

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**“SENDROMİK OLMAYAN” OTİZM
SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANILI İKİSİ DE
ETKİLENMİŞ İKİZ ÇOCUK VE ERGENLERİN
VE ANNE-BABALARININ GENOMLARININ VE
TRANSKRİPTOMLARININ TÜM GENOM
DİZİLEME VE RNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE
ANALİZİ”**

Dr. Pelin ÜNAL VARIŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2018

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**“SENDROMİK OLMAYAN” OTİZM
SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANILI İKİSİ DE
ETKİLENMİŞ İKİZ ÇOCUK VE ERGENLERİN
VE ANNE-BABALARININ GENOMLARININ VE
TRANSKRİPTOMLARININ TÜM GENOM
DİZİLEME VE RNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE
ANALİZİ”**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pelin ÜNAL VARIŞ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Süha MİRAL

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAG.002 proje no ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Tanım ve Tarihçe	8
2.2. Epidemiyoloji	12
2.3. Tanısal değerlendirme	13
2.4. Klinik Görünüm	14
2.4.1. Erken işaretler	14
2.4.2. Toplumsal iletişim ve etkileşimde nitel bozulmalar	15
2.4.3. Sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ya da etkinlikler	15
2.5. Otizmle ilgili nörobilişsel kuramlar	16
2.6. Ayırıcı tanı	16
2.7. Eş tanılı durumlar	16
2.8. Tedavi	17
2.9. Gidiş ve Sonlanım	18
2.10. Etiyoloji	18
2.10.1. Genetik etkenler	19
2.10.2. Perinatal ve çevresel etkenler	32
2.10.3. Gen-Çevre etkileşimleri	33
2.10.4. Epigenetik etkenler	34
2.10.5. Nörobiyolojik etkenler	36
2.11. Otizm genetiğinde tanı yöntemlerinin evrimi	38
2.12. İnsan genom projesi (HGP) ve ilişkili genom projeleri	40
2.13. Önemli veritabanları	43
2.14. Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri	44
2.15. Otizmle ilgili Transkriptomik çalışmalar	47
2.16. Genis Otizm Fenotipi	47
3. AMAÇ ve HİPOTEZLER	49
3.1. Araştırmanın amacı	49

3.2.	Araştırmanın Hipotezleri	49
4.	GEREÇ VE YÖNTEM	50
4.1.	Araştırmanın Tipi	50
4.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	50
4.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	50
4.3.1.	Olgu grubunun çalışmaya dahil edilme ölçütleri	50
4.3.2.	Olgu grubunun çalışmaya dahil edilmeme ölçütleri	50
4.4.	Veri toplama araçları	51
4.4.1.	Değerlendirmede kullanılan formlar ve ölçekler	51
4.4.2.	Moleküler Yöntemler	54
4.5.	Verilerin Değerlendirilmesi	63
4.5.1.	Tüm Genom Dizileme (WGS) verilerinin değerlendirilmesi.....	63
4.5.2.	RNA dizileme (RNA-seq) verilerinin değerlendirilmesi	74
4.6.	Etik Kurul Onayı	74
5.	BULGULAR	75
5.1.	Gönüllülerin özellikleri.....	75
5.2.	Tüm Genom Dizileme (WGS) ile edilen edilen SNP ve <i>indel</i> sonuçları	77
5.3.	RNA dizileme (RNA-seq) sonuçları.....	89
6.	TARTIŞMA	93
6.1.	Genomik veriler	93
6.2.	Transkriptomik veriler	99
7.	SONUÇ VE ÖNERİLER	101
8.	ARAŞTIRMANIN KISITLILIKLARI	103
9.	KAYNAKLAR	105
10.	EKLER	124

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1** : DSM-5 OSB tanı ölçütleri
- Tablo 2** : OSB ile ilişkili bazı sendromlar ve genetik bozukluklar
- Tablo 3** : OSB ile ilişkili bazı önemli CNV’ler
- Tablo 4** : Araştırmada Kullanılan Mevcut Makine – Teçhizat Listesi
- Tablo 5** : Araştırmada Kullanılan Malzeme Listesi
- Tablo 6** : WGS analizi veri kalitesi özeti
- Tablo 7** : RNA-seq’de kullanılan adaptör dizileri
- Tablo 8** : Dizi ontoloji terimleri ve anlamları
- Tablo 9** : Kalıtım senaryoları ve GEMINI gösterimi
- Tablo 10** : SFARI Gen kategorileri ve kategorilerin skorlanma özellikleri
- Tablo 11** : Aile 1’de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri
- Tablo 12** : Aile 2’de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri
- Tablo 13** : Aile 3’de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri
- Tablo 14** : Her bir bireyin filtrelenmiş varyantlarının listesi
- Tablo 15** : Her bir bireyin SFARI kategorisine göre filtrelenmiş varyantlarının toplam sayısı
- Tablo 16** : Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 1’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi
- Tablo 17** : Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 2’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi
- Tablo 18** : Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 3’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1 : OSB ile ilişkili bazı genetik sendromlar ve bozuklukların penetrans oranları

Şekil 2 : OSB genetiğinin 1975-2015 tarihleri arasındaki tarihsel süreci.

Şekil 3 : *Agilent Bioanalyzer* tüm RNA görüntüsü.

Şekil 4 : *Bioanalyzer* RNA bütünlük numarası (RIN) tablosu.

Şekil 5 : RNA kalitesini gösteren *electropherogram*.

Şekil 6 : WGS ve WES verilerinin işlenmesinde GATK tarafından tavsiye edilen biyoinformatik araçların ardışık düzeni

Şekil 7 : Transkriptomik veriler ile yapılan ilk dendogram (hiyerarşik kümelendirme)

Şekil 8 : Transkriptomik veriler ile yapılan ilk dendogramda uzaklık gösteren örnek çıkarıldıktan sonra yapılan dendogram (hiyerarşik kümelendirme)

Şekil 9 : Esas bileşen analizi 1 (PCA 1)

Şekil 10 : Esas bileşen analizi 2 (PCA 2)

Şekil 11 : ÇODÖ ve ODKL toplam skorlarına göre oluşturulmuş transkriptomik ısı haritası

Şekil 12 : ÇODÖ ve ODKL alt skorlarına göre oluşturulmuş transkriptomik ısı haritası

KISALTMALAR

AACAP	: <i>American Academy of Child and Adolescent Psychiatry</i>
AAP	: <i>American Academy of Pediatrics</i>
AB	: Asperger Bozukluğu
ABA	: Uygulamalı Davranış Analizi (<i>Applied Behaviour Analysis</i>)
aCGH	: Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (<i>Array comparative genomic hybridization</i>)
ACMG	: Amerika Tıbbi Genetik ve Genomik Cemiyeti (<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>)
ADDM Network	: Otizm ve Gelişimsel Bozukluklar İzlem Ağı (<i>Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network</i>)
ADI-R	: Otizm tanı görüşmesi- gözden geçirilmiş form (<i>The autism diagnostic interview-revised</i>)
ADOS	: Otizm tanı gözlem çizelgesi (<i>The autism diagnostic observation Schedule</i>)
AGP	: Otizm Genom Projesi (<i>Autism Genome Project</i>)
ATAC-seq	: <i>Accessible Chromatin Assay with high-throughput sequencing</i>
AutDB	: Otizm Veritabanı (<i>Autism Database</i>)
AGRE	: Otizm Genetik Kaynak Değişimi (<i>Autism Genetic Resource Exchange</i>)
BAM	: <i>Binary Aligned Map</i>
BB	: Bipolar Bozukluk
BQSR	: Temel kalite kontrolü yeniden kalibrasyonu (<i>Base quality score recalibration</i>)
BWA	: <i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
ChIP-seq	: <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CMA	: Kromozomal mikrodizi (<i>Chromosomal microarray</i>)
CNV	: Kopya sayısı varyantları (<i>Copy Number Variation</i>)
ÇDGŞG-ŞY	: Okul Çağı Çocukları İçin Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi- Şimdi ve Yaşam Boyu Versiyonu

ÇODÖ	: Çocukluk çağı otizmi değerlendirme ölçeği (<i>Childhood autism rating scale (CARS)</i>)
DAVID	: <i>The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
dbSNP	: <i>Short Genetic Variations</i>
dbVar	: <i>Database of Genomic Structural Variations</i>
DEHB	: Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
DNase-seq	: <i>DNase I hypersensitive sites sequencing</i>
DSM-III	: Ruhsal Bozukluklara İlişkin Tanı ve İstatistik El Kitabı-Üçüncü Baskı (<i>Diagnostic and Statisal Manual of Mental Disorders Third Edition</i>)
DSM-IV	: Ruhsal Bozukluklara İlişkin Tanı ve İstatistik El Kitabı-Dördüncü Baskı (<i>Diagnostic and Statisal Manual of Mental Disorders-Forth Edition</i>)
DSM-IV-TR	: Ruhsal Bozukluklara İlişkin Tanı ve İstatistik El Kitabı-Dördüncü Baskı-Gözden Geçirilmiş (<i>Diagnostic and Statisal Manual of Mental Disorders Forth Edition-Text Revised</i>)
DSM-5	: Ruhsal Bozukluklara İlişkin Tanı ve İstatistik El Kitabı-Beşinci Baskı (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition</i>)
DZ	: Dizigot (çift yumurta) ikiz
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik asit (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEG	: Elektroensefalografi
ENCODE	: DNA Elementleri Ansiklopedisi (<i>ENCyclopedia of DNA Elements</i>)
GABA	: Gamma-aminobütirik Asit (<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>)
GATK	: <i>Genome Analysis Tool Kit</i>
GERP	: Genomik evrim oranı profillemesi (<i>Genomic evolutionary rate profiling</i>)
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GRCh38	: <i>Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12</i>
FISH	: <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FXS	: Frajil X sendromu
gnomAD	: <i>Genom Aggregation Database</i>
GOF	: Geniş Otizm Fenotipi

GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (<i>Genome-wide association studies</i>)
HapMap	: Haplotip haritalaması (<i>Haplotype mapping</i>)
HGP	: İnsan Genom Projesi (<i>Human Genome Project</i>)
IBG	: İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi
ICD-8	: Hastalıkların ve Sağlıkla İlgili Sorunların Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması, Sekizinci versiyonu (<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 8th Revision</i>)
ICD-10	: Hastalıkların ve Sağlıkla İlgili Sorunların Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması 10. versiyonu (<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision</i>)
ISCA	: <i>International Standard Cytogenomic Array Consortium</i>
IVF	: <i>in vitro</i> fertilizasyon
kb	: kilobaz
KKK	: Kızamık-Kızamıkçık-Kabakulak
LD	: Bağlantı dengesizliği (<i>linkage disequilibrium</i>)
MDB	: Molibdovanadat Reaktif Çözeltisi
MH	: Mitokondriyal hastalıklar
MN	: Macherey-Nagel
MNV	: Multi-nükleotid değişiklikleri (<i>Multi-nucleotide variaion</i>)
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MR	: Manyetik rezonans görüntüleme
MZ	: Monozigot (tek yumurta) ikizi
M-CHAT	: Değiştirilmiş-Oyun Çocuğunda Otizmi Tarama Listesi (<i>The Modified Checklist for Autism in Toddlers</i>)
NCBI	: <i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NF	: Nörofibromatozis
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NT	: Nörotransmitter
OB	: Otistik Bozukluk

ODKL	: Otizm Davranış Kontrol Listesi (<i>Autism Behavior Checklist (ABC)</i>)
OSA	: Otizm Spektrum Anketi
OSB	: Otizm Spektrum Bozukluğu
OKB	: Obsesif kompulsif bozukluk
PBMC	: Periferik kan tek-çekirdekli hücre (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA	: Esas bileşen analizi (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRT	: Temel tepki öğretimi (<i>Pivotal response training</i>)
QC	: Kalite kontrol (<i>Quality control</i>)
RNA-seq	: RNA dizileme (<i>RNA sequencing</i>)
RTT	: Rett sendromu
RVIS	: Artık varyant intolerans skoru (<i>Residual variation intolerance score</i>)
SAM	: <i>Sequence Alignment/Map</i>
SBS	: Sentez yoluyla dizileme (<i>sequence-by-synthesis</i>)
SCC	: Simons Simpleks Koleksiyonu (<i>Simons Simplex Collection</i>)
SCID-I	: DSM-IV için yapılandırılmış klinik görüşme (<i>Structured Clinical Interview for the DSM-IV Axis I Disorders</i>)
SCÖ	: Sosyal cevaplılık ölçeği (<i>Social responsiveness scale(SRS)</i>)
SFARI	: Simons Vakfı Otizm Araştırma Girişimi (<i>Simons Foundation Autism Research Initiative</i>)
SiÖ	: Sosyal iletişim ölçeği (<i>Social communication questionnaire (SCQ)</i>)
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SNVs	: Tek nükleotid varyantları (<i>Single-nucleotide variants</i>)
SSRI	: Serotonin geri alım inhibitörleri (<i>Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor</i>)
SV	: Yapısal varyant (<i>Structural variation</i>)
TE	: Tris-EDTA
TİB	: Toplumsal iletişimsel bozukluk

