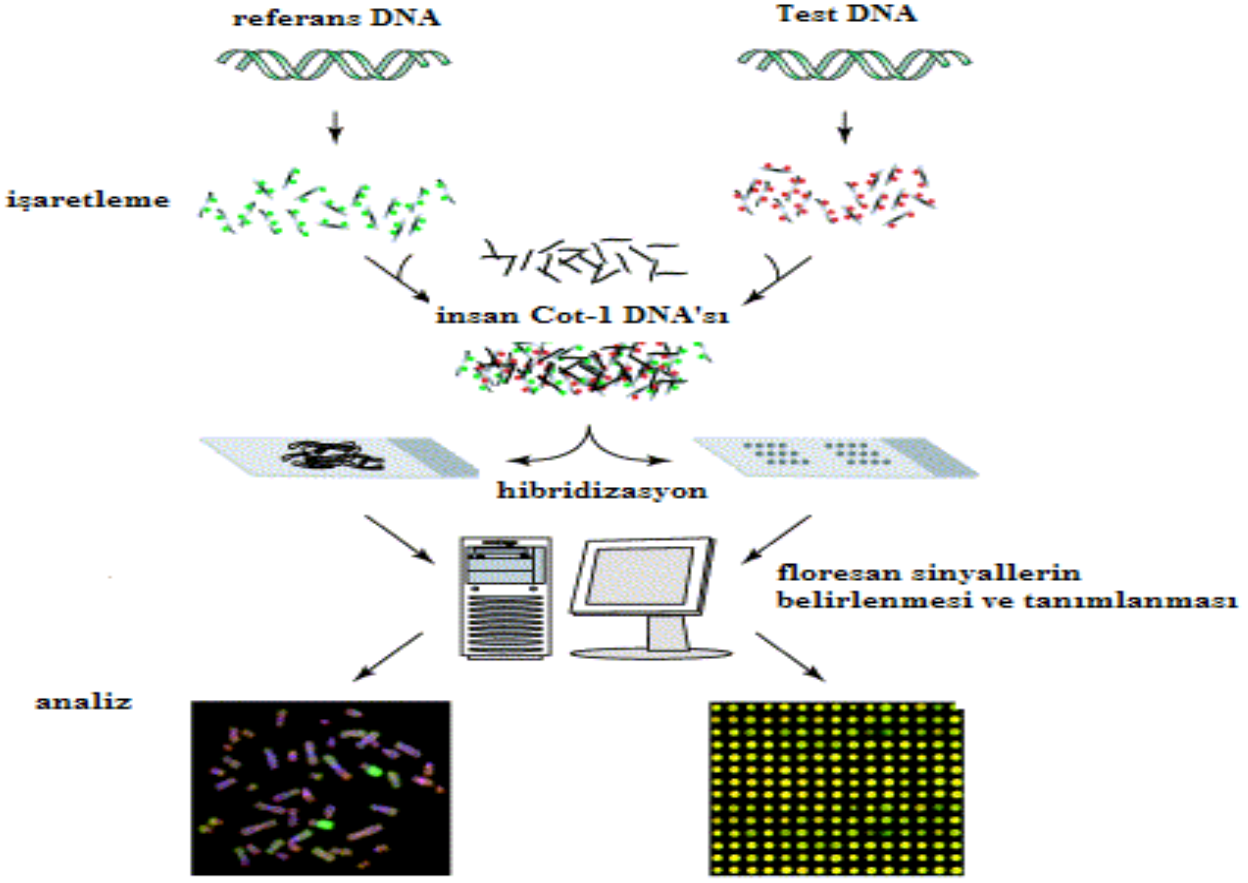
Şekil 2.8 Probların Genel Görünümü
(Çine N. , Savlı H, 3. Array CGH kursu 2010)



Şekil 2.9 CGH Analiz Programı Görünümü
(Çine N. , Savlı H, 3. Array CGH kursu 2010)

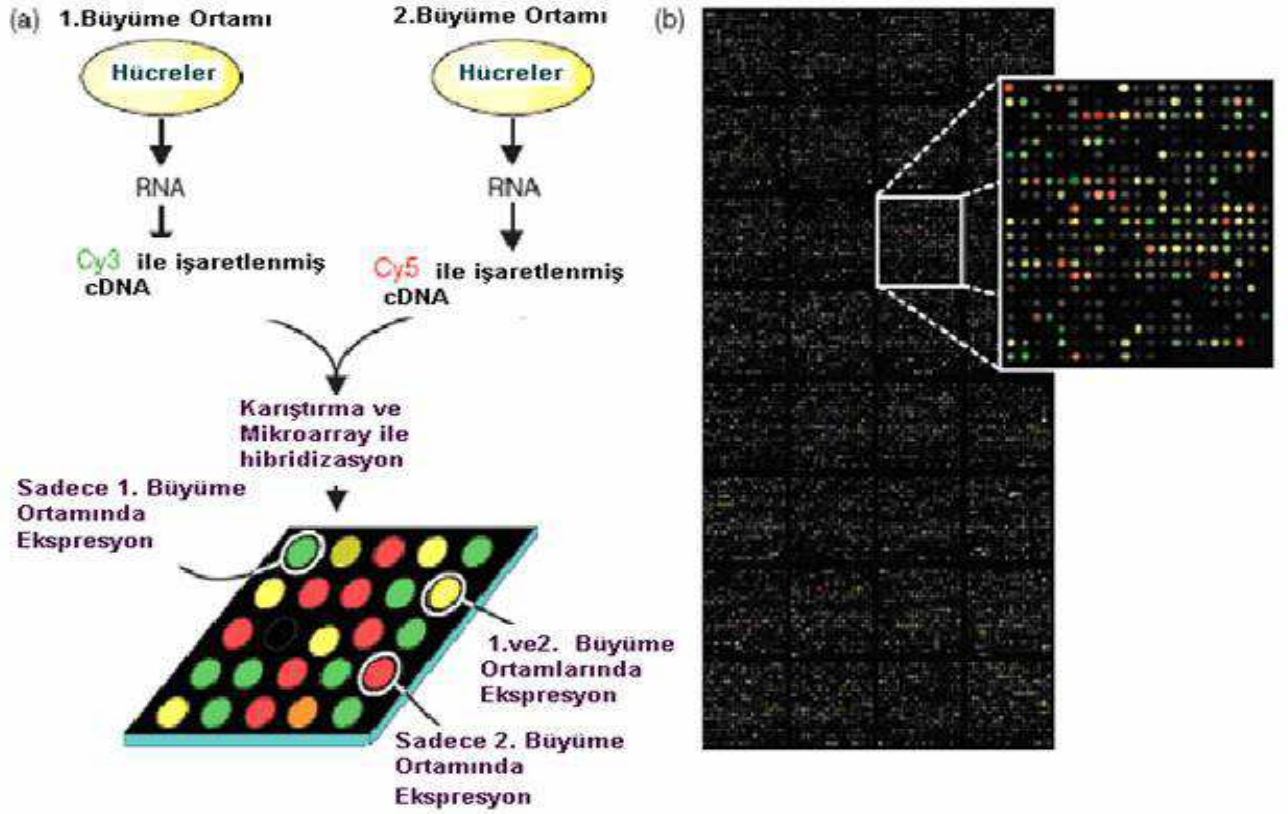
Array CGH Tekniğinin aşamaları:

- Test ve referans hücrelerden genomik DNA izolasyonu,
- İzole edilen bu DNA materyalinin farklı renkte florokromlarla [Cy 3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı)] işaretlenmesi,
- Ard arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeleri önlemek için Human Cot-1 DNA ile muamele,
- BAC, PAC, kosmid, cDNA, oligonukleotid ve PCR türevli problemlerin (targit) cam matriks üzerine immobilizasyonu,
- Hibridizasyon aşaması,
- Bilgisayar ortamında çeşitli analiz programları ile floresan sinyallerin tanımlanarak sonucun yorumlanması.



Şekil 2.10 CGH ve A-CGH tekniklerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi. (Özbaş H. AKU Tıbbi Genetik Doktora Programı)

Test ve referans örneklerden DNA izolasyonu için taze veya dondurularak saklanan homojen doku veya hücre populasyonları kullanılır.



Şekil 2.11 Array CGH şematik gösterimi. (Özbaş H. AKU Tıbbi Genetik Doktora Programı)