TSC	: Tüberoş skleroz kompleksi
VCF	: <i>Variant call format</i>
VUS	: Anlamlandırması belirsiz olan varyant (<i>Variant uncertain significance</i>)
YGB	: Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
YGB, BTA	: Yaygın Gelişimsel Bozukluk, Başka türlü adlandırılmayan
WES	: Tüm ekzom dizileme (<i>Whole exome sequencing</i>)
WGS	: Tüm genom dizileme (<i>Whole Genome Sequencing</i>)
ZY	: Zihinsel Yetersizlik (<i>Intellectual Disability</i>)



TEŞEKKÜR

*Hem Tıp Fakültesi hem de Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan, gelişimimi her zaman destekleyen ve üzerimde çok büyük emekleri olan değerli hocalarım **Prof. Dr. Özlem GENCER**, **Prof. Dr. Aynur AKAY**, **Prof. Dr. Şahbal ARAS**, **Prof. Dr. Neslihan EMİROĞLU**, **Doç. Dr. Taner GÜVENİR**, **Doç. Dr. Aylin ÖZBEK**, **Doç. Dr. Fatma VAROL TAŞ**, **Uzm. Dr. Burcu Serim DEMİRGÖREN** ve **Uzm. Dr. Sevay ALŞEN**'e, ayrıca bölümümüzün kurucu öğretim üyesi değerli hocam **Prof. Dr. Ayşen BAYKARA** 'ya,*

*Öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, bilgisine ve yaklaşımına hayranlık duyduğum, motivasyonumu bir kez bile kırmayıp bu tezde olduğu gibi olması en zor işlerde bile her zaman beni yüreklendiren, en başından beri örnek aldığım, değerli tez hocam **Prof. Dr. Süha MİRAL** 'e,*

*Tez sürecimin başından beri her aşamada çok değerli emekleri olan, hiçbir konuda yardımını ve fedakârlığını esirgemeyen, bilgisine, alçakgönüllülüğüne hayran olduğum ve tezimde birlikte çalışmaktan gurur duyduğum değerli bilim insanı **Yavuz OKTAY** 'a,*

*Yine işinde ne kadar titiz olduğunu gözlerimle gördüğüm tezime çok değerli katkılar veren bir diğer değerli bilim insanı **Gökhan KARAKÜLAH** 'a,*

*Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisini, tez çalışmam sırasında ise desteğini esirgemeyen değerli hocam **Doç. Dr. Burak BAYKARA** 'ya,*

*Ege Üniversitesi 'nden tezime destek veren değerli hocam **Doç. Dr. Sezen KÖSE** 'ye,*

*Tez sürecini birlikte yürüttüğümüz, yardımlarını esirgemeyen sevgili meslektaşım **Dr. Tuğçe Cansu ÖZÇELİK** 'e,*

*Yine tez sürecim başta olmak üzere yardıma ihtiyacım olduğu zamanlarda yardımlarını esirgemeyen, bilim aşkına hayranlık duyduğum değerli meslektaşım **Dr. Doğukan KOÇ** 'a,*

*Uzakta olmasına rağmen verdiği destekle her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım **Uzm. Dr. Ferhat YAYLACI** 'ya,*

*Asistanlığım boyunca beraber çalışmaktan keyif aldığım sevgili meslektaşlarım başta **Didem** olmak üzere **Handan, Canem, Damla, Dilay, Gonca, Yusuf, Eyaz, Enver, Mustafa Can, Murat, Burçin, Deniz, Barış, Önder, Gözde, Ayça, Begüm, Mert, Aybüke, Merve, Bari, Berrin, Seçil, Serkan, Cansu, Elif, Esra, Gökhan, Beste, Fatmanur, Çağatay, Oğulcan, Emin, Oğuzhan, Bahar, Ezgi** ve diğer asistan arkadaşlarıma,*

Yine hem Tıp Fakültesi hem de Psikiyatri rotasyonum sırasında değerli bilgilerinden faydalanma şansına sahip olduğum kıymetli psikiyatri hocalarım Prof. Dr. Zeliha TUNCA, Prof. Dr. Can CİMİLLİ, Prof. Dr. Tunç ALKIN, Prof. Dr. Köksal ALPTEKİN, Prof. Dr. Ayşegül ÖZERDEM, Prof. Dr. Beyazıt YEMEZ, Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ, Prof. Dr. Berna Binnur AKDEDE, Prof. Dr. Elif ONUR AYSEVENER, Doç. Dr. Halis ULAŞ, Uzm. Dr. Tolga BİNBAY'a ve birlikte keyifle çalıştığım Havva ve Mehtap başta olmak üzere tüm psikiyatri asistanlarına,

Çocuk nörolojisi rotasyonum boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Özel Eğitim Uzmanı Aysu ÖZCAN, Çocuk Gelişim Uzmanı Oya KASAPÇI, Uzm. Psikolog Esmahan ORÇIN, Psikolog Ümit ŞAHİN, Psikolog Özge KARAKUŞ, Sosyal Hizmet Uzmanı Tülin ASLANER, Sorumlu Hemşire Emel ÇEVRİM, diğer hemşire arkadaşlarım Gülcan, Zeynep, Aysel, Nurgül ve Derya'ya, anabilim dalı sekreterlerimiz Naciye ÖZEGEMEN ve Duygu ÖZBEK'e, poliklinik sekreterlerimiz Selcan ULUÇAY ve Yasin KÜÇÜKÇAPRAZ'a, servis sekreterimiz Gülçin ALGÜLLER'e, arşiv sorumlumuz Ozan ŞAKAR'a ve diğer tüm çalışanlara,

Onlar için tüm zorluğuna rağmen çalışmaya katılmayı kabul ederek büyük fedakârlıkta bulunan tüm çocuklara ve ailelerine,

Zor zamanlarımda yanımda olan aileme,

Yıllardır bir hayatı paylaştığım bir eşten çok daha fazlası sevgilim, yoldaşım ve en büyük desteğim Eser VARİŞ'a,

Hayatımıza girdiği günden beri şüphesiz en büyük mutluluk kaynağım olan ve her güne şükranla uyanma sebebim, adı gibi etrafına yaydığı ışıqla içimi ısıtan canım kızım Güneş'e,

tüm samimiyetimle tek tek teşekkür ediyorum...

İzmir, 2018

**“SENDROMİK OLMAYAN” OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU TANILI
İKİSİ DE ETKİLENMİŞ İKİZ ÇOCUK VE ERGENLERİN VE ANNE-
BABALARININ GENOMLARININ VE TRANSKRİPTOMLARININ TÜM GENOM
DİZİLEME VE RNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE ANALİZİ**

Dr. Pelin ÜNAL VARİŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı

pelinunal35@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) gibi karmaşık ve heterojen etiyolojiye sahip hastalıkların genetik nedenlerinin araştırılması için, maliyeti gün geçtikçe azalan Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemlerinin kullanılabilirliği gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada multipleks ailelerin genomik ve transkriptomik değerlendirilmesiyle etkilenmiş olgulardaki otizm etiyolojisinin saptanması; ayrıca bozukluğun şiddeti ve bireylerin özellikleri ile bu verilerin sonuçları arasında bağ kurulması amaçlanmaktadır. Bunun yanında ilerideki araştırmalara kaynak oluşturacak yüksek çıktılı verilerin elde edilmesi planlanmaktadır.

Yöntem: Çalışmaya bilinen bir genetik sendromun eşlik etmediği, DSM-5 tanı ölçütlerine göre OSB tanısı olan ikisi de etkilenmiş 5-18 yaş arası üç çift dizigot ikiz (DZ) çocuk ve ergen ile onların anne-babalarından oluşan toplam 12 birey dahil edilmiştir. OSB’ye eşlik eden tanıların saptanması amacıyla çocukların ailesinden alınan bilgilere dayanarak Okul Çağı Çocukları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi-Şimdi ve Yaşam Boyu Şekli (ÇDŞG-ŞY), otizmin şiddetini ölçmek ve tanıyı doğrulamak için ise Çocukluk çağı otizmi değerlendirme ölçeği (ÇODÖ) ve Otizm davranış kontrol listesi (ODKL) uygulanmıştır. Anne-babalara ise DSM-IV için yapılandırılmış klinik görüşme (SCID) ile Geniş Otizm Fenotipi açısından değerlendirmek için Otizm spektrum anketi (OSA) uygulanmıştır. DNA örnekleri Tüm Genom Dizileme (WGS), RNA örnekleri ise Tüm RNA Dizileme (RNA-seq) yöntemi ile dizlendikten sonra elde edilen genomik ve transkriptomik veriler çeşitli

biyoinformatik araçlarla olguların ve anne-babalarının özellikleri ve ölçek puanları da dikkate alınarak anlamlandırılmıştır.

Bulgular: Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde olgular için olası patojenik aday varyantlar belirlenmiştir. Yalnızca bir olguda aday varyant belirgin olarak az tanımlanmış, bu olgunun transkriptomik analizlerde de diğer katılımcılardan farklı konumlanması dikkat çekmiştir. Transkriptomik verilerin fonksiyonel analizinde ise mitokondri ilişkili genlerin rol oynadığı saptanmıştır.

Sonuç: WGS yöntemi OSB gibi oldukça heterojen ve karmaşık etiyopatogeneze sahip bir bozukluğun genetik etiyolojisini araştırmada oldukça faydalı kapsamlı ve faydalı bir yöntemdir. RNA-seq de gelecekte endofenotip belirlemede ve bozukluğun gidişini öngörmeye faydalı bir yöntem adayı olabilir. Bu yöntemlerle elde edilen bu kapsamlı veriler pek çok araştırma için de zengin bir kaynak sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Otizm spektrum bozukluğu, Geniş otizm fenotipi, ikiz çalışması, genomiks, transkriptomiks, Tüm genom dizileme, Tüm RNA dizileme, biyoinformatik

ABSTRACT

WHOLE GENOME ANALYSIS OF DIZYGOTIC TWINS DIAGNOSED WITH ‘NON-SYNDROMIC’ AUTISM SPECTRUM DISORDER AND THEIR PARENTS

Dr. Pelin UNAL VARIS

Dokuz Eylul University School, Child and Adolescent Psychiatry Department

Advisor: Prof. Dr. Suha MIRAL

Background: The availability of New Generation Sequencing (NGS) methods which cost is getting smaller day by day, have increasing for the investigation of genetic causes of complex and heterogeneous etiology of some diseases such as Autism Spectrum Disorder (ASD). In this study, identification of autism etiology in cases affected by genomic and transcriptomic evaluation of multiplex families; as well as the severity of the disorder and the characteristics of the individual and the results of these data. Besides this, it is planned to obtain high output data which will be a source for future researches.

Method: Patients, who are followed at the Dokuz Eylul University School of Child and Adolescent Mental Health Department outpatient clinic, and who are total of 12 people, including 3 dizygotic twins with ASD according to DSM-5 criteria and their parents were included in the study. Patients with any syndrome were excluded. ASD diagnoses in the study of both twins affected the Childhood Autism Rating Scale (CARS) were applied. Autism Behavior Checklist related to the children of parents in the study (ABC) were asked to fill out the scale. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL) all children and their families for a semi-structured interview with school age were enrolled in the study shall apply. Structured clinical DSM-IV for parents to assess whether the study is the diagnosis of Schizophrenia (SCID-I: Structured Clinical Interview for the DSM-IV Axis I Disorders) scale will be applied. Autism-Spectrum Quotient (ASQ) of its own self-report questionnaires from parents in the study will be asked to fill out to utilize Broad Autism Spectrum. Patients and parents DNA and RNA obtained from blood, Whole genome

sequencing (WGS) and RNA sequencing (RNA-seq) methods were applied. Bioinformatics analysis of data and scale results were interpreted together.

Results: When all the data were evaluated together, possible pathogenic candidate variants were identified for the cases. In only one case, the candidate variant was markedly less defined, and it was noted that transcriptomic analyzes of this phenomenon were also different from other participants. Functional analysis of transcriptomic data revealed that mitochondrial related genes were found to play a role.

Conclusion: WGS is a comprehensive and beneficial method of exploring genetic etiology of a disorder with heterogeneous and complex etiopathogenesis such as OSB. RNA-seq may also be useful candidate in future for identification of endogenous phenotypes and for the prevention of impairment these comprehensive data obtained by these methods provide a rich resource for many researches.

Keywords: Autism spectrum disorder, Broad autism phenotype, twin studies, genomics, transcriptomics, Whole genome sequencing, Whole RNA sequencing, bioinformatics.

1. GİRİŞ

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), toplumsal etkileşim ve iletişimde yetersizlik ile sınırlı ve yineleyici ilgi alanları ve davranışlarla karakterize, yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkan nörogelişimsel bir bozukluktur (1). İlk prevalans çalışmalarında 2-4/10.000 gibi nadir olarak görüldüğü düşünülen OSB'nin (2, 3) günümüzde 1/68 gibi oldukça yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Erkeklerde bu oranın 1/42 gibi daha da yüksek, kızlarda ise 1/189 civarında olduğu düşünülmektedir (4). OSB tanımlandıktan ancak yıllar sonra bozukluğun etiyolojisinde nörobiyolojik etkenlerin aydınlatılmaya başlaması ile birlikte psikolojik etkenler gibi yanlış inanışlar terk edilmiş ve böylece otizmle ilgili yayınlanan çalışmalar hızla artmıştır. Yaklaşık 6.343 makalenin yayınlandığı 1940-1999 yılları arasından 21.965 makalenin yayınlandığı 2012-2018 yılları arasında toplam yayın miktarında neredeyse üç kat artış vardır. 2012-2018 yılları arasında ise bu sayı 21.965 gibi büyük sayılara ulaşmaktadır (5).

Otizm hem klinik hem de etiyolojik olarak heterojen ve karmaşık bir bozukluk grubudur. Karmaşıklık, yalnızca her olgu için farklı olabilen yüzlerce genomik profile değil, semptomların dengesiz dağılımıyla oluşan değişik fenotipik görünümlere de bağlıdır. Ayrıca davranışsal değişiklikler gelişimsel süreçte de devam etmektedir (6). Otizm tanısı ise yalnızca karmaşık tipik olmayan davranışsal özellikler ile konmaktadır (7). Oysa insanın toplumsal ve iletişimsel davranışlarındaki bozulmayı ölçme kabiliyeti oldukça sınırlıdır. Üstelik Zihinsel Yetersizlik (ZY)¹ gibi tanıların eşlik ettiği durumlarda otizm tanısı koymak daha da zorlayıcı olmaktadır. Ruhsal Bozukluklara İlişkin Tanı ve İstatistik El Kitabı-Beşinci Baskı (DSM-5)² gibi tanı sistemlerinde ZY ve epilepsi gibi nörolojik durumlar otizm tanısında dikkate alınmaz (8). Bununla birlikte OSB'ye dismorfik özellikler, konjenital anomaliler, nöbetler ve ZY eşlik ettiği durumlarda altta yatan genetik bir bozukluk bulunma ihtimali belirgin olarak daha yüksektir (9). Pek çok kalıtsal bozukluğun aksine OSB ve diğer psikiyatrik bozuklukların etiyopatogenezi çok fazla etkene bağlı olduğundan genetik testler hala otizmin başlangıç tanısında kullanılamamaktadır (10).

¹ intellectual disability

² DSM-5: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition*

Genetik ve genomik teknolojik ve metodolojik ilerlemeler, son birkaç on yılda binlerce nadir Mendelyan hastalık ve daha yaygın, karmaşık hastalığın etiyolojisinde yer alan mutasyonların tanımlanmasını sağlamıştır. OSB ise yaklaşık %50'lik oran ile en yüksek kalıtılabilirlik oranına sahip nöropsikiyatrik hastalıktır (11). Otizm etiyolosinde simpleks ailelerle³ yapılan genetik çalışmalarda çok sayıda *de novo* varyantın⁴ tanımlanabilmesi hastalık patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlamakla birlikte, hem simpleks hem de multipleks ailelerle⁵ yapılan çalışmalar ise karşılaştırmalı bulgular sağlaması yanında multipleks ailelerde daha önemli rol oynadığı düşünülen yaygın varyantların ortaya çıkarılması açısından oldukça önemlidir (12).

Moleküler genetiğin geldiği noktada Yeni Nesil Dizileme (NGS)⁶ yöntemlerinin gelişmesi ve maliyetlerindeki azalma OSB gibi karmaşık hastalıkların etiyolojisi aydınlatmada çok faydalı olmaktadır. Kromozomal mikrodizi (CMA)⁷ ve Tüm ekzom dizileme (WES)⁸ yöntemleri ile genomun yalnızca %2'lik kodlanan bölgesinin kapsanmasına karşılık Tüm genom dizileme (WGS)⁹ teknolojisi ile genomun tamamının kapsanması sağlanmaktadır. WGS'nin OSB tanılı olguların daha yüksek bir oranından (%15-50) sorumlu yaygın varyantların etkisini ortaya çıkarmada faydalı olmasının yanında bu yaygın varyant verilerinin nadir varyant verileri ile birleştirilmesiyle genlerin penetrans¹⁰, değişken ekspresivite¹¹ ve pleiotropik¹² etkilerin daha detaylı anlaşılmasının sağlanacağı düşünülmektedir (12).

OSB'de genetik etiyolojiyi ortaya çıkarmanın en önemli faydalarından biri erken davranışsal bulgulardan yola çıkılarak kesin tanı koymanın zor olduğu ancak erken eğitsel müdahaleden fayda görebilecek daha küçük yaştaki çocuklardır. Bunun yanında bir kişide OSB'nin genetik nedenleri başta olmak üzere bozukluğun nörobiyolojik mekanizmalarını

³ Yalnızca bir tane otizm tanılı bireyin olduğu aile.

⁴ *de novo* varyant: bireylerde tanımlanmış ancak biyolojik ebeveynde saptanamamış genetik varyantlardır. Genelde ebeveyne ait germ hücrelerinde veya zigotta oluşan mutasyonlardan kaynaklandığı varsayılmaktadır ve bu nedenle diğer kardeşlerde bu varyantlar kalıtılmaz. İstisna olarak gonodal mozaizme bağlı ortaya çıkan *de novo* genetik varyantlar diğer kardeşlerde de ortaya çıkabilir.

⁵ Birden fazla otizm tanılı bireyin olduğu aile.

⁶ NGS: *Next Generation Sequencing*

⁷ CMA: *chromosomal microarray*

⁸ WES: *Whole Exom Sequencing*

⁹ WGS: *Whole Genome Sequencing*

¹⁰ penetrans: belli bir fenotipi gösteren belirli bir genetik varyanta sahip bireylerin oranı.

¹¹ ekspresivite: bir kişinin belirli bir özellik veya fenotipi ne derecede sergilediği.

¹² *pleiotropy*: bir genin birden fazla ilişkiz görünen fenotipik özelliklere neden olması.

anlamak gidişini belirlemek, tedaviyi yönetmek, ailesel “yineleme oranını”¹³ değerlendirmek ve genetik profillerine göre geliştirilmeye çalışılan olası “hassas/kişisel tıp”¹⁴ tedavilerin sunmak açısından oldukça önemlidir (12, 13).

Geniş Otizm Fenotipi (GOF), otizm tanılı bireylerin akrabalarında görülen, toplumsal beceri, iletişim ve tekrarlayan basmakalıp davranış örüntüleri alanlarındaki otizm tanısını karşılamayan belirtileri içerir. GOF’un genetik etiyojisi ile ilgili yapılacak çalışmaların otizmin altta yatan mekanizmalarını saptamada da faydalı olacağı düşünülmektedir (14).

Bu çalışmada çevresel ve epigenetik faktörlerin en az etkili olduğu düşünülen ancak farklı genotipe sahip OSB tanılı ikizi de etkilenmiş dizigot (DZ)¹⁵ ikizlerin ve anne-babalarının genomlarının WGS yöntemi ile analiz edilmiş ve etkilenmiş çocuklardaki genetik etiyojisi belirlenmeye çalışılmıştır. WGS tekniği sonucu elde edilen verilerin yüksek çıktılı olması nedeniyle verilerin sonraki çalışmalarda kaynak olarak kullanılması planlanmıştır. Bunun yanında çalışmaya katılan tüm bireylerin transkriptomları RNA-seq yöntemi ile dizilenmiş, elde edilen verilerle otizmin şiddeti, ebeveynlerin GOF özellikleri arasında ilişki kurulmasının yanında otizm ölçeklerinin alt skorları kullanılarak olgulardaki biyolojik süreçler hakkında fikir yürütülmeye çalışılmıştır. Yine WGS verileri gibi RNA-seq verilerinin de daha sonraki çalışmalar için kaynak olarak kullanılması planlanmıştır.

¹³ *recurrence rate*

¹⁴ *precision/personalized medicine*

¹⁵ DZ: çift yumurta ikizi

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım ve Tarihçe

OSB nörogelişimsel bozukluklar içinde yer alan, belirtilerin erken gelişim döneminde başladığı, toplumsal iletişim ve etkileşimde süregiden yetersizlikler ve sınırlı, yineleyici davranışlar, ilgi alanları ya da etkinlikler ile seyreden bir bozukluktur (1).

Amerikalı çocuk psikiyatristi ve ilk çocuk psikiyatrisi kitabının yazarı Leo Kanner, 1943’de, insanlarla ilişki kurmayan sekizi erkek, üçü kız 11 çocuk olguyu rapor etti (15). Kanner olguları, sonradan “infantil otizm” ve şizofreni ilişkisinde önemli bir karışıklığa neden olacak olan, Bleuer’in (16) şizofrenideki “ben merkezci” (egosantrik) düşünce biçimi için kullandığı, Yunanca “ben” anlamına gelen “*autos*” kelimesinden köken alan eski “otistik” terimini kullanarak tanımladı. Kanner “otistik yalnızlığa” ek olarak, aynılık konusunda ısrar veya değişime karşı direnç şeklinde olan ikinci bir çekirdek belirtinin yanında, basmakalıp motor davranışlar (stereotipiler), alışılmadık ilgiler ve ekolaliyi¹⁶ de bu kavrama dahil etti. Kanner’in bu çalışması günümüzde otizm olarak bildiğimiz durumun oldukça doğru bir tanımlamasıdır. Otizm teriminden kaynaklı karışıklık dışında mükemmel olan bu tanımlama, bozukluğun ZY ile ilişkili olmadığı, diğer tıbbi durumlar ile birlikte görülmediği, toplumsal sınıf ile güçlü bir ilişkisinin olduğu ve uygunsuz bakım vermeye bağlı geliştiği gibi ileriki araştırmacılar için yanıltıcı olacak olan bazı saptamalar da içermektedir. (17)

1944’de ise Hans Asperger (18) belirgin toplumsal yetersizlikleri ve olağandışı özelleşmiş ilgi alanları olan, dil becerileri iyi gelişmiş ancak motor problemleri olan bir grup erkek tanımladı. Kanner’in raporundan habersiz olan Asperger bu toplumsal yetersizlikle ilgili “otistik psikopati” terimini kullandı. Asperger’in bu tanımı ilk “Otizm Spektrum Bozukluğu” isimlendirmesini kullanan Lorna Wing’in önemli derlemesine ve vaka serilerine kadar ilgi çekmemiştir. (19, 20)

¹⁶ ekolali: yankılama

1966'da Avusturya'lı pediatrist Andreas Rett, (21) bazı otistik özelliklerin yanında olağandışı basmakalıp motor davranışlar (tuhaf el yıkama gibi), kazanılmış becerilerin belirgin kaybı, solunum zorlukları ve ortopedik problemler sergileyen bir grup kız olgudan bahsetti. DSM-IV'de Rett bozukluğu olarak yer alan bu bozukluk, bazı özgül gen kusurlarına sahip olduğunun gösterilmesi nedeniyle DSM-5'den çıkarılmıştır.

1950 ve 1960'lı yıllarda otizmin psikolojik nedenlerine yönelik yanlış inanışlar (sosyoekonomik durumla ilişkisi ve “buzdolabı anne hipotezi” gibi) ve çocukluk çağı şizofrenisi ile olan karışıklık kavramla ilgili araştırmaları önemli ölçüde etkilemiştir. (22, 23) Rimland ise daha 1964 yılında otizme nörobiyolojik yaklaşımın önemini savunan bir kitap yazmış (24) ve sonrasında infantil otizm ile çocukluk çağı şizofrenisinin farklı bozukluklar olduğunu öne sürmüştür (25). 1970'li yıllardan sonra ise otizmle ilgili çalışmalar hız kazanmış, Wing otizmin sosyoekonomik durumla ilişkisinin olmadığını ortaya koymuştur (26). İngiltere'de yapılan önemli bir çalışma dizisinde de otizmin başlangıcı, klinik özellikleri ve aile öyküsü ile şizofreniden farklı bir bozukluk olduğu kanıtlanmıştır (27, 28). Rutter 1978'de toplumsal gelişimde bozulma, dil gelişiminde gecikme ve sapma, aynılıkta ısrar ve 30 aydan önce başlama ölçütlerinin olduğu “çocukluk çağı otizmini” tanımlayan bir sınıflama sistemi geliştirmiştir (29). Bu çalışmalar neticesinde, daha önce 1967'de “Hastalıkların ve Sağlıkla İlgili Sorunların Uluslararası İstatistiksel Sınıflaması, Sekizinci versiyonu”nda (ICD-8)¹⁷ ancak şizofrenin alt tiplerinden biri olarak yer alan otizm, DSM-III içinde “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar (YGB)” başlığı altında “erken bebeklik otizmi” olarak ayrı bir tanı kategorisi altında yer almıştır (30). DSM-IV ve ICD-10 tanı sistemlerinde ise YGB tanı kategorisi altında kümelenmiştir. DSM-IV'de “Genellikle ilk kez bebeklik, çocukluk ya da ergenlik döneminde tanısı konan bozukluklar” üst başlığı altında yer alan YGB tanı kümesi, Otistik Bozukluk (OB), Rett Bozukluğu, Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu, Asperger Bozukluğu (AB) ve Yaygın Gelişimsel Bozukluk, Başka türlü adlandırılmayan (YGB-BTA) olacak şekilde beş alt kategoriye ayrılmıştır (30). 2013'de yayınlanan DSM-5'de ise otizm tanısı “Nörogelişimsel bozukluklar” üst başlığı altında; OB, Çocukluk Çağı Dezintegratif Bozukluğu, AB ve YGB, BTA alt kategorilerin birbirleri arasında altta yatan nörobiyolojik profiller açısından farklılık olmaması nedeniyle hepsinin birleştirilip, Rett bozukluğunun gruptan çıkarılması ve OSB adı

¹⁷ ICD-8: *International Classification of Diseases –8th edition*

ile bir şemsiye terimi olan “spektrum” olarak isimlendirilmesiyle tanımlanmıştır (1). Klasik anlamda “spektrum” kavramı, altta yatan mekanizmaların (ör. genotip) aynı olduğu ancak farklı belirtilerle seyreden durumlar için kullanılmaktayken; OSB terimindeki “spektrum” kelimesi ise bu klasik anlamın dışında daha farklı sebeplere bağlı olarak gelişen, farklı şiddette seyreden, ortak yönleri olan belirti kümelerini tanımlamaktadır (31). Ayrıca DSM-5’de, DSM-IV’den farklı olarak tanı ölçütlerinde belirti kümelerinin sayısı üçten ikiye indirilmiştir. Buna göre “sınırlı, yineleyici davranış örüntüleri, ilgiler ya da etkinlikler” alanı varlığını korurken; toplumsal etkileşim ve iletişim alanları “toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimler” altında birleştirilmiştir. Ayrıca daha önce tanı ölçütleri arasında yer almayan “duyusal olarak aşırı ya da az duyarlılık” belirtileri, değişmeden kalan “sınırlı, yineleyici davranış örüntüleri, ilgiler ya da etkinlikler” belirti kümesinin içinde tanı ölçütlerine dahil edilmiştir (1). DSM-5 tanı ölçütleri Tablo 1’de yer almaktadır.