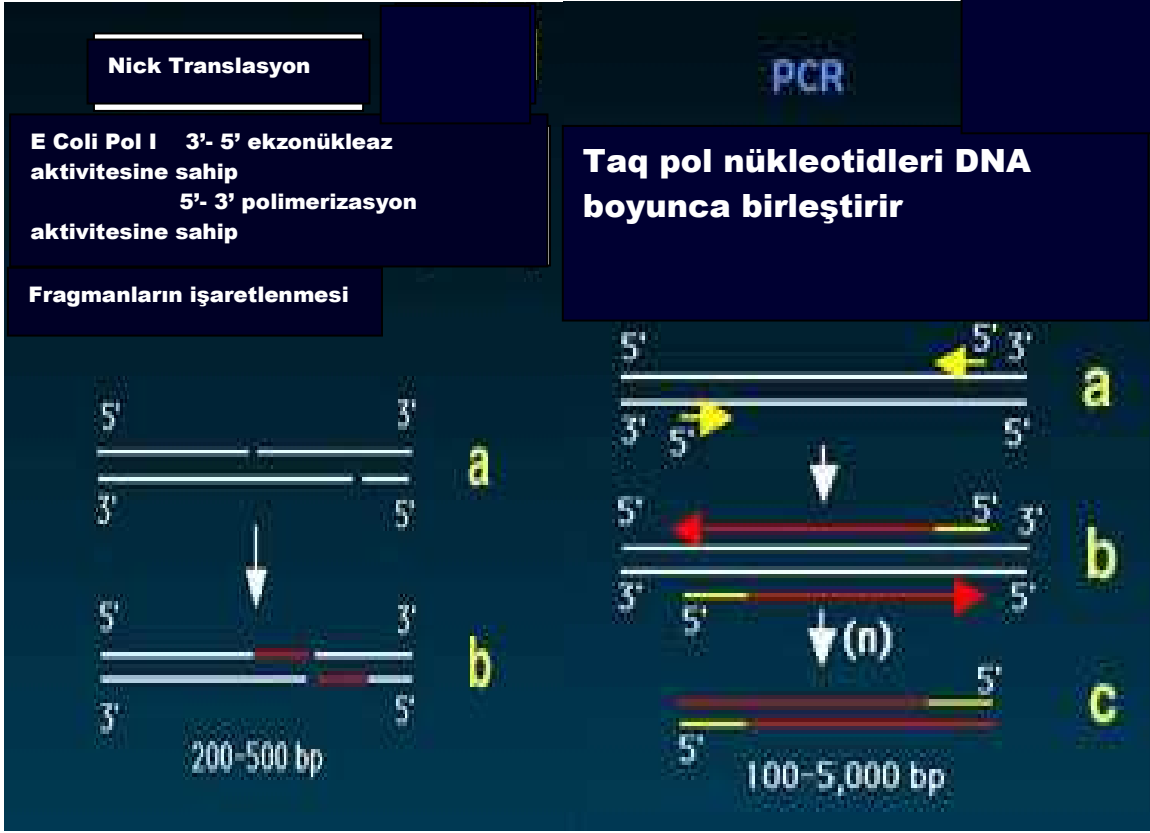
2.6.1 DNA'nın işaretlenmesi

Test ve referans doku veya hücrelerden elde edilen genomik DNA'nın farklı renkte florokromlarla işaretlenmesinde yaygın olarak 3 yöntem kullanılır:

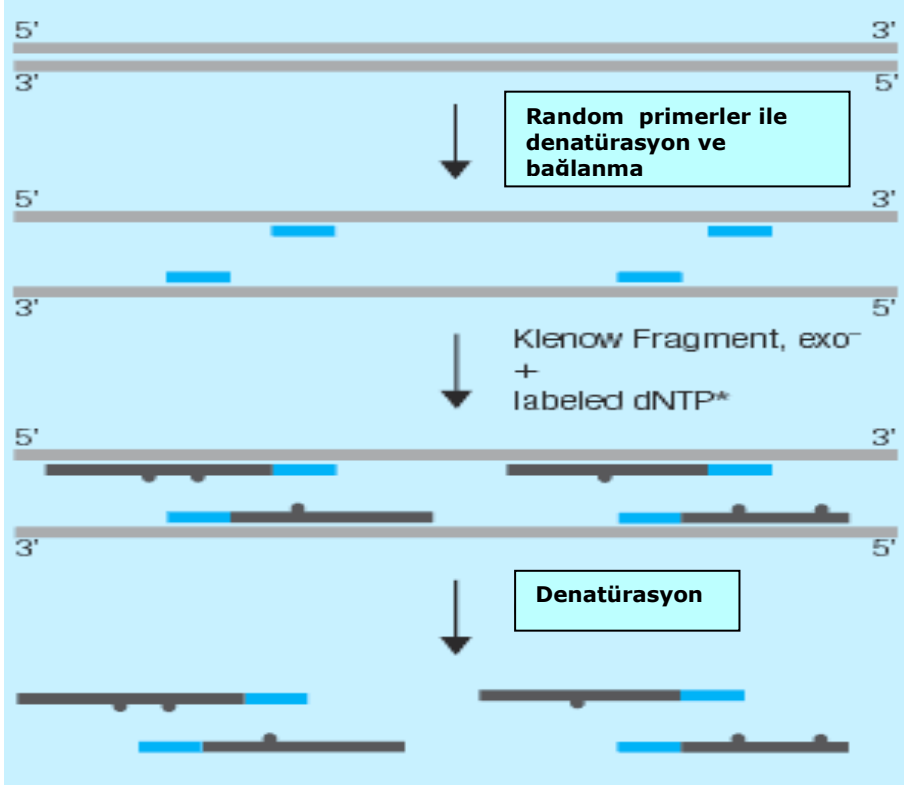
- Nick Translasyon,
- Random(Rastgele) Primerlerle PCR,
- Kimyasal yöntem.

FISH çalışmalarında en çok kullanılan DNA probu işaretleme yöntemi Nick Translation yöntemidir. Bu yöntemde Biotin ve digoxigenin kullanılır. Biotin ve digoxigenin kullanılmasının nedeni sensitivitesi ve uygulama kolaylığıdır.

- Biotin test DNA sının işaretlemesinde
- Digoxigenin Kontrol DNA sının işaretlemesinde kullanılır.



Şekil 2.12 Nick translasyon yöntemi ile DNA'nın işaretlenmesi (Özbaş H. AKU Tıbbi Genetik Doktora Programı)



Şekil 2.13 Rastgele primerler kullanarak DNA'nın işaretlenmesi. (Özbaş H. AKU Tıbbi Genetik Doktora Programı)

Standart bir microarray matrisi, yaklaşık olarak 100 µm çapında, bir cm²'sinde 40.000 spot (benek) içerir. Buna göre cam matris üzerine immobilize edilen problemlerle test ve referans örneklerden elde edilen farklı renkte florokromlarla işaretlenmiş genomik DNA'ların hibridizasyondan sonra cam matris üzerinde elde edilecek floresan ışığın şiddeti verilerin doğru analiz edilmesinde önemlidir.

A-CGH için microarray matrisinde kullanılan prob (target)lar:

- BAC, PAC ve kozmitler,
- PCR ve ya cDNA ürünleri,
- Oligonükleotidler.

BAC, PAC ve kozmitlerden elde edilen problar, PCR, cDNA, Oligonukleotidlerden elde edilen problara göre daha güçlü sinyal yoğunluğu verirler.

Problar, farklı PCR yöntemleri kullanılarak *in situ* olarak amplifikiye edildikten sonra cam matriks üzerine immobilize edilirl Cam matriks üzerine immobilize edilen problar daha sonra farklı renkte florokromlarla işaretlenmiş test ve referans DNA örnekleri içeren hibridizasyon solüsyonu ile 16-72 saat süresince melezleştirilir. Hibridizasyondan sonra fazla olan işaretli DNA örneklerini ortamdan uzaklaştırmak için cam matriks yıkama işlemine tabi tutularak kurutulur ve mikrotarayıcıda taranan görüntü bilgisayar ortamına aktarılarak çeşitli biyoinformatik programları ile verilerin değerlendirmesi yapılır

Array CGH Tekniğinin Kullanım Alanları:

- Kanser araştırmalarında,
- Haritalamada,
- Diagnostikte,
- Epigenetik modifikasyonlara yönelik çalışmalarda,

Array CGH Klinik Uygulamadaki Yeri

- Tüm Genom Analizi ile CNV u tanımlayabilir.
- Konvansiyonel Metodların Karakterizasyonu.
- Anöplidiler
- Delesyon ve Duplikasyonlar
- Submikroskopik Değişimler
- Mozaiklikler - %10 dan çok ise

Array CGH -Hastahklarla İlişkisi

- Spontan düşükler
- Mental Retardasyonlar
- Multiple Malformasyonlar
- Prenatal Tanı

- Kanserler
- Multifaktöryel Kalıtılan Hastalıklar

A-CGH Tekniğinin Avantajları

- Farklı renklerde florokromların kullanılması genom boyunca DNA kopya sayısındaki değişimlere bağlı olarak ortaya çıkan kromozom anomalilerinin güvenilir şekilde tespiti ve sınıflandırılabilmesi,
- Birden fazla genomun birbirileri ile karşılaştırılabilmelerine olanak sağlaması,
- Az miktarlarda DNA örneğinin yeterli olması,
- Metafaz plağı gerekli değil,
- Tüm genomun tek bir deneyle analiz edilebilmesi
- DNA üzerindeki tek baz değişikliklerinin bile saptanabilmesi,
- Yüksek kararlılık ve verim,
- Yüksek hassasiyet,
- Başarılı sonuç alınabilirlik,
- Hız ve esneklik,
- Doğrulanabilirlik,
- Verifikasyon.

A-CGH Tekniğinin Sınırlandığı Noktalar,

- Alanında uzman kişilere ihtiyaç duyması,
- Heterojen doku ve hücre populasyonları ile çalışmanın zorluğu,
- Standardizasyonun zorluğu,
- Dengeli anomaliler tespit edilemez,
- CNV tanıyı güçleştirebilir,
- Maliyet,
- Çözünürlük.

BAC Array- Oligo Array Karşılaştırması:

BAC Array	Oligo Array
100.000-170.000Bp (100-170kb)	65bp
Bir gen için ortalama 3-5 overlap BAC klonu	Yüksek çözünürlük
Tekrarlanabilirliği yüksek	CNV belirleme
Kolay Hibridizasyon	
Yüksek İşaretleme başarısı	

Çizelge 2.2: BAC Array- Oligo Array Karşılaştırması

Limitasyonları:

BAC Array	Oligo Array
100.000-170.000Bp (100-170kb) en az %50 si bağlanabilir	Sinyal Yetersizliği
50.000-85.000bp minimum rezolüsyon	Yanlış pozitif bağlanma
	4-6 prob bağlanma zorunluluğu
	Data verifikasyonu
	Degrade DNA-Parafin Blok ta düşük verimlilik

Çizelge 2.3: BAC Array-Oligo Array limitasyonları

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Yöntem

Çalışmamızda; 0 ile 18 yaş arası, cinsiyet farkı gözetmeksizin, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'na başvuran 35 hastadan alınan periferik kan örneği kullanılmıştır. Her bir hasta gen-çip üzerinde bir kez melezleştirilmiş olduğundan, toplam 35 adet melezleştirme gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Hastaların tanıları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Psikiyatrisi tarafından DSMIV tanı kriterlerine göre konulmuştur. Hasta grubuna ait DNA örnekleri ayrı ayrı toplanarak incelenmiştir. Grupta 0-18 yaş arasında cinsiyet farkı gözetilmeksizin 35 hasta yer almıştır. Toplam 35 otizmlili hastada array-CGH yöntemi kullanılarak genetik hasar saptama çalışması yapılmıştır. Hastaların ebeveynlerinden aydınlatılmış onam alınmıştır.

Çalışmanın etik onayı Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından alınmıştır (11/23, 2009).

3.2 DNA İzolasyonu

Çalışmaya katılan hastalardan 3 ml EDTA'lı tüplere kan alındı. İzlenen yöntemde Toplanan kanlardan Qiagen (GERMANY)DNeasy Blood & Tissue Kit – 50 (Cat. No:69504) kullanılarak DNA elde edilir.

Ön İşlemler:

1. Isıtıcı blok 56C ye ısıtılır.
2. Örnekler oda ısısına getirilir

İzolasyon:

1. 1,5 mL'lik ependorf tüpe 40 µl Proteinase K, 400 µl Buffer AL pipetlenir ve vorteks ile homojen bir karışım elde edilir.
2. Karışım 56 C ısıtıcı blokta 10 dakika inkübe edilir.
3. İnkübasyon sonrasında karışıma 400 µl absolute alkol eklenir ve vorteks ile homojen bir karışım elde edilir.

4. Karışımın tümü DNeasy Mini Spin kolonuna eklenir ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
5. Kolonun dibinde toplanan sıvı atılır. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konulur.
6. Filtreye 500 µl %80'lik etanol eklenir ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Kolonun dibinde toplanan sıvı atılır. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konulur.
8. Filtreye 500 µl AW1 solüsyonun eklenir ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Kolonun dibinde toplanan sıvı atılır. Filtre yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konulur.
10. Filtreye 500 µl %80'lik etanol eklenir ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Kolonun dibinde toplanan sıvı atılır.
12. Tüp boş olarak 20000g'de 4 dakika santrifüj edilir.
13. Filtre 1,5 ml'lik eppendorf tüp içine yerleştirilir ve 85 µl nuclease-free su eklenir.
14. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir ve 8000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Filtre atılır. Elde edilen DNA miktarı 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçülür. A_{260}/A_{280} oranı 1,7 ile 2.0 arasında olan DNA'lar kullanılır.



Şekil 3.1 DNA ölçümünde kullanılan spektrofotometre

3.3 Agaroz jel elektroforezi

1lt 1X TBE Hazırlanışı: 100 mL 10X TBE (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) 900 mL distile su içinde çözülür.

% 1'lik agaroz jel, 35 mL 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra bir süre soğumaya bırakılır. Çözünen agaroz jelin içine 2 µL ethidium bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlanır. Jel, elektroforez tepsisine döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 1X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyulara DNA miktarı 80-100 ng olacak şekilde ampikon, 1,5 µL yükleme boyası, 5 µL nuclease-free su ile karıştırılarak pipetlenir. DNA boyut markırı da bir başka kuyuya pipetlenerek 50 amper, 100 voltta 60 dakika yürütülür. DNA UV translüminatör ile görüntülenip fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.

3.4 DNA Lekeleme :

1. 0,2'lik tüplere DNA miktarı 8µl de 500 ng olacak şekilde nuclease-free su ve genomik DNA konulur.
2. 95 C de 10 dakika inkübe edilir. Örnekler buz üstünde 3 dakika bekletilir.
3. 6000g de 30 saniye santrifüj edilir.
4. Lekeleme karışımı aşağıda verildiği gibi hazırlanır ve fragmente olmuş 8 µl lik genomic DNA üzerine eklenir.

Lekeleme Karışımı

Nuclease-free su: 0,5µl

ULS-Cy3 veya ULS-Cy5 : 0,5 µl

10x Lekeleme Solüsyonu: 1 µl

5. Karışım 85C de 30 dakika inkübe edilir.
6. Örnekler buz üzerinde 3 dakika bekletilir.
7. 6000g de 1 dakika santrifüj edilir.
8. Karışımın üstüne 10 µl nuclease-free su eklenir. Son hacim 20 µl olur.

3.5 Pürifikasyon :

Agilent KREApure Kolonlarının Hazırlanması:

1. Kolonlar vortekslenir.
2. Kolonların kapakları ¼ oranında açılarak dip kısımdaki kapak kırılır.
3. Kolonlar 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilir ve 16000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
4. Dipte toplanan sıvı atılır, kolonlar aynı toplama tüpüne yerleştirilir.
5. Kolonların içine 300 µl nuclease-free su konulur ve 16000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
6. Toplama tüpleri atılır. Kolonlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirilir.
7. Örnekler kolonlara yüklenir ve 16000g'de 1 dakika santrifüj edilir.
8. Kolonlar atılır. Pürifiye olmuş örnekler NanoDrop, ND-1000 cihazı kullanılarak A₂₆₀ nm (DNA), A₅₅₀ (Cy3) ve A₆₅₀ (Cy5) absorbans değerleri ölçülür. Boyanma miktarları (DOL= Degree of Labelling) aşağıda verilen formüle göre hesaplanır. DOL değeri 1,5 ile 3 arasında olan örnekler hibritleme için konsantratöre konulur. 45C'de, yüksek vakumda, 45 dakika örnekler kurutulur. Örneklerle 22 µl nuclease-free su eklenir ve -20C'de saklanır.

$$\text{DOL} = \frac{340 \times \text{pmol per } \mu\text{l dye}}{\text{ng per } \mu\text{l gDNA} \times 1000} \times \%100$$

3.6 Hibridizasyon :

1. Hibridizasyon için karışım hazırlanır. 22 µl olan lekelenmiş genomic DNA içine 61 µl hibridizasyon karışımı eklenir.

Hibridizasyon Karışımı

Cot 1 DNA (1.0 mg/mL)	5 µl
Agilent 100X Blocking Agent	1 µl
Agilent 2x Hi-RPM Hybridization Buffer	55 µl
Toplam	61 µl

2. Örnekler 94C 'de 3 dakika denature edilir.
3. 37C' de 30 dakika inkübe edilir.
4. Örneklerin üstüne 27 µl KreaBlock solüsyonu eklenir.
5. Her örnekten 100 µl çekilir ve Syndrome Plus 4x44k ISCA slidelara yükleme yapılır.
6. Hibridizasyon fırınında 65C' de 20 rpm' de 24 saat hibritlenmeye bırakılır.
7. Yıkama için 2 numaralı solüsyon 37C' lik etüve konur.

3.7Yıkama :

1. İki kabın içine 1 numaralı yıkama solüsyonundan üçüncü kaba 2 numaralı yıkama solüsyonundan konur.
2. Birinci kabın içinde Syndrome Plus 4x44k ISCA slide Gasket slidedan ayrılır.
3. İkinci kabın içinde Syndrome Plus 4x44k ISCA 5 dakika oda ısısında bekletilir.
4. Syndrome Plus 4x44k ISCA slide hızlı bir şekilde üçüncü kabın içine aktarılır. 1 dakıda beklenir.
5. Syndrome Plus 4x44k ISCA slide hızlı bir şekilde kurutulur ve taranır.

3.8 Alet ve Cihazlar :

1. DNA izolasyon cihazı (MagNA Pure Compact Instrument)
2. Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000)
3. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
4. Derin dondurucu (-20°C Arçelik)

5. Thermal cycler (Applied Biosystems, 2720)
6. Mikrodalga fırın (Sinbo)
7. Jel elektroforez cihazı (Lightning Volt Power Supply, Model 05P-300)
8. Fotograf bağlantılı UV translüminatör (Geneline Image Analysis System)
9. Hassas terazi (AND Gr-200)
10. Otomatik pipet (2.5, 10, 100, 1000 µL) (eppendorf)
11. Agilent Microarray Scanner (Agilent)
12. Hybridization Chamber (Agilent)
13. Hybridization Chamber Gasket Slide 4x Microarrays (Agilent)
14. Hibridizasyon Fırını (Agilent)
15. Magnetik Karıştırıcı
16. Magnetik Isıtıcı Blok
17. Vakum – Speed Vac

3.9 Sarf Malzemeleri :

1. DNeasy Blood&Tissue Kit (50) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)
 - DNeasy Mini Spin Columns
 - Collection tubes (2 ml)
 - Buffer ATL
 - Buffer AL
 - Buffer AW1
 - Buffer AW2
 - Buffer AE
 - Proteinase K
2. Steril, Nuclease-free 2.5, 10, 100, 200, 1000'lik pipet uçları (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)
3. %100'lük etanol (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA)
4. Nuclease-Free water (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
5. Agaroz (PRONA)
6. 6X DNA Loading Dye (FERMENTAS INTERNATIONAL INC, CANADA)
7. TBE Buffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)
8. Ethidium Bromide
9. Hybridization Chamber gasket slides (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)

10. Stabilization&Drying Solution (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
11. Acetonitrile (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)
12. Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 1 and 2 set(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
 - Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 1
 - Agilent Oligo aCGH Wash Buffer 2
13. Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
 - 2X Hi-RPM Hybridization Buffer
 - 10X aCGH Blocking Agent
14. Agilent İnsan aCGH Çipi, 4X44K (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
15. Agilent CGHblock (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
16. Agilent Oligo aCGH Labeling Kit module (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
 - Agilent-KREApure columns
 - Agilent Collection tubes
 - ULS-Cy5 Reagent
 - ULS-Cy3 Reagent
 - 10X Labeling Solution
17. Human Cot-1 DNA (Invitrogen)
18. Human Genomic DNA (Promega, Madison, USA)
 - Human Genomic DNA (female)
 - Human Genomic DNA (male)
19. QIAGEN RNase A (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)

3.10 Array-CGH hibridizasyonu ve slayt taramaları:

Melezleştirme işlemi Agilent marka (Agilent Microarray Oven; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) fırında 24 saat süresince uygulandı. Elde edilen melezleşmiş ortam Agilent G2505B model mikrotarayıcıda kapalı ortamda taranarak yüksek çözünürlüklü ayrıntılı görüntü verilerine ulaşıldı.