Toplam 4453 çocukla yapılan bir çalışmada YGB-BTA tanısı olan olgularının DSM-5’e göre tanı dışı kalıp kalmadığı incelenmiş ve %91 olgunun tanı almayı sürdürdüğü gösterilmiştir (32). Yine de bu yeni sınıflamadaki tanı ölçütlerinde yapılan değişiklikler nedeniyle otizm tanılı bazı çocukların bu tanıyı kaybedeceği endişesi sürmektedir (33). DSM-IV YGB tanı ölçütleri ve DSM-5 OSB tanı ölçütlerini karşılaştıran bazı çalışmalarda, daha önce YGB tanısı alan bazı çocuk ve ergenlerin OSB tanısı almayabileceği gösterilmiştir (34, 35). Yine ülkemizde yapılan ve klinik örneklem verilerini içeren bir çalışmada DSM-IV’e göre tanı alan olguların %19,3’ünün DSM-5’e göre tanı alamadığı bulunmuştur (36). Bu nedenle DSM-5 tanı ölçütlerinin altında “DSM-IV’e göre OB, AB ve YGB-BTA tanısı almış olanlara OSB tanısı verilmelidir” şeklinde bir not yer almaktadır. Ayrıca “Toplumsal iletişimde belirgin eksiklikleri olan, ancak belirtileri, OSB için başka türlü tanı ölçütlerini karşılamayan kişiler, Toplumsal iletişim bozukluğu (TİB) açısından değerlendirilmelidir” şeklinde ekleme yapılmıştır. TİB tanısı, toplumsal iletişim becerilerindeki yetersizlikleri ile OSB tanısına benzetmekle birlikte, kısıtlı ve yineleyici davranışların görülmemesi ile birlikte OSB’den ayrılır (1). TİB tanısı, yine “Nörogelişimsel bozukluklar” üst başlığının “İletişim Bozuklukları” alt başlığının altında ilk defa DSM-5’de tanımlanmış bir tanıdır (1).

Tablo 1: DSM-5 OSB tanı ölçütleri

A. O sırada ya da öyküden alınan bilgilere (ayrıntılardan çok örnekleyen) göre, aşağıdakilere kendini gösteren, değişik biçimleriyle toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimde süregiden eksikler.
1. Sözelimi, olağandışı toplumsal yaklaşım ve karşılıklı konuşmaktan, ilgilerini, duygularını ya da duygulanımını paylaşmaya, toplumsal etkileşimi başlatmamaya ya da toplumsal etkileşime girememeye dek değişen aralıkta, toplumsal-duygusal karşılıklı eksikliği.
2. Sözelimi, sözel ve sözel olmayan tümleşik iletişim yetersizliğinden, göz iletişim ve beden dilinde olağan dışılıklara ya da el-kol devinimlerini anlama ve kullanma eksikliklerine, yüz ifadesinin ve söz olmayan iletişimin hiç olmamasına dek değişen aralıkta, toplumsal etkileşim için kullanılan söz olmayan iletişim davranışlarında eksiklikler.
3. Sözelimi, değişik toplumsal ortamlara göre davranışlarını ayarlama güçlüklerinden, imgesel oyunu paylaşma ya da arkadaş edinme güçlüklerine, yaşlılarına ilgi göstermeye ya da arkadaş edinme güçlüklerine, yaşlılarına göre ilgi göstermemeye dek değişen aralıkta, ilişkilerini sürdürme ve ilişkileri anlama eksiklikleri.
B. O sırada ya da öyküden alınan bilgilere (ayrıntılardan çok örnekleyen) göre, aşağıdakilerden en az ikisi ile kendini gösteren, sınırlı, yenileyici davranış örüntüleri, ilgi ya da etkinlikler:
1. Basmakalıp ya da yineleyici devinsel (motor) eylemler, nesne kullanımları ya da konuşma (ör. yalın devinsel basmakalıp davranış örnekleri, oyuncakları ya da oynar nesneleri sıraya dizme, yankılama [ekolali], kendine özgü deyişler).
2. Ayrılık konusunda direnme, sıradanlık dışına esneklik gösterme ya da törensel ya da sözel olmayan davranışlar (ör. küçük değişiklikler karşısında aşırı sıkıntı duyma, geçişlerde güçlükler yaşama, katı düşünce örüntüleri, törensel selamlama davranışları, her gün aynı yoldan gitmek ve aynı yemeği yemek isteme).
3. Yoğunluğu ve odağı olağandışı olan, ileri derecede kısıtlı, değişkenlik göstermeyen ilgi alanları (ör. alışılmadık nesnelere aşırı bağlanma ya da bunlarla uğraşıp durma, ileri derecede sınırlı ya da saplantılı ilgi alanları).
4. Duyusal girdilere karşı çok yüksek ya da düşük düzeyde tepki gösterme ya da çevrenin duysal yanlarına olağandışı bir ilgi gösterme (ör. ağır/ısıya karşı aldırışsızlık, özgül bir takım seslere ya da dokulara karşı ters tepki gösterme, nesneleri aşırı koklama ya da nesnelere aşırı dokunma, ışıklardan ya da devinimlerden görsel büyülenme).
C. Belirtiler erken gelişim evresinde başlamış olmalıdır (toplumsal gerekler sınırlı yeteneğin üzerine çıkana dek tam olarak kendini göstermeyebilir ya da daha sonraki yıllarda, öğrenilen yöntemler ile maskelenebilir.)
D. Belirtiler, toplumsal, işle ilgili alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında klinik açıdan belirgin bir bozulmaya neden olur.
E. Bu bozukluklar, zekâ özürlü ya da genel gelişimsel gecikme ile daha iyi açıklamaz. Zekâ özürlü ve otizm spektrum bozukluğu sıklıkla bir arada ortaya çıkar. Otizm spektrum bozukluğu ve zekâ özürlü tanısı koymak için, toplumsal iletişim, genel gelişim düzeyine göre beklenenin altında olmalıdır.
Not: DSM IV otistik bozukluk, Asperger bozukluğu ya da başka türü adlandırmaya yaygın gelişimsel bozukluk kesin tanısı almış olan kişilere otizm spektrum bozukluğu tanısı konmalıdır. Toplumsal iletişimde belirgin eksiklikleri olan, ancak belirtileri, otizm spektrum bozukluğu için tanı ölçüklerini karşılamayan kişiler, toplumsal iletişim bozukluğu açısından değerlendirilmelidir.
Varsa belirtiniz:
• Eşlik eden zekâ özürlü olan ya da olmayan, • Eşlik eden dil bozukluğu olan ya da olmayan, • Eşlik eden, bilinen bir sağlık durumu ya da kalıtsal durum ya da çevre etkeni olan, • Eşlik eden diğer bir nörogelişimsel, ruhsal ya da davranışsal bozukluk, • Katatoni ile giden.

DSM-5’de ayrıca DSM-IV’den farklı olarak boyutsal yaklaşım benimsenmektedir. Boyutsal yaklaşıma göre, tanı ölçütlerinin yanında OSB için ağırlık düzeyleri belirlenmiş ve OSB tanısı alan bireylerin hafif, orta ve ağır olarak belirtilmesi önerilmiştir. Bunun yanında eşlik eden ZY, dil bozukluğu, bilenen sağlık durumu, kalıtsal durum ya da çevresel etkeni, diğer bir nörogelişimsel, ruhsal ya da davranışsal bozukluk ve katatoninin olup olmadığının belirtilmesi ve kodlanması istenmektedir. DSM-5’de ayrıca farklı yaş aralığı ve dil düzeyine göre belirti örnekleri verilmiştir (1).

2.2. Epidemiyoloji

1960 ve 1970’lerde otizmle ilgili İngiltere ve Amerika’da ve ilk yapılan ilk prevalans çalışmalarında oran 2-4/10.000 olarak bildirilmiştir (2, 3). 1980’ler ve 1990’larda ise otizmin tanı ölçütlerinin genişletilmesine bağlı yaygınlığında artış olduğu dikkat çekmektedir (37). 2002’de Amerika’daki otizm prevalans tahminlerinin oranı yaklaşık 6-7/1.000’dir ve oranın ilk çalışmalara göre 30 kat artmış olduğu görülmektedir (37, 38). Yirminci yüzyılın sonunda bu oran daha da artmıştır ve bunun sebebi olarak daha geniş bir otizm spektrumu kavramının benimsenmesi, çalışmalarda farklı metodolojiler kullanılması, tarama hizmetlerinin gelişmesi, ebeveynlerin ve profesyonellerin farkındalığının artması gibi etkenlerin yanında baba yaşında artış gibi otizme özgül risk etkenlerinin de artmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (39-41). “Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi” (CDC),¹⁸ “Otizm ve Gelişimsel Bozukluklar İzlem Ağı”nın (ADDM Network)¹⁹ geniş tabanlı verilerini kullanarak hazırladığı raporunda, OSB tanısının Amerika’da tüm ırk, etnik grup ve sosyoekonomik gruplar arasında 2002 ve 2000 yıllarında 1/150; 2006’da 1/110; 2008’de 1/88; 2012’de ise 1/68 oranında olduğunu rapor etmiştir (4, 42). 2011 yılında Güney Kore’de 7-12 yaş arasındaki çocukların tarandığı geniş bir toplum tabanlı bir epidemiyolojik çalışmada OSB prevalansının %2.68 olduğu bulunmuştur (43).

OSB ile ilgili nerdeyse tüm epidemiyolojik çalışmalarda tutarlı olan bir bulgu, erkek çocukların kızlardan 4-5 kat daha çok etkilendiğidir. ZY şiddetlendikçe kız erkek oranı birbirine

¹⁸ CDC: Centers for Disease Control and Prevention

¹⁹ ADDM Network: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network

yaklaşmaktadır (37). Bu cinsiyetler arası farklılığın etkilenmiş kızlarda sınırlı ve yineleyici davranışların daha az görülmesi nedeniyle tanılamada yan tutmaya yol açması sonucu olabileceği ileri sürülmüştür (44). Buna ek olarak bu farklılık “dişi-koruyucu etki”²⁰ ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmaya göre kızlarda bozukluğun ortaya çıkması için erkeklere oranla daha fazla etiyolojik yükün (genetik ve çevresel) olması gerekir (45). Genetik araştırmalar, kız cinsiyetin OSB için risk oluşturan kalıtsal ve *de novo* genetik varyantların etkilerine karşı koruyucu olduğunu ve cinsiyet kromozumu genlerinin ve/veya özellikle testosteron gibi cinsiyet hormonlarının da bozukluktaki cinsiyet farklılıklarının ortaya çıkmasında önemli olduğunu göstermektedir (46, 47). Ayrıca yapılan genetik çalışmaların bazılarında etkilenmiş kızlarda erkeklere oranla daha fazla mutasyon yükünün görülmesi de “dişi koruyucu etki” hipotezini güçlendirmiştir (48). Bunun yanında ZY daha şiddetli etkilenmiş bireylerden kızlarda erkeklere göre toplumsal iletişim alanında daha fazla bozulma görülmektedir ve bu grupta kızlar daha düşük zekâ ortalamasına sahiptir.