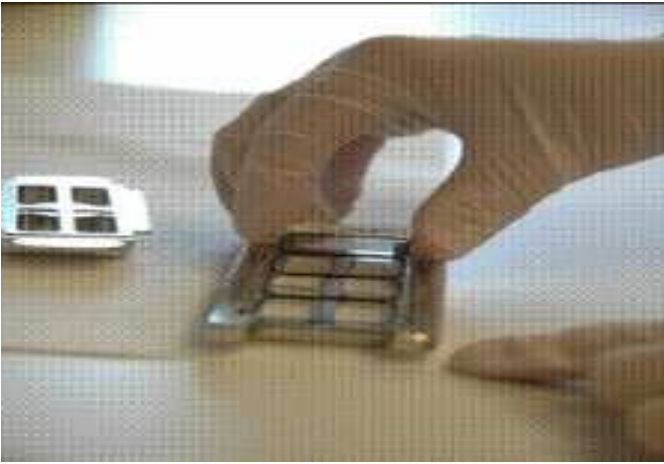
Şekil 3.2 DNA hibridizasyon fırını (Agilent Microarray Oven; Agilent Technologies, Palo Alto, CA)



Şekil 3.3 Slide yıkama küveti



Şekil 3.4: Agilent Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)



Şekil 3.5: Slide yüklenmesi

3.11 Veri Analizi

Veri analizi Feature Atraction adı verilen analiz programı ile yapıldı. Bu programda sayısal veri görüntü haline dönüştürüldü. Görüntü üzerinde kalite kontrol analizi yapıldı (QC Metric). Uygun olan hasta örnekleri seçilerek analiz yazılımına (Cytosure Analysis Software Version 2.2) aktarılarak olası delesyon ve duplikasyon bulguları varlığı araştırıldı

4. BULGULAR:

Anabilim dalımıza Eylül 2009-Şubat 2010 tarihleri arasında primer otizm tanısı ile başvuran 35 hastadan alınan kan örneklerinin, yukarıda anılan yöntemlerle tam genom array CGH analizleri gerçekleştirildi. Hastaların 6 tanesi kız 29 tanesi erkek idi. Hastaların yaş ortalaması 8.5(SS: 3.41) idi.

Polikliniğe başvuran 35 otizm hastası ile yaptığımız çalışmanın sonucunda hastaların 30'unda çeşitli kromozomların farklı bölgelerinde delesyonlara rastlandı.

4.1 Delesyon bölgeleri:

Hastaların 30'unda çeşitli bölgelerde delesyonlara rastlandı. Bu hastalarda 32 delesyon bölgesine rastlandı. Delesyonlar ve delesyonların saptandığı hasta sayıları çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bu verilere göre; 2q21.1 delesyonu 8 hastada, 16p11.2 delesyonu 12 hastada, 6q26 delesyonu 1 hastada, 8p23.1 delesyonu 7 hastada, 16p13.11 delesyonu 13 hastada, 1q21.1 delesyonu 10 hastada, 12q24.31 delesyonu 1 hastada, Xq28 delesyonu 1 hastada, Yq11.21-q11.223 delesyonu 2 hastada, 2p11.2 delesyonu 2 hastada, 7q11.1-q11.21 delesyonu 1 hastada, 7q11.23 delesyonu 1 hastada, 16p13.3 delesyonu 2 hastada, 10q11.22 delesyonu 4 hastada, 3q22.3 delesyonu 1 hastada, 7q21.3 delesyonu 1 hastada, 5q13.2 delesyonu 2 hastada, Yq12 delesyonu 1 hastada, 10q26.3 delesyonu 1 hastada, 18p11.32 delesyonu 1 hastada, 1p21delesyonu 1 hastada, 7q36.3 delesyonu 3 hastada, 11p15.5 delesyonu 3 hastada, Xq26.3 delesyonu 1 hastada, Xq27.1 delesyonu 1 hastada, 2p21delesyonu 6 hastada, Xq21.1-q21.31 delesyonu 1 hastada, 17q21.33 delesyonu 1 hastada, 2q13 delesyonu 1 hastada, 17q24.3 delesyonu 2 hastada, 16q21 delesyonu 1 hastada, 1q32.2 delesyonu 1 hastada saptandı.

Delesyon Bölgesi	Hasta Sayısı	Yüzdesi
16p13.11	13	%36.1
16p11.2	12	%33.3
1q21.1	10	%27.7
2q21.1	8	%22.2
8p23.1	7	%19.4
2p21	6	%16.6
10q11.22	4	%11.1
7q36.3	3	%8.3
11p15.5	3	%8.3
Yq11.21-q11.223	2	%5.5
2p11.2	2	%5.5
7q11.23	2	%5.5
16p13.3	2	%5.5
5q13.2	2	%5.5
17q24.3	2	%5.5
6q26	1	%2.7
12q24.31	1	%2.7
Xq28	1	%2.7
7q11.1-q11.21	1	%2.7
3q22.3	1	%2.7
7q21.3	1	%2.7
Yq12	1	%2.7
10q26.3	1	%2.7
18p11.32	1	%2.7
1p21	1	%2.7
Xq26.3	1	%2.7
Xq27.1	1	%2.7
Xq21.1-q21.31	1	%2.7
17q21.33	1	%2.7
2q13	1	%2.7
16q21	1	%2.7
1q32.2	1	%2.7

Çizelge 4.1: Otizimli hastalarda delesyon bölgeleri

4.2 Hastaların Dağılımı:

Çalışmamızda yer alan hastaların 6 tanesi kız 29 tanesi erkekti. Hastaların yaş ortalaması 8.5 idi. Hastalarımızın 8 tanesinde dismorfik görünüm, 1 tanesinde hafif mental retardasyon, 1 tanesinde epilepsi otizme eşlik etmekteydi. Hastalarımızın 5 tanesinde herhangi bir delesyon-duplikasyon bölgesine rastlanmadı ve normal kromozom yapısı saptandı. 3 tanesinde ise delesyon bölgesi tek kromozoma lokalizeydi

CİNSİYET	YAŞ	TANI	SONUÇ
F	8	Otizm	1p36.33, 1q21.1, 10q11.22, 2q21.1, 5p13.3
M	5yaş 8 ay	Otizm	2q11.1, 16p11.2
F	9	Otizm	10q11.22
F	9	otizm	Normal
M	5yaş 6ay	Otizm	1q21.1, 2q21.1, 5q13.2, 10q11.22, 14q32.33, 16p11.2, Yq11.221-q11.223
M	14	Otizm	1q21.1, 2q21.1, 16p13.11, 16p11.2, Yq11.21-q11.223
M	13	Otizm	1q21.1, 2q21.1, 16p13.11, 16p11.2
M	14	Otizm	8p23.1, 12q24.31, 16p11.2
M	8	Otizm	16p11.2, Xq28
M	14	Otizm	16p13.11
F	7	Otizm	8p23.1, 16p13.11, 16p11.2, Yq11.21-q11.223
F	2	Otizm	1q21.1, 1p21, 7q36.3, 8p23.1, 11p15.5, 16p13.11, Xq26.3, Xq27.1
M	6	Otizm	2p21, 8p23.1, 16p13.3, 16p13.11, Xq21.1-q21.31
M	5	Otizm	1q21.1, 2p21, 7q36.3, 16p13.11
M	11	Otizm	10q11.22, 17q21.33
F	9	Otizm	7q21.3, 16p11.2
M	14	Otizm	8p23.1, 2p21
M	14	Otizm	Xq26.2, 16p13.11
M	7	Otizm	2p21, 16p13.11
M	6yaş5ay	Otizm	1q21.1, 2p21, 17q24.3
M	3	Otizm	Normal
M	5	Otizm	Normal
M	7	Otizm	Normal
M	4	Otizm	10q26.3
M	6	Otizm	2q21.1, 1q32.2, 16p13.11
M	8	Otizm	1p36.33, 2q21.1, 7q11.23
M	6yaş 8 ay	otizm, dismorfik bulgular	2q21.1, 16p11.2
M	11	otizm, dismorfik bulgular	6q26, 8p23.1, 16p13.11, 16p11.2
M	5yaş 6ay	Otizm, dismorfik bulgular	16p13.11, 16p11.2
M	6	Otizm, dismorfik bulgular	1q21.1, 2p11.2-p11.1, 7q11.1-q11.21, 16p11.2, 7q11.23
M	13	Otizm, dismorfik bulgular	2p21, 3q22.3, 11p15.5
M	9	Otizm, dismorfik bulgular	2p11.2, 8p23.1, 16p13.3, 3q24
M	7	Otizm, dismorfik bulgular	1q21.1, 2q13, 5q13.2, 7q36.3, 11p15.5, 17q24.3, Yq12
M	11	Otizm, dismorfik bulgular, epilepsi	Normal
M	7,5	Otizm, mental retardasyon,	1q21.1, 2q21.1, 2q31.1, 16q21, 18p11.32, 16p13.11

Çizelge 4.2 Otizmlili hastaların dağılımı

Hastalarımızın 8'inde dismorfik özellikler mevcut idi. Bu özelliklerden hiperekstansibilite 4 hastada, retrognati 3 hastada, kısa ve kalın el parmakları 3 hastada, aşağı çekik palpebral fissürler 3 hastada, hipertelorizm 2 hastada, öne açılı kulak yapısı 2 hastada, tubuler burun 2 hastada, displastik kulak yapısı 2 hastada, uzun filtrum 2 hastada, midfasiyal hipoplazi 1 hastada, araknodaktili 1 hastada, epikantus 1 hastada, geniş başparmak 1 hastada, kalın alt dudak 1 hastada, düşük kulak 1 hastada, kısa filtrum 1 hastada, parmak yastıkçıkları 1 hastada, dar damak yapısı 1 hastada, mikrognati 1 hastada, burun kökü basıklığı 1 hastada gözlemlendi.