2.3. Tanısal değerlendirme

OSB tanısı tamamen davranışsal bulgulara dayanarak konmaktadır. Çünkü bozukluğun heterojenitesinden dolayı henüz tanımlanmış geçerli bir biyobelirteç, moleküler tanı testi veya beyin görüntüleme bulgusu bulunmamaktadır. OSB tanısı deneyimli bir klinisyen tarafından standardize yöntemler kullanılarak iki yaşından itibaren güvenilir bir şekilde konulabilmektedir. Tanı, detaylı gelişimsel öykü, bilişsel ve iletişimsel işlevselliğin kapsamlı değerlendirilmesi, çoklu tanı araçları ve bilişsel araçlar ile otizm belirtilerinin gözlenmesine dayanarak konulur (49). OSB tanısı için ideal olanı aşağıda belirtilen, standardize, yapılandırılmış tanı görüşmelerden birini uygulamaktır. Değerlendirme sırasında eş tanıli psikiyatrik bozukluklar ve tıbbi durumların detaylı bir şekilde belirtilmesi önemlidir. Ayrıca adaptif becerilerin standardize araçlarla (ör. Vineland adaptif davranış ölçeği²¹) değerlendirilmesi önerilmektedir (50).

²⁰ *female protective effect*

²¹ *Vineland adaptive behavior scale*

OSB için dünyada en yaygın kullanılan tanı araçları Otizm tanı görüşmesi-gözden geçirilmiş formu (ADI-R)²² ve Otizm tanı gözlem çizelgesi(ADOS)²³'dir. ADI-R, standardize, yarı yapılandırılmış, araştırmacı merkezli bir görüşmedir ve bakım verenle yapılır (51). ADOS ise, çocuk ve erişkinlerin klinisyen tarafından gözlemine dayanan standardize, yarı yapılandırılmış tanı aracıdır (52). ADOS-2, zihinsel yaşı 15 aylıktan küçük çocukların ADOS ile klinik tanıdan bağımsız olarak otizm tanısı alması nedeniyle, ADOS'un 30 aydan küçük çocuklara da uygulanabilmesi amacıyla geliştirilmiş versiyonudur (53). ADI-R ve ADOS, DSM-IV tanı ölçütlerine dayanmaktadır ve otizm tanısı için altın standart kabul edilmektedir. Ancak bu tanı araçlarının Türkçe geçerlilik güvenilirlik çalışmaları bulunmamaktadır. Ayrıca bunlardan ADI-R'nin 1,5-3 saat gibi uzun bir süre gerektirmesi ve hem ADI-R'yi hem de ADOS'u uygulayabilmek için özel yoğun bir eğitim gerekmesi bu tanı araçlarının kullanılmasını kısıtlamaktadır. Bunun dışında ÇODÖ²⁴ (Çocukluk otizmini değerlendirme ölçeği) en çok kullanılan tanı ve derecelendirme ölçeklerinden biridir (54). M-CHAT²⁵ (Değiştirilmiş-Oyun Çocuğunda Otizmi Tarama Listesi) ise küçük çocuklarda en sık kullanılan tarama aracıdır (55). SİÖ²⁶ (Sosyal iletişim ölçeği) ve SCÖ²⁷ (Sosyal cevaplılık ölçeği) ise çocuk ve erişkinler için uygulanan tarama testlerinden bazılarıdır (56, 57).

2.4. Klinik Görünüm

2.4.1. Erken işaretler

OSB'yi erken tanımak tedavide daha etkili olan erken müdahalenin uygulanmasını sağladığı için çok önemlidir. Önceden otizm tanılı çocuklar 3-4 yaşlarından sonra tanı almaktayken, günümüzde bu yaş daha erkene çekilmiştir. Erken işaretler ortak ilginin²⁸ (bir nesneyi işaret etmek) ve "mış gibi" oyunların²⁹ olmaması ya da az gelişmiş olması, karşılıklı duygulanım davranışında bozukluk, ismi seslenildiğinde cevap vermeme, azalmış taklit, gecikmiş sözel veya sözel olmayan iletişim, motor gecikme, olağandışı tekrarlayıcı davranışlar,

²² ADI-R: *The autism diagnostic interview-revised*

²³ ADOS: *The autism diagnostic observation schedule*

²⁴ ÇODÖ: *Childhood autism rating scale (CARS)*

²⁵ M-CHAT: *The modified checklist for autism in toddlers*

²⁶ SİÖ: *Social communication questionnaire (SCQ)*

²⁷ SCÖ: *Social responsiveness scale (SRS)*

²⁸ *joint attention*

²⁹ *pretend play*

tipik olmayan vizyomotor keşif ve değişime esneksizlik olarak özetlenebilir (58, 59). Fakat yüksek işlevli bireylerin, özellikle kızların, tanısı çok daha geç olabilmektedir (60). Rutin erken tarama 18 ve 24 aylıkken önerilmektedir (61).

2.4.2. Toplumsal iletişim ve etkileşimde nitel bozulmalar

Toplumsal etkileşimde bozulma OSB'nin çekirdek belirtisidir ve bu belirti çok ağırdan daha az dikkat çeken daha hafif düzeye kadar olabilen değişen aralıklarda olabilir. OSB tanılı çocuklar toplumsal ilişkiyi başlatmakta güçlük çekerler ya da kurdukları toplumsal etkileşimde tuhaflık sergilerler. Sözel olmayan iletişim becerilerinde gerilik, esneklik ve kendiliğindenlik-doğallık becerilerinde eksiklik ve kullanılan jest ve mimiklerde kısıtlılık söz konusudur. Empati yetenekleri zayıf olan otizm tanılı çocukların arkadaşlık becerileri iyi değildir.

OSB tanılı bireylerde dil gelişimi de farklı oranlarda etkilenmiştir. Konuşabilen OSB tanılı bireylerde karşılıklı sözel iletişimi başlatma ve sürdürmede, konuşma sesinin ton, ritim ve hızını ayarlama da olağan olmayan özellikler gözlenmektedir. Ani ve geç ekolali sıktır, zamirlerin tersten söylenmesi, *neolojizm*³⁰ ve tekrarlayıcı konuşmalar da sıklıkla görülür (62).

2.4.3. Sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ya da etkinlikler

Etkilenmemiş çocuklarda da görülebilen ancak 3-4 yaşından önce kaybolma eğiliminde olan basmakalıp motor hareketlerin OSB tanılı çocuklarda tam tersine 5 yaşından sonra arttığı bilinmektedir. Bunlar kendi çevresinde dönme, sallanma, parmak ucunda yürüme, garip el hareketleri, kanat çırpma, eşyaları gözüne çok yakın tutarak seyretme gibi basit motor hareketlerin yanında otizm tanılı bireylere özgü oyuncakları dizme veya çevirme, oyuncakların yalnızca bir parçası ile ilgilenme gibi basmakalıp ve tekrarlayan oyunları da içerir. Tekrarlayıcı törensel davranışlar, aynılıkta ısrar ve rutinleri bozulduğunda kaygı yaşama görülebilir (62). Ekolali ve kendine özgü tabirler gibi tekrarlayan ve basmakalıp konuşmalar, selamlaşma ritüelleri, her gün aynı yemeği veya yolu tercih etme gibi rutinler, kısıtlı ve sabitleşmiş ilgiler diğer belirtilerdir (1). OSB tanılı bireylerde DSM-5 tanı ölçütlerine yeni dahil edilen duyuşal uyarılara az duyarlılık (hiposensitivite) veya aşırı duyarlılık (hipersensitivite) yanıtları olabilir

³⁰ *neolojizm*: kelime uydurma

(62). Örneğin, ağrı eşiğinin yüksek olmasına karşın, dokunmaya aşırı tepki gösterme, hafif bir sese veya ışığa abartılı tepkiler verme ya da aşırı yemek seçme gibi davranışlar sergileyebilirler.

2.5. Otizmle ilgili nörobilişsel kuramlar

Bozulmuş zihin kuramı³¹, otizm tanılı çocuklarda 1985 yılında tanımlanmıştır (63). Kendisinin ve başkasının zihinsel durumunu anlamak olan “zihinselleştirme”³² ile ilgili zorlukların toplumsal iletişim bozukluklarında önemli olduğu düşünülmüştür. Görüntüleme yöntemleriyle mediyal prefrontal korteks, üst temporal sulkus, temporopariyetal bölge, amigdala ve fuziform girus gibi beyin bölgesi ağları, toplumsal algı ve bilişin kullanıldığı etkinliklerde tutarlı olarak hipoaktif bulunmuştur (64, 65). Ayrıca OSB tanılı bireylerde görülen yürütücü işlev bozukluklarının, tekrarlayıcı basmakalıp davranışlar ve toplumsal iletişim eksikliklerinin altında yatan mekanizma olabileceği düşünülmektedir (66, 67). Görüntüleme çalışmaları, frontal, pariyetal ve striatal beyin devrelerin yürütücü işlevlerin bozukluğu ile ilgili ana sistemler olduğunu düşündürmektedir (64). Yürütücü işlev bozukluğu otizme özgü değildir; diğer nöropsikiyatrik durumlarda da görülebilmektedir (68-70).

2.6. Ayırıcı tanı

Yaş küçüldükçe ayırıcı tanı zordur çünkü bu yaşlarda gelişimin bir alanında sorun varsa diğer alanlarda da aksama görülme olasılığı yüksektir. OSB ile en sık karışan durumlar; dil bozuklukları, ZY, Tepkisel bağlanma bozukluğu, Çok erken başlangıçlı şizofreni, Obsesif Kompulsif Bozukluk (OKB), TİB, görme ve işitme engelleri ve selektif mutizmdir (71).

2.7. Eş tanıli durumlar

OSB tanılı bireylere genel nüfusa göre daha yüksek oranda davranışsal sorun ve psikiyatrik bozukluk eşlik etmektedir. Ancak belirtilerin görünüş biçimleri farklı olduğu için tanı koymada zorluklar yaşanmaktadır (31). OSB tanılı bireylerin %70’inde tıbbi, gelişimsel veya psikiyatrik bozukluk eş tanılarının bulunduğu düşünülmektedir. Bunlar ZY (yaklaşık %45), DEHB (%28-44), konuşma bozuklukları, tik bozuklukları ve motor anormallikler gibi nörogelişimsel bozukluklar ile anksiyete bozukluğu, depresyon, OKB, psikotik bozukluk, yeme

³¹ *theory of mind*

³² *mentalizing*

bozukluğu ve madde kullanım bozukluğu gibi psikiyatrik bozukluklardır. Eşlik eden tıbbi durumlar ise epilepsi (yaklaşık %30), uyku bozuklukları(%50-80), gastrointestinal sistem (GİS) problemleri ile frajil X sendromu (FXS) gibi genetik sendromlardır. Ergenlik döneminde eşlik eden psikiyatrik bozuklukların oranı daha da artmaktadır. OSB'ye eşlik eden diğer bozukluklar işlevsellikteki bozulmanın en önemli nedenlerindendir, rutinde değerlendirilmesi ve tedavi edilmesi önemlidir (72). OSB'nin diğer bozukluklar ile yüksek eş tanı oranı göstermesi, OSB'yi modellemede zorluklara yol açmaktadır. Hayvan modellerinde otistik davranışların değerlendirmesini zorlaştırmakta, şizofreni, DEHB ve OKB gibi diğer nöropsikiyatrik bozukluklarda görülen fenotiplerle örtüşmesine neden olmaktadır (11).

2.8. Tedavi

OSB tanılı çocukların tedavi programları bireysel gelişimsel özellikler, işlevsellik düzeyi ve yetersizlik alanlarına göre planlanmalıdır. Tedavide en etkin yaklaşım eğitsel yaklaşımlardır. Kanıt düzeyi en fazla olan eğitsel yaklaşım “Uygulamalı Davranış Analizi” (ABA)³³’dır. Erken yoğun davranış analizi³⁴ ise ABA’nın 2-5 yaş arası çocuklara uygulanmış formudur (73). “Erken başlangıçlı Denver modeli”³⁵ ve “Temel tepki öğretimi (PRT)”³⁶ ise son yıllarda etkinliği gösterilmiş diğer yöntemlerdendir (74, 75).

OSB’de ilaç tedavisi ise genelde eşlik eden psikiyatrik durumlar ve davranışsal sorunlar için kullanılmaktadır. Otizmin temel belirtisi olan toplumsal iletişimsel becerilere yönelik ilaç tedavisi henüz bulunmamaktadır. Bazı durumlarda tekrarlayıcı hareketler gibi belirtiler için ilaç tedavisi gerekli olabilmektedir. İngiltere’de yapılan bir çalışmada OSB tanılı bireylere %29 oranında ilaç reçete edildiği saptanmıştır. Bunları %9,7 oranla uyku ilaçları, %7,9 oranla psikostimülanlar ve %7,3 oranla antipsikotikler oluşturmaktadır (76). Benzer oranların bildirildiği Amerika’da “Kuzey Amerika otizm tedavi ağı”ndaki³⁷ 2.800’den fazla çocukla yapılan bir çalışmaya göre OSB tanılı çocukların %27’sine en az bir adet psikotrop ilaç reçete

³³ ABA: *Applied Behaviour Analysis*

³⁴ *Early intensive behavioral analysis*

³⁵ *The early start Denver model*

³⁶ PRT: *Pivotal response training*

³⁷ *Autism Treatment Network*

edildiği gösterilmiştir. Bunları %13 oranla stimülanlar, %8 oranla seçici seratonin geri alım inhibitörleri (SSRI)³⁸ ve %8 oranla atipik antipsikotikler oluşturmaktadır (77).

2.9. Gidiş ve Sonlanım

Bir meta-analize göre, otizm tanılı bireyler aynı yaş ve cinsiyetteki etkilenmemiş bireylere göre 2,8 kat daha fazla mortalite riski taşımaktadır (78). Bu durum daha çok eşlik eden çıkan tıbbi durumlara bağlıdır. Daha önceki çalışmalarda otizm tanılı erişkinlerin %58-78 bağımsız yaşama, eğitsel başarı, çalışma hayatı ve akran ilişkilerinde kötü sonuçlar yaşadığı bulunmuştur. Daha yüksek zekâ düzeyi, 6 yaşından önce iletişimsel ifade edici konuşma ve daha az toplumsal bozulma gibi özellikler daha iyi gidişle ilişkilidir. Çocukluk çağı izlem çalışmalarında tanı kaybı, otistik belirtilerde azalma ve normal toplumsal iletişim gibi olumlu sonuçlar da raporlanmıştır (79). Ancak ZY eşlik etmese bile yaşam kalitesi ve mesleki potansiyel açısından erişkin toplumsal işlevsellik çok da tatmin edici değildir (80).

2.10. Etiyoloji

OSB yalnızca son on yıl içinde yüzlerce yatkinlık geninin tanımlandığı karmaşık, heterojen ve çok genli³⁹ bir bozukluktur. Genetik yapısının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasının, patofizyolojisinin tam olarak ortaya konabilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (7). Ancak sadece genleri değil, hastalığa neden olan genetik unsurlarla birlikte çalışan diğer mekanizmaları tanımlamak da oldukça önemlidir. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler ile bozukluğun etiyopatogeneze katkıda bulunabilecek çevresel etkenlerin etkisinin önemini gösteren kanıtlar giderek artmaktadır (81). İmmun sistem düzenlenmesindeki bozukluğun OSB gelişiminde rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir. İlave olarak epigenetik⁴⁰ düzenlemeler OSB ilişkili bozuklukta etkilenen merkezi mekanizmalardan biridir (ör. Rett Sendromu (RTT)). Bozukluğun tüm bu yönlerini içeren kombine yaklaşım etiyojolojiyi anlamada son derece önemlidir. Son yıllarda daha çok olmak üzere otizmle ilgili yapılan çok sayıda genetik, nörokimyasal, nörofarmakolojik, nöroendokrinolojik, nöroimmünolojik çalışmalar ve nöroanatomik beyin görüntüleme çalışmalarına rağmen OSB için hiçbir etiyojolojik

³⁸ SSRI: *Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor*

³⁹ *multigenic/polygenic*

⁴⁰ Epigenetik: DNA'nın yalnızca baz dizilimi ile açıklanamayan kalıtsal bilgileri ile ilgilenen bilim dalı.

model, biyolojik veya davranışsal belirteç veya özgül psikopatolojik süreç tanımlanamamıştır (82).

2.10.1. Genetik etkenler

OSB'ler %50 ila %90 kalıtlılabilirlik⁴¹ oranı ile bilinen en kalıtlılabilir nöropsikiyatrik hastalıklardan biri olmakla birlikte tüm varyantları kalıtsal değildir; *de novo* genetik varyantlar da etiyolojide önemli etkenlerden biridir (83-85). Genetik etkenlerin ne kadar önemi olduğu hem direkt hem de direkt olmayan kanıtlarla ortaya konmuştur. Direkt olmayan kanıtlara ikiz çalışmaları örnek olarak verilebilir. Yapılan ikiz çalışmalarında konkordans⁴² oranının hiçbir zaman %100 olarak gösterilememiş olması ve kondordan monozigot (MZ)⁴³ ikizlerde bile belirti şiddeti açısından farklılıklar olması, bu kalıtlılabilirliğin çevresel riskler ve gen-çevre etkileşimleri bağlamında ortaya çıktığını düşündürmektedir (85). Direkt kanıtlar ise sitogenetik çalışmalar, Tüm genom bağlantı çalışmaları⁴⁴, Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS)⁴⁵ ile WES ve WGS gibi NGS yöntemleri ile yapılmış çalışmalardan elde edilen verilerle ortaya konmuştur (86, 87).

Otizmde biyolojik mekanizmaların etkisi, Susan Folstein ve Michael Rutter tarafından ilk ikiz çalışmasının rapor edildiği 1970'lerin sonuna kadar araştırılmamıştır (1977). Bu çalışmada olgu sayısı az olmasına rağmen genetik etkenlerin etiyolojide rol oynadığı ilk defa ileri sürüldüğü için bulgular oldukça önemlidir. Bu ilk gözlem sonrasında pek çok konkordans çalışması tarafından doğrulanmıştır (85, 88-91). MZ ikizlerle yapılan çalışmalarda konkordans oranı %60-90, DZ ikizlerde ise %0-20 olarak bulunmuştur. İkiz çalışmalarında “geniş fenotip” göz önüne alındığında bu oran daha da artmaktadır (92). Nedeni bilinmeyen OSB tanılı olguların kardeşlerinde bozukluğun yineleme oranının %5-10 olduğu saptanmışken, multipleks ailelerde bu oranın %25'lere çıkabildiği gösterilmiştir (93). Toplam 14.516 OSB tanılı çocuk örnekleminin olduğu popülasyon bazlı bir çalışmada göreceli risk (RR)⁴⁶ MZ ikizlerde 153,0; DZ ikizlerde 8,2; öz kardeşlerde 10,3; maternal üvey kardeşlerde⁴⁷ 3,3; paternal üvey

⁴¹ *heritability*

⁴² Konkordans: uyuşma

⁴³ MZ: tek yumurta ikizi

⁴⁴ *whole-genome linkage*

⁴⁵ *Genome-wide association studies (GWAS)*

⁴⁶ *relative risk*

⁴⁷ *half sibling*

kardeşlerde 2,9; kuzenlerde ise 2,0 bulunmuştur (84). Ayrıca, multipleks ailelerle yapılan daha güncel çalışmada, erkeklerde (%47,5) kızlara göre (%44,3) daha yüksek yineleme oranları saptanmıştır (94). OSB tanılı çocuğu olan ailelerde sıkça görülen “üremeyi durdurma”⁴⁸ eğiliminin, yineleme oranlarını düşük gösterdiğini öne süren bir çalışmada ise, bu durum kontrol altına alınarak analiz yapıldığında, yalnızca bir etkilenmiş kardeş varlığında yineleme oranı %10-15 iken; iki etkilenmiş kardeş varlığında ise oran erkeklerde %50, kızlarda %12 olarak bulunmuştur (95). Yine bir çalışmada öz kardeşlerde yineleme oranının üvey kardeşlere göre iki kat fazla olduğu saptanmıştır (96).

Otizm genetiğinin özellikleri

Yeni genetik teknolojilerinin ilerlemesi ile son 10-15 yılda OSB’nin genetik etiolojisinin aydınlatılmasında çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (97-99). Bu yeni OSB genomik çalışmalarının bulguları ile genetik etiolojinin rolünü destekleyen önemli kanıtlar elde edilmekle birlikte, altta yatan moleküler temelin anlaşılmasının zorluğu daha da çok ortaya çıkmıştır. Bozuklukla ilişkili kesin klinik bir model eksikliği ve bozukluğun nadir sebeplerinin de saptanabilmesini sağlayacak büyük örneklemli çalışmaların gerekliliği gen bulma sürecini zorlaştırmaktadır (100). Aslında OSB olgularının çoğunluğunun (>% 75) genetik nedeni hala bilinmemektedir (8).

Otizmde yüzlerce gen varyantları saptanmıştır. Bu varyantların risk etkileri⁴⁹ oldukça değişkendir ve otizm dışındaki diğer bozukluklarla da ilişkilidir. Otizmle ilişkili varyantlar nerdeyse tüm kromozomlarda tanımlanmış olmakla birlikte tek baz çifti değişikliklerinden (tek nükleotid varyantları (SNV’ler))⁵⁰, binlerce ila milyonlarca baz çiftinin kaybedilmesi ya da kazanılmasına kadar olan değişikliklere (kopya sayısı varyantlarına (CNV’ler))⁵¹ kadar olan tüm mutasyon yelpazesini içerir (101). Hem daha penetran olan nadir mutasyonlar ve hem de küçük etki boyutu olan yaygın varyantlar otizm genetiğinde rol oynamaktadır (99).

“Çok genli model”⁵² OSB ile ilişkili genetik etiolojiyi açıklamaya çalışan modellerden biridir. Bu modele göre çok sayıda küçük etkili kalıtsal varyant ve çevresel etkenlerin

⁴⁸ *reproductive stoppage*

⁴⁹ *risk effect*

⁵⁰ *SNVs: Single-nucleotide variants*

⁵¹ *CNV: Copy number variation*

⁵² *polygenic model*

birlikteliği ile belli bir eşiğin geçilmesi sonucu bozukluk ortaya çıkmaktadır. Diğer model ise bir ya da birkaç (oligogenik) nadir ve yüksek oranda penetran mutasyonun etkisi sonucu bozukluğun ortaya çıktığının düşünüldüğü “majör gen modeli” olarak tanımlanmaktadır. Majör gen modeline göre aileler “düşük riskli” ve “yüksek riskli” olarak iki gruba ayrılmaktadır. Daha sık görülen “düşük riskli” grupta mutasyon *de novo* ortaya çıkmakta kız çocuk bilinmeyen bir mekanizma ile mutasyonun etkisinden korunmaktadır. “Yüksek riskli” grupta ise maternal kalıtılan mutasyon erkek çocuklara daha yüksek oranda penetran şekilde aktarılmaktadır. Ancak bu modellerin hiç biri tek başına otizmin genetik etiyolojisini açıklamaya yeterli olamamaktadır. Tüm veriler göz önüne alındığında hem genetik riskin en büyük bileşenini oluşturan yaygın genetik varyantların, hem de daha az görülmekle birlikte önemli katkıları olan *de novo* ve kalıtsal nadir varyantların etiyolojide birlikte rol oynadıkları düşünülmektedir (11).

OSB için iyi tanımlanmış risk varyantlarının penetrans ve ekspresivitesi oldukça çeşitlidir. Bu da genotip-fenotip yapısının karmaşıklığına işaret eder. Probanddaki⁵³ mutasyonu taşıyan ebeveyn veya kardeşin hastalıktan etkilenmemesi; “oligogenik heterozigosite”⁵⁴ yani aynı kişide birden fazla olası risk geni bulunması sonucu hastalığın ortaya çıkması (102) ya da bireyde yaygın varyantların kümülatif etkisi gibi etkenlerin hepsi penetrans farklılıklarını açıklayabilir (103). Yüksek oranda penetran mutasyonlar OSB alt tiplmesi için kullanılabilirken, yaygın varyantlar tanılama için kullanılamaz (104). Örneğin OSB tanılı ve ZY’lü hastalarda saptanmış olan CHD8⁵⁵ ve DYRK1A⁵⁶ genlerindeki mutasyonların şimdiye kadar etkilenmemiş herhangi bir bireyde saptanmaması, bu mutasyonların yüksek oranda penetran olduğuna işaret etmektedir (105).

Otizimde etkilenen kardeşlerin arasında bile, fenotipik çeşitlilik ile sonuçlanan farklı gen takımı mutasyonların etiyolojiden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (106). Yüksek risk OSB ilişkili CNV’ler tanımlanan ailelerin üçte ikisinde, bu CNV’ler tüm etkilenen kardeşler tarafından paylaşılmamıştır; bu da “aile içi genetik heterojeniteyi”⁵⁷ gösterir (107). Ayrıca otizmde aynı mutasyonu taşıyan bireylerde bile farklı fenotiplere rastlanması yüksek pleiotropi

⁵³ *proband*: tıbbi durum için araştırılmaya altına alınan ailenin ilk etkilenmiş üyesi.

⁵⁴ *oligogenic heterozygosity*: aynı kişinin bir bozukluk ile ilgili birden fazla risk varyantı taşıması.

⁵⁵ CHD8: *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 8*

⁵⁶ DYRK1A: *Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A*

⁵⁷ *intrafamilial genetic heterogeneity*

oranına işaret eder. Pleiotropi bir genin birden fazla fenotipi etkileyebileceği anlamına gelir. Bunlar bazen somatik fenotipler (ör. GİS problemleri) olabileceği gibi, bazen de DEHB, ZY gibi psikiyatrik bozukluklardır. Örnek olarak bazı CNV'lerin ilişkili olduğu psikiyatrik durumlar Tablo 3'de verilmiştir.