Dismorfik özellik	Hasta Sayısı
Hiperekstansibilite	4
Retrognati	3
Kısa ve kalın el parmakları	3
Aşağı çekik palpebral fissürler	3
Hipertelorizm	2
Öne açılanmış kulak yapısı	2
Tubuler burun	2
Displastik kulak yapısı	2
Uzun filtrum	2

Çizelge 4.3: Dismorfik özellikler

Dismorfik özelliğe sahip hastalarda en sık gözlenen delesyon bölgesi 16p11.2 olarak saptandı. Bu bölgede dismorfik özelliği olmayan 8 otizm hastasında da delesyon saptandı. Tüm hastalarda en sık rastlanan delesyon bölgesi olan 16p11.2 bölgesine dismorfik özelliklere sahip 2 hastada rastlanırken dismorfik özelliği olmayan 11 hastada rastlandı.

Delesyon Bölgesi	Dismorfik Özellik (+)	Dismorfik Özellik (-)
2q21.1	1	7
16p11.2	4	8
6q26	1	-
8p23.1	2	5
16p13.11	2	11
1q21.1	2	8
12q24.31	-	1
Xq28	-	1
Yq11.21-q11.223	-	2
2p11.2	2	-
7q11.1-q11.21	1	-
7q11.23	1	1
16p13.3	1	1
10q11.22	-	4
3q22.3,	1	-
7q21.3	-	1
5q13.2	1	1
Yq12	1	-
10q26.3	-	1
18p11.32	-	1
1p21	-	1
7q36.3	1	2
11p15.5	2	1
Xq26.3	-	1
Xq27.1	-	1
2p21	1	5
Xq21.1-q21.31	-	1
17q21.33	-	1
11p15.5	2	1
2q13	1	-
17q24.3	1	1
16q21	-	1
1q32.2,	-	1

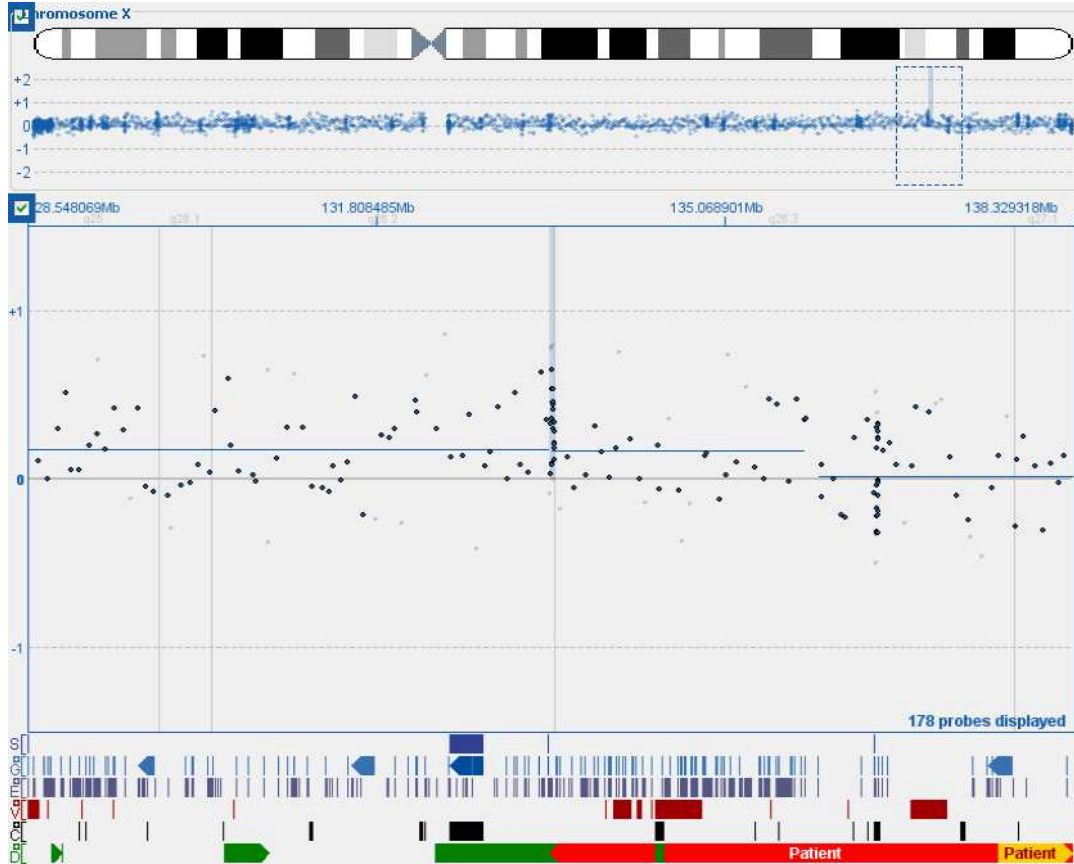
Çizelge 4.4: Dismorfik özelliklerin delesyon bölgelerine göre dağılımı

4.3 CGH Array Analiz Sonuçları:

Hastalarımızın 13'ünde 16p13.11 delesyonu saptandı. Bu bölge otizme yatkınlık gen bölgesini içermektedir.

Bu bölgeye lokalize olmuş gen sekansları şunlardır:

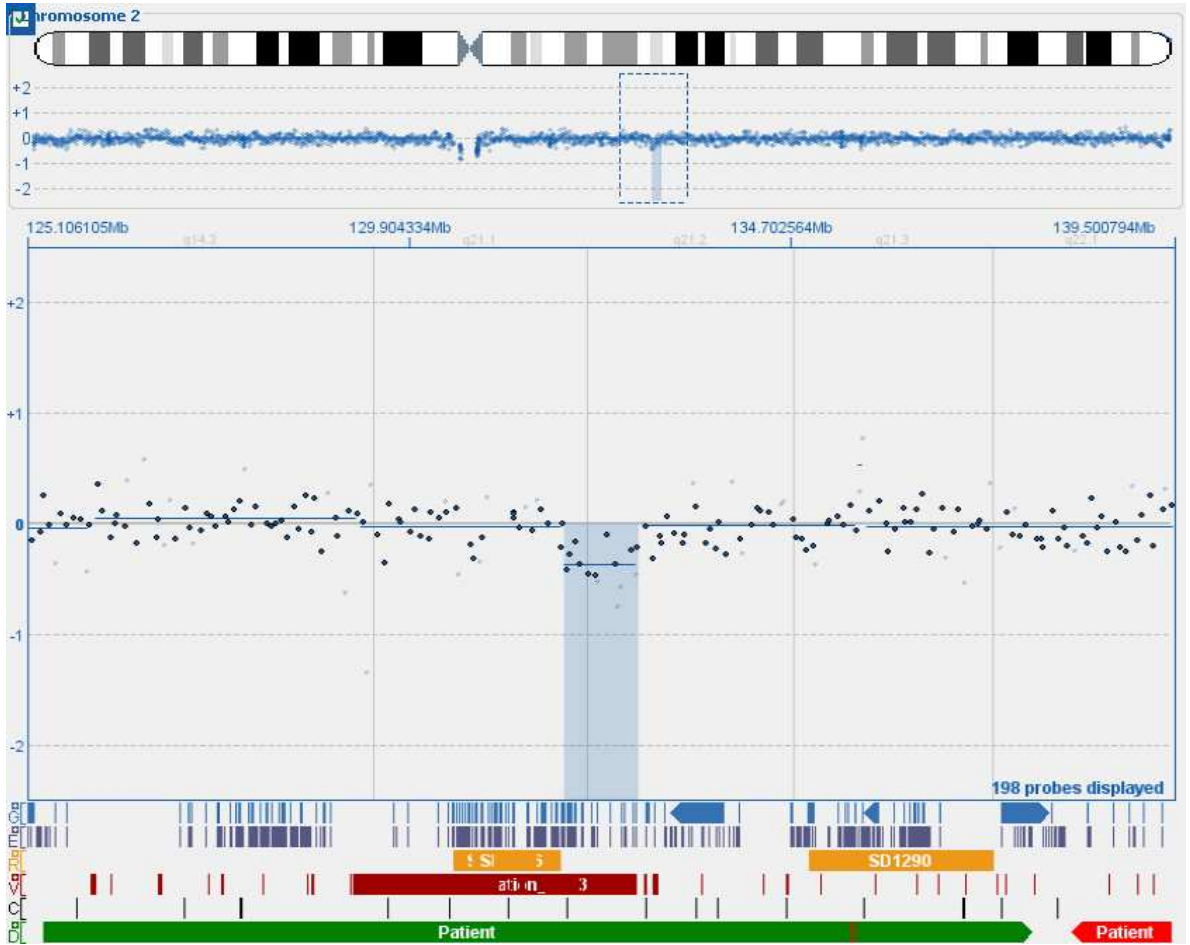
- PDXDC1
- ENSG00000183786
- NTAN1
- RRN3
- ENSG00000209081
- Q6ZNL0_HUMAN
- ENSG00000207294
- ENSG00000205768



Şekil 4.1 16p13.11 Delesyonu

Ayrıca hastalarımızın 8'inde 2q21.1-21.2 delesyonu saptandı. Görülen bu delesyonun fenotipe olan etkisi tartışmalı olup önemli genlerinin araştırılması söz konusudur. Bu bölgedeki yazılım tarafından seçilen önemli genler şunlardır:

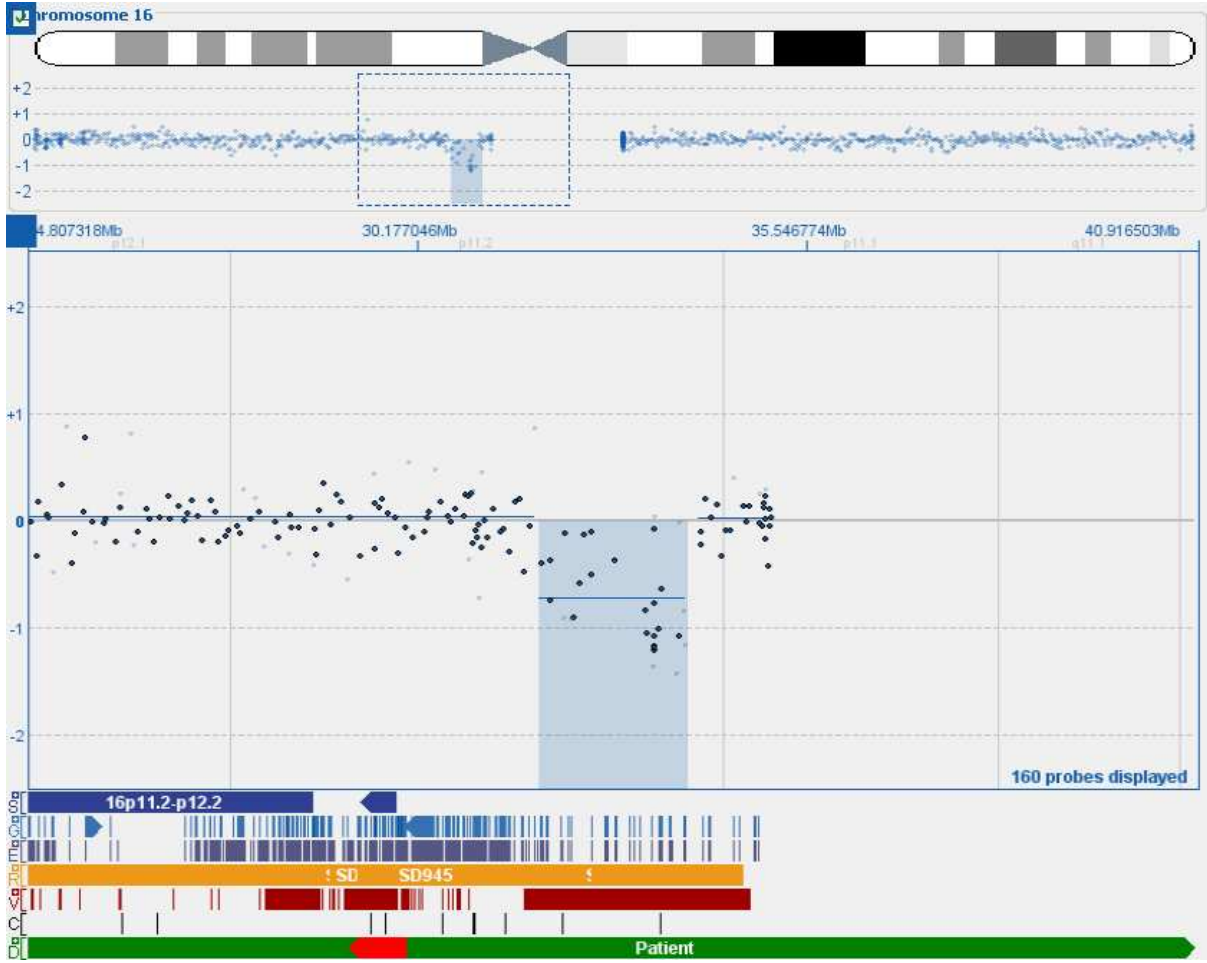
- GPR89C,
- ENSG00000206585,
- NP_001095133.1,
- FAM108A2, Q6ZRH3_HUMAN,
- PPIAL4,
- NBPF16, NP_110423.3,
- NBPF20, NR_003242.1
- Q8N9C2_HUMAN,
- Q8NGU3_HUMAN,
- DRD5P2,
- Q16003_HUMAN,
- Q8WYY4_HUMAN



Şekil 4.2 2q21.1-21.2 delesyonu

Hastalarımızın 12'sinde 16p11.2 delesyonu saptandı. Bu bölgedeki genlerin otizm ve fenotipe etkisi tartışmalı olup araştırılması söz konusudur. Bölgeye lokalize olmuş önemli genler şunlardır;

- ENSG00000213546
- ENSG00000213545
- NP_001093157.1
- ENSG00000205459
- ENSG00000197605
- NP_001093157.1
- ENSG00000214618
- SLC6A10P
- Q6ZQQ9_HUMAN
- ENSG00000213544
- ENSG00000214613
- NP_001093157.1
- NP_001093157.1
- Q6ZRM4_HUMAN
- ENSG00000214611
- ENSG00000153613
- Q6ZQQ9_HUMAN
- ENSG00000198555
- Q6PQ33_HUMAN



Şekil 4.3: 16p11.2 delesyonu

5. TARTIŞMA

Otizm spektrum bozuklukları (ASDs); yaygın kalıtsal, klinik olarak heterojen seyirli nörogelişimsel olarak sosyal etkileşimde bozulma, dilde gecikme ve tekrarlayan davranış ve hareketlerle karakterizedir. Otizm, genetik ve çevresel etkilerin bir araya gelmesi ile ortaya çıkar. İkiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve aile içinde otizm yinelenme riskinin arttığına yönelik bulgular, hastalığın etyolojisinde genetik faktörlerin rol alabileceği yönündeki görüşleri desteklemektedir. Bu çalışmayı planlarken ana hedefimiz otizme neden olan genetik alt yapıyı ortaya koymaktır. Hastalığın multifaktöryel ya da poligenik karakteri nedeni ile çevresel etkenlerin olabildiğince homojen olarak dağıldığı bir hasta grubu oluşturulmaya çalışıldı. Benzer bölgede en az bir kuşaktır yaşayan ailelerin çocukları çalışmaya dahil edildi. Böylece çalışma, aynı çevre şartlarına maruz kalmış Kocaeli bölgesinde yaşayan ailelerin çocukları üzerinden gerçekleştirildi. Bu ailelerin genel özelliği çeşitli nedenlerle bu bölgeye göç etmiş ya da yerel aileler olmalıdır. Bu sayede, fenotipik farklılıklara neden olan genetik faktörlerin belirlenmesinin daha kolay olabileceği düşünülmüştür. Hasta grubu oluştururken kullandığımız ikinci limitasyon ise non sendromik özellikteki vakalar ile bu çalışmanın yapılmış olmasıdır. Majör bir sendroma sahip olmayan bulguların seçilmesi ile, ilk limitasyonda olduğu gibi, primer olarak hasta fenotiplerinin oluşmasında sendromlara bağlı nedenlerin elenerek genetik alt yapının katkısının araştırılması sağlanmıştır.

Hastaların klinik özelliklerine baktığımızda bir vakada epilepsinin ve diğer tek bir vakada da MR'un otizm kliniğine eşlik ettiği görülmektedir. Bu vakalarda ana sendrom otizm yönünde değerlendirilmiştir. Ayrıca ayrıntılı muayene ve radyolojik değerlendirmelerin sonucunda hasta grubunda hiperekstansibilite, retrognati, hipertelorizm, kısa ve kalın el parmakları, aşağı çekik palpebral fissürler, öne açılanmış kulak yapısı, tubuler burun, displastik kulak yapısı, uzun filtrum, midfasiyal hipoplazi, araknodaktili nin aralarında bulunduğu yirmi farklı dismorfik özellik belirlenmiştir Bu dismorfik özellikler literatürdeki diğer gruplarca yapılan çalışmalarda hasta gruplarının özellikleri ile örtüşmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular arasında ilk olarak yaygın varyantif genotipik dağılım göze çarpmaktadır. Taranan 34 vakada toplam 32 adet varyasyon tanımlanmıştır. Kullandığımız 4x44 K formatı bir hibrid aCGH formatıdır. Bu formatta tam genom analiz

yapılabildiği gibi belli sendrom bölgelerine CNV bölgeleri ayrıntılı olarak da analize edilebilmektedir. Yaptığımız analizler sonucunda hasta grubunda oldukça değişken sayıda ve yapıda CNV bölge varyasyonlarının varlığını tanımladık. Bu bölgelerin bir çoğunun bilinen hastalıklarla ilişkileri henüz gösterilmemiştir. Bizim hasta grubumuzda hastalıkla ilişkilerini kurmak mümkün olmamaktadır. Bu sayıda farklı CNV tanımlanmasının altında hasta grubunun farklı etnik köklerden oluşmuş olmasının yattığı düşünülebilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada yüksek çözünürlüklü array-CGH ile, otistik 4 hastada 16p13.1 kromozomunda 1.5-Mb duplikasyonu saptanmıştır (Bejjani et al 2006; Ullmann et al 2007). Aynı duplikasyon birçok akrabada da saptanmıştır. Bizde yaptığımız çalışmada 13 hastada 16p13.11 bölgesinde delesyona rastladık. Bu 1.5-Mb intervalindeki duplikasyon ve delesyonlar, Genomik Varyant Databazında tanımlanmamış ve yüksek çözünürlüklü array-CGH ile araştırılan 600 den fazla hastada da gösterilmemiştir. Dolayısıyla bu sapmalar otizm ve/veya MR predispozisyonuna neden olan rekürrent genomik dengesizliği gösterir (Ullmann et al 2007). Çalışma grubumuz içerisinde yer alan hastalardaki dismorfik bulguların bulunan varyasyonlar ve genom değişimleri ile ilişkide karşılaştırılmıştır. Analizlerin yapıldığı 34 hastada bulunan 32 genomik değişimin 20 farklı dismorfik fenotiple olan birlikteliği analiz edildiğinde, genotiplerin dismorfizm göstermeyen bireylerde dismorfik olanlara göre dah sık olduğu belirlenmiştir. Bu da bize bulunan genetik farklılıkların daha çok otizm tablosu ile ilintili olabileceği dismorfik özelliklere göre daha düşük bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda yeni delesyon ve duplikasyonların otizmin etolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Jacquemont ve arkadaşları (2006) sendromik otizmlili 27 hastanın 8'inde, 1 Mb aralıklarla yerleştirilmiş büyük klonları içeren aCGH yöntemini uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre aCGH özellikle, dismorfik özellikleri olan otizm hastalarının tanısında etkilidir. Ancak sendromik otizm vakaları dışlandığında bile, otizmlili hastaların %10 unda, 35kb çözünürlüklü tüm genom oligonükleotid array ile de novo CNV lar saptanmıştır (Sebat et al 2007). Çalışmamızın sonucunda daha önce tanımlanmamış bazı delesyon bölgelerinin varlığı de novo CNV olma ihtimalini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, ASD'li 427 hastada yapılan genom analizinde idiyopatik otizmlili hastaların ~%7 sinde de novo CNV'lar saptanmıştır. Bu çalışmanın moleküler bilgileri ve önceki karyotipik veriler 'The Autism Chromosome rearrangement Database' ını oluşturmuştur([http:// www.projects.tcag.ca/autism/](http://www.projects.tcag.ca/autism/)) (Marshall et al 2008). Yine aynı çalışmada 16p11.2 duplikasyonu iki ASD ailesinde saptanmıştır. Bu bölgedeki delesyon ve

duplikasyonların karşılıklı olabileceği söylenmiştir. Bizde yaptığımız çalışmada 12 hastamızda 16.11.2 bölgesine lokalize delesyon saptadık ve bu çalışmayla uyumlu olduğunu gördük. Ancak hastalarımızda aynı çalışmada tanımlanan ikinci bölge olan 15q24 bölgesinde özelliğe rastlamadık. Araştırılan bölgenin CNV bölgesi olması nedeniyle etnik özelliklerden etkilenmektedir. Farklı genetik orijinli toplumlarda polimorfik bölgelerde yapılan çalışmalarda da farklı sonuçlar alınmaktadır. Bunun, o toplumdaki kurucu genotiplerin bir birlerinde farklı olması ile açıklanmaktadır.