Genetik defektler, herhangi bir sendromla ilişkili olduğu zaman “sendromik otizm⁵⁸”, olmadığı zaman “sendromik olmayan otizm” grubunda yer alırlar. “İdiyopatik otizm” terimi ise özgül bir etiyojisi saptanamamış otizm anlamına gelmektedir (97). Sendromik otizm, sendromik olmayan otizm veya idiyopatik otizm formları arasında önemli oranda biyolojik örtüşme vardır (108). Bu nedenle günümüzde sendromik olan ya da olmayan şeklinde ikili yaklaşım yerine, eşlik eden fenotiplerin gözlenip gözlenmemesi ve genetik katkı veya neden tespit edilip edilmemesine dayanarak olguların kümelemesi daha uyum bir yaklaşım olarak önerilmektedir (109).

Ayrıca OSB ilişkili yüzlerce gen kromozomlarda rastgele dağılmamıştır. Bu genler beyinde kromatin yeniden düzenlenmesi, protein sentezi, protein parçalanması ve sinaptik fonksiyon gibi fonksiyonel olarak birbiriyle ilişkili biyolojik süreçlerde birlikte rol oynamaktadırlar. “Sistem biyolojisi”⁵⁹ ve “karmaşık ağlar”⁶⁰ yaklaşımları genlerin bu ilişkilerini çözmek için kullanılan yöntemlerdendir. Bu nedenle otizmin özgül genlerinin ötesinde anormal süreçlerine odaklanmak daha uygun bir strateji olarak görünmektedir.

Nadir varyantlar

Hem kalıtılan, hem de *de novo* olabilen nadir mutasyonlar, genel popülasyonda minör allel sıklığı %5'den daha az olan mutasyonlar olarak tanımlanmıştır. Bunlar “sendromik otizm” olarak adlandırılan ve Mendelyan kalıtım gösterenler⁶¹ (otizm tanılı bireylerin %5-10'unu oluşturur), kromozom anomalileri (~%5), hem kalıtılan hem de *de novo* nadir CNV'ler (~10) ve ekzom dizileme ile tespit edilen *de novo* veya kalıtılan nokta mutasyonlar (SNV'ler) şeklinde ortaya çıkabilir (110).

⁵⁸ Sendromik otizm: OSB belirtileri dismorfik, nöromüsküler, metabolik veya yapısal beyin anomalileri gibi ayırt edici klinik özellikleri de içeren sendromlara eşlik ettiği durumlarda bu kavram kullanılır.

⁵⁹ *systems biology*

⁶⁰ *complex networks*

⁶¹ Mendelyan kalıtım: tek genli (*monogenic*) kalıtım

Otizmle ilişkili nadir genetik ve genomik bozukluklar

1990'lı yıllarda FMR1⁶² geni ile ilişkili FXS (111), MECP2⁶³ geni ile ilişkili RTT (112) ve makrosefalinin eşlik ettiği PTEN⁶⁴ ilişkili bozukluklar (113) ve 2000'li yıllarda TSC1⁶⁵ (114) ve TSC2 (115) genleri ile ilişkili tüberoz skleroz kompleksleri (TSC) gibi tek gen bozukluklarında artmış oranda OSB riski gösterilmiştir. Bu bulgular, OSB'nin genetik etiyolojisi için doğrudan delil olmuştur. Ayrıca otizmin merkezi sinir sistemi (MSS) dışındaki klinik bulguları da içeren özgül genetik bozukluklar kapsamında da ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. Sendromların klinik görünümüne eşlik eden ve "sendromik otizm" olarak adlandırılan bu OSB'lere neden olan genlerin sayısı keşfedildikçe artmaktadır. OSB tanılı olguların yaklaşık %15'inin bilinen bir Mendelyan veya genetik sendromla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tek gen mutasyonları OSB olgularının yaklaşık %5-10'unda etken olarak görülmektedir (116). OSB tanılı bireylerde tek gen mutasyonu ile ilişkili en sık görülen genetik bozukluk olan FXS; olguların yaklaşık %2'sinde bulunmaktadır (117). TSC (OSB tanılı bireylerin yaklaşık %1'inde), RTT (yaklaşık %0,5), Nörofibromatozis (NF) (<%1) ve 22q13 delesyon sendromu (SHANK3⁶⁶ yaklaşık %0,5) diğer sık görülen Mendelyan kalıtılan sendromlardan bazılarıdır. Ayrıca OSB, Sotos, Cowden, Moebius, Smith-Lemli-Opitz ve Timothy sendromu gibi nadir görülen sendromlarla da birliktelik gösterir (116). Bazı genetik bozukluklara otizm bulgularının eşlik etme oranı yüksekken (ör. nadir görülen ancak nerdeyse tüm olgularda otizmin eşlik ettiği 2q23.1 mikrodelsiyon sendromu), bazılarında ise daha düşük penetrans görülmektedir (ör. PTEN ilişkili sendromlar ve NF gibi). Ancak yine de bu oran normal popülasyona göre yüksektir. OSB ile ilişkili bazı genetik sendromlar ve bozuklukların penetrans oranları Şekil 1'de verilmiştir. Şekilde de belirtildiği gibi DMD⁶⁷ geni ile ilişkili Duchenne müsküler distrofi ve NF1⁶⁸ geni ile ilişkili Nörofibromatozis 1'de penetrans oranı %5-8 arasında değişmekteyken; SHANK3 geni ile ilişkili Phelan-McDermid sendromu ve

⁶² FMR1: fragile X mental reterdation 1

⁶³ MECP2: methyl CpG binding protein 2

⁶⁴ PTEN: phosphatase and tensin homolog

⁶⁵ TSC1: tuberous sclerosis 1

⁶⁶ SHANK3: SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3

⁶⁷ DMD: *dystrophin*

⁶⁸ NF1: *neurofibromin 1*

CACNA1C⁶⁹ geni ile ilişkili Timothy sendromunda ise yaklaşık %80'dir. Bu genlerin ve fonksiyonlarının çalışılması OSB'nin patofizyolojisini anlamada katkı sağlayacaktır.

Ayrıca OSB tüm kromozomlardaki büyük yapısal değişikliklerle ilişkili bulunmuştur. Ancak büyük yapısal kromozom değişiklikleri nadir görülen anomaliler olduğu için OSB ile ilişkisini kanıtlamak zordur. İstisna olarak maternal kalıtılan 15q11-13 duplikasyonu (UBE3A⁷⁰ genine ev sahipliği yapan bu bölge aynı zamanda Prader-Willi/Angelman sendromu bölgesidir) ~%1'lik sıklıkla otizm tanılı bireylerde en sık karyotipik değişikliktir (118). Maternal 15q11-13 duplikasyonu aynı zamanda otistik popülasyondaki en yaygın CNV'ler arasındadır. Aynı duplikasyonun paternal olanı ise otizm için daha düşük riske sahiptir (119). Bu bölgenin hem dublikasyonu, hem delesyonu ve hem de UBE3A geninde oluşan tek gen mutasyonu OSB ile ilişkilidir (120). Ayrıca Down sendromu, Klinefelter sendromu (XXY), XYY ve XYYY sendromları gibi bazı kromozom anöploidilerinin⁷¹ de otizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte otizmle ilişkili 15q13.3 mikrolelesyon sendromu gibi mikrolelesyon sendromları da tanımlanmıştır. Tablo 2'de OSB ilişkili bazı sendromlar ve genetik bozukluklar gösterilmiştir.

CNV'ler 1 kilobaz (kb) veya daha büyük, duplikasyon, delesyon ve inversiyonları da içeren DNA segmentindeki herhangi bir yapısal varyantlardır. 2000'li yılların başında tanımlanmaya başlayan CNV'ler hem insanın popülasyondaki fenotipik çeşitliliğinden sorumlu yapısal genetik varyasyonlarla ilişkili olabileceği gibi, çok çeşitli Mendalyan özellikler ve nörogelişimsel bozuklukları da içeren çok sayıda hastalık ile de ilişkili olabilir (121). En yaygın yüksek çıktı CNV analizi yöntemi CMA'dır. OSB'de görülen *de novo* CNV'ler kontrollere göre 3 ila 7 kat daha fazladır ve simpleks ailelerde multipleks ailelere göre daha sık görülür (122). Ayrıca OSB tanılı probandda etkilenmemiş kardeşe kıyasla *de novo* CNV'ler dört kat daha sık ortaya çıkar (123). Diğer büyük örnek boyutlu aile-boyu CMA çalışmalarında ise otizm tanılı bireylerin %5-10'unu oluşturan, kalıtsal ya da *de novo* çok sayıda submikroskopik CNV saptanmıştır. Otizmle arasında güçlü ilişki gösterilmiş CNV'ler olgular arasında hem ekspresivite ve hem de pleiotropik etkilerinde farklılıklar göstermektedir.

⁶⁹ CACNA1C: *calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C*

⁷⁰ UBE3A: *ubiquitin protein ligase E3A*

⁷¹ anöploidi: normal kromozom sayısından sapma.

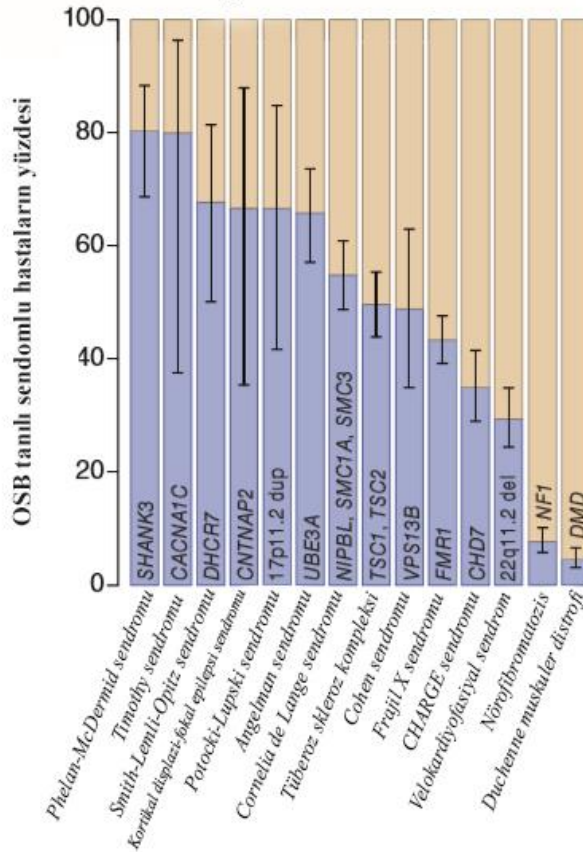
Tablo 2: OSB ile ilişkili bazı sendromlar ve genetik bozukluklar

Kromozom	Gen/Kromozom bölgesi	Sendromlar/İlişkili genetik bozukluklar
2	MBD5 (2q23.1)	2q31 mikrolelesyon sendromu (haploetersizlik)*
2	SOS1	Noonan sendromu**
5	NSD1	Sotos sendromu
7	CNTNAP2 (7q35)	Kortikal displazi-fokal epilepsi sendromu (OR ***)
7	RAF1	Noonan sendromu**
7	BRAF	Noonan sendromu**
8	CHD7 (8q12.2)	CHARGE sendromu
8	VPS13B	Cohen sendromu (OR)
9	TSC1	Tuberoskleroz kompleks
10	SMC3	Cornelia de Lange sendromu
11	DHCR7 (11q13.1)	Smith-Lemli-Opitz sendromu (OR)
12	CACNA1C (12p13.33)	Timothy sendromu
12	KRAS	Noonan sendromu**
14	PTEN	PTEN ilişkili bozukluklar / Cowden sendromu
15	UBE3A (15q11.2)	15q11-q13 duplikasyon sendromu (<i>genomik damgalanma****</i>)
15	UBE3A (15q11.2)	Angelman sendromu (<i>genomik damgalanma</i>)
15	15q13.2-q13.3	15q13.3 mikrolelesyon sendromu
15	MAP2K1	Noonan sendromu**
16	TSC2	Tüberozer skleroz kompleks
16	16p11.2	16p11.2 mikrolelesyonu *****
16	16p11.2	16p11.2 mikrodublikasyonu
17	17p11.2 duplikasyonu	Potocki-Lupski sendromu
22	SHANK3 (22q13.33)	22q13 delesyon sendromu/ Phelan-McDermid sendromu
22	TBX1 ve diğeri (22q11.21)	22q11 delesyon sendromu/DiGeorge sendromu/Velokardiyofasial sendrom

X	MECP2	Rett sendromu
X	FMR1	Frajl X sendromu (X'e bağıl*****)
X	SLC6A8 (Xq28)	Beyin kreatin transport eksikliği sendromu (X'e bağıl)
X	SMC1A	Cornelia de Lange sendromu (X'e bağıl)
X	DMD	Duchenne .muskuler distrofi sendromu (X'e bağıl)
	XXY	Klinefelter sendromu*****
	XXY	XXY sendromu*****
	Trizomi 21	Down sendromu*****

* *haploinsufficiency* ** Multilokus kalıtıma örnektir. *** OR: otozomal resesif kalıtılır. ****genomik damgalanma (*genomic imprinting*) kalıtım paterni gösterir. ***** X'e bağıl kalıtılır. ***** Bu CNV yaklaşık 25 gen içerir; OSB ilişkili genin KCTD13 olduğu düşünülmektedir (124). *****OSB'nin eşlik ettiği bazı anöploididler.