Monica ve ark.(2007), interstisyel 1q delesyonu (1q23.3-24.2) ve 1q ile 5q kromozomlarında yeniden translokasyon olan bir otizm vakası bildirmişlerdir. Bu çalışmada array-CGH tekniğinin kırılma noktalarında daha iyi çözünürlük sağladığını ileri sürmüşler ve delesyon büyüklüğünü 4.97 Mb olarak hesaplamışlardır. Bizim çalışmamızda bu bölge rastladığımız delesyon bölgeleri arasında yer almamaktadır.

Ayrıca çalışmamızda 6 hastada rastladığımız 2p21 delesyonu SIX 3 genini içermektedir ve analiz programı tarafından holoprozensefali 2 bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Benzer olarak 3 hastamızda rastladığımız 7q36.3 delesyonu SHH genini içermektedir ve yine analiz programı tarafından holoprozensefali 3 bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Bu delesyonların gerçek bir veriyi mi işaret ettiği yoksa teknolojik üretim sırasında bir prob sentezi hatasından mı kaynaklandığının anlaşılabilmesi için verilerin ek bir yöntemle verifikasyon analizlerinin yapılması gerekir.

Array CGH dengesiz mikroskopik ve submikroskopik bozuklukların çoğunu tanımlama potansiyeli ile önümüzdeki yıllarda, ilk başvuru olan sitogenetiğin, yani kromozom bantlamanın ve FISH analizinin yerini almaya adaydır.

Tüm bu veriler ışığında, 16p13.11 bölgesi ve ilgili genlerinin bizim hasta grubumuzda da otizme yatkınlığı temsil ettiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda ayrıca izlenen 16p11.2, 1q21.1, 2q21.1 ve 6p23.1 bölgelerine ait genlerin de olası başka yatkınlık bölgeleri olarak işaret edilmektedir. Bu bölgelere dönük ileri ve ayrıntılı çalışmalar tezin devamında anabilim dalımızca ileri dönemde gerçekleştirilecek projeler içinde detaylı olarak araştırılacaktır. Bu çalışma ile 16p13.11 bölgesinin otizm için önemi bir kez daha vurgulanmış olmaktadır. Bunun yanında genomda otizm için daha önce belirlenmemiş yeni aday lokusların varlığı belirlenmiştir. İleri dönemlerde yapılacak çalışmalarda, bu yeni lokusların, otizm için önemini daha fazla vurgulanacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Verilerimiz 16p13.11 bölgesine kümelenen önceki çalışmalardaki verilerle uyum içindedir.

Ayrıca 12 adet hastamızda delesyon saptanan 16p11.2, 10 hastamızda delesyon saptanan 1q21.1, 8 hastamızda delesyon saptanan 2q21.1, 7 hastamızda delesyon saptanan 8p23.1, 6 hastamızda delesyon saptanan 2p21 ve 4 hastamızda delesyon saptanan 10q11.22 bölgeleri yeni bölgeler olup araştırılması gerekmektedir.

Verilerin verifikasyonu ve aynı bölgelere ait, gen anlatım ve proteomiks çalışmaları hastalığın patogenezi mekanizması ve tedavi stratejileri açısından önemli ipuçları sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ:

Albertson, D.G., Snijders A.M., Pinkel, D. (2003) Current Status and Future Prospects of array Based Comperative Genomic Hybridisation. *Brief Func. Genomic Proteomic* 2(1:3745)

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994: 65-78.

Baron-Cohen, S., Allen, J., Gillberg, C. (1992) Can autism be detected at 18 months? The needle, the haystack, and the CHAT. *Br J Psychiatry*, 161: 839-843.

Baron-Cohen, S., Wheelwright, S., Cox, A. et al. (2000) Early identification of autism by the Checklist for Autism in Toddlers (CHAT). *J R Soc Med.*, 93: 521-525.

Bayou, N., M'rad,R., Ahlem,B., Bechir Helayem,M., Chaabouni,H.(2008) Autism: an overview of genetic aetiology. *Tunis Med.*, 86(6):573-8.

Bejjani, B.A. and Shaffer, L.G. (2006) Application of array-based comperative genomic hybridisation to clinical diagnostic. *J. Mol. Diagn.* 8:528-533

Bennetto, L., Rogers, S.J. (2001) Autism spectrum disorders. In: Jacobson: *Psychiatric Secrets*, 2nd ed. Hanley and Belfus 295-302.

Boyle, C.A., Decoufle, .P, Yeargin-Allsoo,p M.Y. (1994) Prevalence and health impact of developmental disabilities. *Pediatrics*, 93: 863-865.

Bruder, C.E., Hirvela, C., Tapia-Paez, I. Et al (2001) High resolution deletion analysis of constituional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum. Mol. Genet.* 10(3):271-282

Butter, E.M., Wynn, J., Mulick, J.A. (2003) Early intervention critical to autism treatment. *Pediatric Annals*; 32: 677-684.

Committee on Children With Disabilities. Developmental surveillance and screening of infants and young children. 2001, *Pediatrics*,; 108: 192-196.

Courhesne E, Yeung-Courchesne BA, Press GA, et al. (1988) Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Eng J Med*, 318: 1349-1354.

Çine N. 1. Array CGH Kursu Kocaeli Üniversitesi 2010

Darıca, N., Abdioğlu,U., ve Gümüüşcü,S. *Otizm ve Otistik Çocuklar*, Ozgur Yayınları, İstanbul, 1992.

Dworkin, P.H (1992) Developmental screening: still expecting the impossible? *Pediatrics*, 89: 1253-1255.

Filipek, P.A., Accardo, P.J., Ashwal, S. et al.(2000). Practice parameter: Screening and diagnosis of autism. *Neurology*, 55: 468-479

Filipek, P.A., Accardo, P.J., Baranek, G.T., et al. (1999) The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 29: 439-484.

Frankenburg, W.K., Dodds, J., Archer, P., Shapiro, H., Bresnick, B. (1992) The Denver II: a major revision and restandartization of the Denver Developmental Screening Test. *Pediatrics*, 89: 91-97.

- Glascoe, F.P. (2000) Early detection of developmental and behavioral problems. *Pediatrics in Review*, 21: 272-279.
- Glascoe, F.P., Dworkin, P.H. (1995) The role of parents in the detection of developmental and behavioral problems. *Pediatrics*; 95: 829-836.
- Guralnick, M.J. The effectiveness of early intervention. Baltimore, MD: Paul H. Brookes Publishing Co; 1997.
- <http://tibbigenetik.aku.edu.tr/cgh.PPT>
- Johnson, C.P. (2008) Recognition of autism before age 2 years. *Pediatrics in review*, 29: 86-96.
- Jacquemont, M.L., Sanlaville, D., Redon, R., Raoul, O., Cormier-Daire, V., Lyonnet, S., Amiel, J., Le Merrer, M., Heron, D., de Blois, M.C., Prieur, M., Vekemans, M., Carter, N.P., Munnich, A., Colleaux, L., Philippe, A. (2006) Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal re-arrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J. Med. Genet.* 43:843-849.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992) Comparative Genomic Hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumor. *Science*. 258(5083):818-821
- Kiah Bertoglio, B.S. and Robert L.Hendren D.O.(2009) New developments in autism. *Psychiatric Clinics of North America* 32(1):1-14.
- Lovaas, O.I. (1997) Behavioral treatment and normal educational and intellectual functioning in young autistic children. *J Consult Clin Psychol*, 55: 3-9.
- Lupsk, J.R. (1998) Genomic disorders: Structural features of the genom can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 14:417-422
- Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., Fernandez, B., Szatmari, P., Scherer, S.W. (2008) Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am.J. Hum. Genet.* 82:477-488.
- McEachin, J.J., Smith, T., Lovaa,s O.I. (1993) Long-term outcome for children with autism who received early intensive behavioral treatment. *Am J Ment Retard*, 97: 359-372.
- Miles, J.H., Takahashi, T.N., Bagby, S., Sahota, .PK., Vaslow, D.F., Wang, C.H., Hillman, R.E., Farmer, J.E. (2005) Essential versus complex autism: Definition of fundemental prognostic subtypes. *Am. J. Med. Genet. A* 135: 171-180
- Monica,M.D.,Lonardo,F.,Faravelli,F.,Pierluigi,M.,Luquetti,D.V.,DeGregori,M.,Zuffardi,O.,Scarano,G.(2007) A case of autism with an interstitial 1q deletion (1q23.3-24.2) and a de novo translocation of chromosomes 1q and 5q. *Am J Med Genet, Part A* 143A:2733-2737.
- Muhle, R., Trentacoste, S.V., Rapin, I. (2004) The genetics of autism. *Pediatrics* 113(5): e 472-486
- Oostlander, A.E., Meijer, G.A., Ylstra, B. (2004) Microarray-based comperative genomic hybridisation and its applications in human genetics. *Clin. Genet.* 66:488-495
- Prater, C.D. (2002) Autism: A medical primer. *American Family Physician (Am Fam Physician)*, 66: 1667-1680.
- Pollack ,J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D., Brown, P.O. (1999) Genom-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 23(1): 41-46.
- Santangelo,S.L.(2005) What is known about autism: genes,brain, and behavior. *Am J Pharmacogenomics*, 5(2):71-92.

- Savlı, H., Szendroi, A., Romics, I., Nagy, B.-(2008). Gene network and canonical pathway analysis in prostate cancer, a microarray study. *Experimental and Molecular Medicine* Vol 40, no 2.
- Savlı, H., Aalto, Y., Nagy, B., Knuutila, S., Pakkala, S. (2002) Gene expression analysis of 1,25(OH)2D3 dependent differentiation of HL-60 cells - a cDNA array study. *British Journal of Haematology*, 118: 1065-1072.
- Savlı, H., Nagy, B., Rigo, J. (2008) DDR2 FUT4 genes and N-Glycan pathway were found up-regulated in ovarian cancer: A Microarray study. II. Multidisciplinary Cancer Research Symposium. University of Uludağ , Türkiye,
- Savlı, H., Galimberti, S., Canestraro, M., Palumbo, AG., Nagy, B., Di Raimondo, F., Petrini, M. (2008) Bortezomib activity on a Myelodysplastic Cell Line (P39) : A Microarray study. II. Multidisciplinary Cancer Research Symposium. University of Uludağ , Türkiye,
- Savlı, H., Galimberti, S., Canestraro, M., Palumbo, AG., Nagy, B., Di Raimondo, F., Petrini, M. (2008) Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 exert significant anti-proliferative and pro-apoptotic effects on the P39 Cell Line. II. Multidisciplinary Cancer Research Symposium. University of Uludağ , Türkiye,
- Savlı, H., Galimberti, S., Canestraro, M., Palumbo, AG., Nagy, B., Di Raimondo, F., Petrini, M. , (2008) Bortezomib combined with Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 or arsenic trioxide exerts synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic effects in P39 Cell Line. II. Multidisciplinary Cancer Research Symposium. University of Uludağ , Türkiye.
- Schena, M., Shaloun D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, Oct 20; 270 (5235): 467-70.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang, R., Lee, Y., Hicks, J., Spence, S.J., Lee, A.T., Puura, K., Lehtimäki, T., Ledbetter, D., Gregersen, P.K., Bregman, J., Sutcliffe, J.S., Jobanputra, V., Chung, W., Warburton, D., King, M., Skuse, D., Geschwind, D.H., Gilliam, T.C., Ye, K., Wigler M. (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316: 445-449.
- Shinawi, M. and Cheung, S.W. (2008) The array CGH and its clinical applications. *Drug Discovery Today*, 13(17/18):760-770.
- Sigman, M., Dijamco, A., Gratier, M., Rozga, A. (2004) Early detection of core deficits in autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 10: 221-233
- Schopler, E. Implementation of TEACCH philosophy. In: Cohen DJ, Volkmar FR, eds. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders: Second Edition*. New York, 1994.
- Slavotinek, A.M. (2008) Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet.*, 124: 1-17.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., Lichter, P. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridisation: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(4):399-407.
- Thomy J. L. de Ravel, Koen Devriendt, Jean-Pierre Fryns, Joris R. Vermeesch. (2007) Whats New in Karyotyping? The Move Towards Array Genomic Hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr* 166 :637-643
- Tuchman, R. (2003) Autism. *Neurologic Clinics* 21: 915-932
- Tuchman, R., Jayakar, P., Yaylali I. et al. (1997) Seizures and EEG findings in children with autism spectrum disorders. *CNS Spectrums*, 3: 61-70.

Tuchman, R.F., Rapin, I. (1997) Regression in pervasive developmental disorders: seizures and epileptiform electroencephalogram correlates. *Pediatrics*, 99: 560-566.

Ullman, R., Turner, G., Kirchoff, M., Chen, W., Tonge, B., Rosenberg, C., Field, M., et al. (2007) Array—CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat.*, 28(7):674-82.

Vissers, L.E., de Vries, B.B., Osoegawa, K. Et al (2003) Array-based comparative genomic hybridisation for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 73(6): 1261-1270

Vortsman, J. A., Staal, W. G., van Daalen, E., van Engeland, H., Hochstenbach, P. F., & Franke, L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 1-18-28.

Weiss, L.A., Shen, Y., Korn, J.M., Arking, B.S., Miller, D.T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M., et al. (2008) Autism Consortium. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N. Engl. J. Med.* 358:667-675

Weiss, M.M., Snijders, A.M., Kuipers, E.J. et al (2003) Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high resolution microarray comparative genomic hybridisation. *J. Pathol.* 200 (3) :320-326.

World Health Organisation. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems. Geneva: World Health Organisation, 1992.

Zhao, X., Leotta, A., Kustanovich, V., Lajonchere, C., Geschwind, D. H., Law, K., et al. (2007). A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12831-12836.

A. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esen ULAK GÜMÜŞLÜ
Doğum Tarihi : 13.07.1979
Doğum Yeri : Diyarbakır
e-mail : ulakesen@yahoo.com.

Eğitimi

İlkokul : Diyarbakır, 1985-1990
Ortaokul ve Lise : İstanbul Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi , 1990-1997
Yüksek Öğrenim : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1998-2006

Mezuniyet Sonrası

Yüksek Lisans : Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji 2009-
Tez Konusu : Non-sendromik(Primer) otizm hastalarında CGH-array çalışması

Sözlü Sunum

1.**Ulak E**, Cam MB, Kıvılcım H, Yıldırım E, Saleh A.:Lise öğrencilerinde yanık tecrübesinin ve ilk yardım bilgilerinin değerlendirilmesi. Marmara University Student Congress 17-19 May 2001 Pg: 28

Poster Sunumu

1.**Ulak E**, Küçükali Ç, Saleh A, Seküçoğlu K, Toptay H. Kolostomili hastalarda yaşam standardının araştırılması. Marmara Medical Student Congress 16-17 May 2002 Poster No: 36, Pg: 73.

Katıldığı Kurslar

1. Medical traniee at Department of Surgery, Unit of Endocrine and Breast Surgery Haukeland University Hospital, Bergen-Norway 1-30 June 2004

2.Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu 6-10 Nisan 2009 KOU Rektörlüğü, Kocaeli

3. 11. Çocuk Sağlığı Bahar Toplantısı. 15 Mayıs 2009 KOÜ Tıp Fakültesi,Kocaeli.
4. IV. Dismorfoloji günleri 24-25 Nisan 2009, İstanbul
5. Cytocell FISH kursu , 28 September 2009, Cambridge, United Kingdom
6. OGT Microarray Training Course.23-30 October 2009, Oxford Gene Technology, Oxford-United Kingdom.
7. Tıbbi Genetik Derneği Klinik Genetik Kursu. 7-9 Ocak 2010,Kayseri.

Aldığı Ödüller

IV. Dismorfoloji günleri (24-25 Nisan 2009, İstanbul) Dismorfoloji yarışmasında birincilik ödülü kazanan grupta yer almıştır.

Katıldığı Projeler

1. Nonsendromik otizm hastalarında CGH-array çalışması (proje no:2009/85 sorumlu araştırmacı)
2. Atipik antipsikotik ilaç ve antidepresan ilaçların öngörülemez kronik stress uygulanan veya hipokampal hasar oluşturulan farelerde depresyon ve bilişsel işlevler üzerine etkileri ve bu etkide rol oynayan nöromediyatör ve moleküler faktörler (Proje no:2009/52 yardımcı araştırmacı).

Yürütülmekte olan projeler

1.2010/1- Prenatal tanıda aCGH uygulamaları

Seda Eren, Naci Çine, Esen Gümüşlü, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Deniz Sünnetçi, Zeynep Ünal, Buket Engüzel, Hakan Savlı

2. 2010/2- Anöploidi saptamasında moleküler karyotiplendirmenin sınırları: Kocaeli Üniversitesi Deneyimi

Naci Çine, Esen Gümüşlü, Seda Eren, Buket Engüzel, Deniz Sünnetçi, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Hakan Savlı

3. 2010/3- Mikrodelesyon Sendromlarında moleküler karyotiplendirmenin değeri: Kocaeli Üniversitesi 2009-2010 deneyimi

Esen Gümüşlü, Naci Çine, Seda Eren, Buket Engüzel, Deniz Sünnetçi, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Hakan Savlı

4. 2010/4- Tekrarlayan düşük ve implantasyon başarısızlıklarında aCGH yönteminin tanısal değeri

Buket Engüzel, Deniz Sünnetçi, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Seda Eren, Naci Çine, Esen Gümüslü, Hakan Savlı

5. 2010/5- Brakio-oto-renal sendromlu bir ailede tam genom analizi

Naci Çine, Esen Gümüslü, Ayla Günlemez, Buket Engüzel, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Seda Eren, Deniz Sünnetçi, Zeynep Ünal, Hakan Savlı

6. 2010/8- Hematolojide CHIP-FISH teknolojisi ile çoklu translokasyonlar analizleri

Hakan Savlı, Naci Çine, Abdullah Hacıhanefioğlu

7. 2010/11- Nonsendromik Otizimde aCGH ve dizi analizleri

Esen Gümüslü, Ufuk Ramiz Akkoyunlu, Buket Engüzel, Seda Eren, Deniz Sünnetçi, Zeynep Ünal, Naci Çine, Hakan Savlı

8. 2010/12- Kocaeli bölgesinde beta talasemi genlerindeki mutasyon sıklıkları

Nilüfer Üzülmöz, Vicdan Şenkal, Hüseyin Aksoy, Naci Çine, Hakan Savlı