Penetrans **Genetik etiyolojisi bilinen sendromların OSB prevalansı**



Şekil 1: OSB ile ilişkili bazı genetik sendromlar ve bozuklukların penetrans oranları. Şekil orijinal makaleden değiştirilerek alınmıştır (11).

2000’li yılların başında NLGN3⁷² (Xq13.1), NLGN4X⁷³ (Xp22.32-p22.31) (125) ve SHANK2⁷⁴ (11q13.3) (126, 127) gibi çok sayıda sinaptik gende de nadir mutasyonlar ile seyreden sendromik olmayan OSB’ler ile ilişkili tek gen bozuklukları tanımlanmıştır. Bunun yanında idiyopatik otizmde CMA tekniği kullanılarak yapılan ilk büyük ölçekli CNV analizi çalışmasında NRXN1⁷⁵ (2p16.3) geninde ekilenmiş iki kardeşte delesyon saptanmıştır (128).

2000’li yılların başında NLGN3⁷⁶ (Xq13.1), NLGN4X⁷⁷ (Xp22.32-p22.31) (125) ve SHANK2⁷⁸ (11q13.3) (126, 127) gibi çok sayıda sinaptik gende de nadir mutasyonlar ile seyreden sendromik olmayan OSB’ler ile ilişkili tek gen bozuklukları tanımlanmıştır. Bunun yanında idiyopatik otizmde CMA tekniği kullanılarak yapılan ilk büyük ölçekli CNV analizi çalışmasında NRXN1⁷⁹ (2p16.3) geninde ekilenmiş iki kardeşte delesyon saptanmıştır (128).

Sendromik olmayan OSB’de en yaygın tekrarlayan CNV’lerden biri yaklaşık 550 kb’lık mikrolelesyon/mikroduplikasyon 16p11.2’dir ve olguların 0,8 kadarında bulunmaktadır (122, 129). OSB ile ilişkili diğer CNV’lere 15q11-q13, 15q13.3, 22q13.33 (SHANK3⁸⁰) ve Xp22.11 (PTCHD1⁸¹) örnek olarak verilebilir (127, 130). Bazı CNV’ler tek geni etkilerken (ör. SHANK delesyonları), bazı CNV’ler (ör. 16p11.2) ise birden fazla geni etkiler. OSB ile ilişkili bazı CNV’ler pleiotropik etkileri Tablo 3’de verilmiştir.

Günümüze kadar OSB’nin genetik ve genomik etiyolojisi ile ilgili çok sayıda büyük katılımlı ve konsorsiyumlara dayalı projeler geliştirilmiştir. Ayrıca WES ve WGS gibi yüksek çıktılı yöntemlerin otizm gibi heterojen nöropsikiyatrik bozukluklarda kullanılmaya başlanması da etiyolojinin aydınlatılmasında çığır açmıştır. Hem multipleks hem de simpleks ailelerde birden fazla nesil ile yapılan WES çalışmalarında AMT⁸², MECP2, NLGN4X, PAH⁸³, PEX7⁸⁴,

⁷² NLGN3: *neuroligin 3*

⁷³ NLGN4X: *neuroligin 4, X-linked*

⁷⁴ SHANK2: *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*

⁷⁵ NRXN1: *neurexin1*

⁷⁶ NLGN3: *neuroligin 3*

⁷⁷ NLGN4X: *neuroligin 4, X-linked*

⁷⁸ SHANK2: *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*

⁷⁹ NRXN1: *neurexin1*

⁸⁰ SHANK3: *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*

⁸¹ PTCHD1: *patched domain containing 1*

⁸² AMT: *aminomethyltransferase*

⁸³ PAH: *phenylalanine hydroxylase*

⁸⁴ PEX7: *peroximal biogenesis factor 7*

POMGNT1⁸⁵, SYNE1⁸⁶ ve VPS13B⁸⁷ genlerinde özgül mutasyonlar saptanmıştır (131). CMA ve WES teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte daha büyük kohort çalışmalarında da bazı ailelerin özel mutasyonlar⁸⁸ taşıdığı görülmüştür. Otizm Genom Projesi (AGP)⁸⁹ tarafından yürütülen 2.147 OSB tanılı bireyi içeren bir çalışmaya göre ise olguların %4,6'sının nadir *de novo* CNV taşıdığı saptanmıştır (132). Simons Simpleks Koleksiyonu (SCC)⁹⁰ çalışmalarında ise örnekler simpleks ailelerden toplandığı için *de novo* CNV oranı %10 kadar yüksek bulunmuştur (133). Multipleks ailelerden elde edilen örneklerle yapılmış Otizm Genetik Kaynak Değişimi (AGRE)⁹¹ çalışmasında ise hem *de novo* hem de kalıtılan CNV'ler gösterilmiş, ancak bu çalışmada *de novo* CNV oranı beklendiği üzere daha düşük bulunmuştur. Yani bir ailede OSB ile ilişkili *de novo* CNV'nin keşfi, aynı ailedeki ikinci bir etkilenen çocuğun farklı genetik ve çevresel risk etkenleri kümesi barındırma ihtimalini dışlamaz. AGP ve SCC verileri birleştirildiğinde OSB ile ilişkili 1q21, 2p16, 3q29, 7q11.23, 15q11-q13, 15q12, 15q13, 16p11, 16q23 ve 22q11'yi içeren 12 lokus tanımlanmıştır (107).

Bazı nadir varyantlar ise tek nükleotid mutasyonu ile meydana gelebilir. Bunun en tipik örneği SHANK3 geninde mutasyon sonucu oluşan bir sendromik otizm formu olan Phelan-McDermid sendromudur. Aynı zamanda pleiotropik etkinin bir göstergesi olarak SHANK3 (22q13.3) geninde (134) patolojik nokta mutasyonları ile seyreden sendromik olmayan otizm olgularına da tanımlanmıştır (135). Benzer özellikte mutasyonlar OSB'nin eşlik ettiği CNTNAP2⁹², Nöroliginler ve Nöreksinler için de tanımlanmıştır (136, 137).

⁸⁵ POMGNT1: *Protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase*

⁸⁶ SYNE1: *Spectrin Containing Nuclear Envelope Protein 1*

⁸⁷ VPS13B: *Vacuolar protein sorting 13 homolog B*

⁸⁸ *Private mutations*: bir birey, aile veya popülasyona özgü nadir veya biricik mutasyonlar

⁸⁹ AGP: *Autism Genome Project*

⁹⁰ SCC: *Simons Simplex Collection*

⁹¹ AGRE: *Autism Genetic Resource Exchange*

⁹² CNTNAP2: *contactin associated protein-like 2*

Tablo 3: OSB ile ilişkili bazı önemli CNV'ler

Lokus	Aday gen	dup/del*	nöropsikiyatrik pleiotropi	somatik pleiotropi
1q21.1	RBM8A	<i>dup</i>	ZY, şizofreni, BB**	epilepsi, makrosefali, kalp hastalıkları
2p16.3	NRXN1	<i>del</i>	ZY, şizofreni	hipotoni, epilepsi, makrosefali
3q29	DLG1 ve diğerleri	<i>del</i>	ZY, şizofreni, BB	GİS problemleri, kalp hastalıkları, dismorfik özellikler
7q11.23	GTF2I, STX1A	<i>dup</i>	ZY, DEHB	epilepsi, makrosefali, kalp ve böbrek anomalileri
11q13.3-q13.4	SHANK2	<i>dup</i>	ZY	epilepsi
15q13.3	CHRNA7 ve diğerleri	<i>del</i>	ZY, şizofreni	epilepsi
15q11.2-q13.1	-	<i>dup</i>	ZY, şizofreni	hipotoni ve epilepsi
16p11.2***	-	<i>del/dup</i>	ZY, BB, şizofreni	nöbetler, hipotoni, tremor
22q11.2	-	<i>dup</i>	ZY	hipotoni, büyüme geriliği
22q11.2	-	<i>del</i>	ZY, şizofreni, BB	kalp hastalıkları, damak anomalileri
22q13.3	SHANK3 ve diğerleri	<i>del</i>	ZY	epilepsi, kalp hastalıkları, böbrek anomalileri
Xp22.11	DDX53, PTCHD1	<i>del/dup</i>	ZY	
Xp22.32-p22.31	NLGN4X	<i>del/dup</i>	ZY, DEHB	
Xq13.1	NLGN3 ve diğerleri	<i>del/dup</i>	ZY	

dup/del*: duplikasyon/delesyon **BB: Bipolar bozukluk *OSB'de yaklaşık %0.8 sıklıkta görülen en sık CNV'lerden biridir. *

Otizm etiyolojisi le diğer nörogelişimsel bozukluklar ve diğer hastalıkların ilişkisi

Otizme yol açtığı bilinen genetik ve genomik nedenlerin pek çoğunun diğer nörogelişimsel bozuklukların etiyolojisinde de rol oynadığı bilinmektedir. Bunlardan birisi ZY'dir ve otizm etiyolojinde gösterilen genetik varyantların hepsi ZY etiyolojisinde de gösterilmiştir. Bu da bu iki nörogelişimsel bozukluğun ortak genetik temeli paylaştığını düşündürür. X kromozomunda ZY ilişkili tanımlanmış X'e bağlı çok sayıda genin nerdeyse büyük bir kısmı otizmle de ilişkili bulunmuştur. Bunlardan FXS ve RTT sık görülenlerdendir. 17q21.31 mikrodelsiyon sendromu, 1q21.1, 15q13.3, 16p13.11 gibi otozomal genlerle ilişkili ZY'ye neden olan CNV'lerin de otizmle ilişkili olduğu gösterilmekle birlikte, nörogelişimsel bozukluklarda aynı varyantın her zaman aynı fenotiple kliniğe yansımayacağını unutmamak gerekir (138). Yine FXS, TSC, RTT gibi sendromlara epilepsi eşlik edebilmekle beraber, X'e bağlı Rett benzeri fenotiple ilişkili CDKL5⁹³ ve PCDH19⁹⁴ geni mutasyonlarında da infantil spazm ve ZY'nin yanında otizm bulgularının görülebildiği gösterilmiştir (139). Joubert sendromu, 15q13.3 ve 16p13.11 delesyonu ve daha pek çok genetik bozukluk ZY ve otizm yanında epilepsi açısından da artmış riske sahiptir. Etiyolojide gösterilen CNV'in önemli ölçüde ZY ve epilepsinin yanında diğer psikiyatrik hastalıklarla da örtüştüğü dikkat çekmektedir. Örneğin 1q21.1 duplikasyonu ZY ve epilepsi yanında şizofreniye de yol açabilir (109). Metabolik sendromlar nadir görülmekle ve OSB'nin küçük kısmında görülmekle birlikte potansiyel olarak tedavi edilebilir olduğu için önemlidir. Fenilketonüri, serebral kreatin eksikliği sendromları, kreatin transporter eksikliği bunlardan yalnızca bazılarıdır (140).

Yaygın varyantlar

Yaygın varyantlar genel popülasyonda %5'den sık olan tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP)⁹⁵ ve GWAS çalışmalarında otizm ile ilgili bazı önemli SNP'ler tanımlanmıştır. SNP'ler genomun tamamında bulunan, kişiler arasında değişkenlik gösteren tek nükleotid değişiklikleridir ve insanlardaki varyasyonların yaklaşık %90'ından sorumludur. SNP'ler genomda protein kodlayan ekzon bölgelerinde, protein kodlamayan intron bölgelerinde veya genler arasındaki tekrarlayan nükleotid dizilerinde bulunabilir. Dört farklı etnik popülasyonun

⁹³ CDKL5: *Cyclin Dependent Kinase Like 5*

⁹⁴ PCDH19: *Protocadherin 19*

⁹⁵ SNP: *Single nucleotide polymorphism*

SNP'lerinin katologlanması amacıyla Uluslararası HapMap projesi⁹⁶ yürütülmüştür (141). Bu projeden aşağıda “İnsan Genom Projesi (HGP) ve İlişkili diğer projeler” başlığı altında daha detaylı bahsedilmiştir. SNP analizi tüberküloz, ülseratif kolit, bipolar bozukluk (BB), hipertansiyon gibi yaygın hastalıkların araştırılmasında kullanılmaktadır (88). Sağlıklı insanlarda da kanser ve diyabet gibi birçok hastalık için risk tespitinde veya kanser gibi hastalıklarda hastalığın biyolojik seyrinin tahmin edilmesinde önemlidir (87). Genel olarak herhangi bireyin tüm genomundaki 3 milyon genetik varyantın yaklaşık 20.000'i ekzon dizisinde bulunur. Bu varyantların çoğu kalıtsaldır ve genel popülasyondaki normal varyasyona karşılık gelir (142). SNV'ler ise hem nadir (<0%1) hem de yaygın tek nükleotid varyantlarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (103). Nesil başına genomda yaklaşık 75 *de novo* SNV ortaya çıkar ve bunların çoğu kodlamayan dizide ortaya çıkar. Ortalama olarak her yenidoğanın kodlayan bölgelerini etkileyen bir ya da iki SNV taşıdığı tahmin edilmektedir (143).

Yaygın varyantlar açısından GWAS çalışmalarında 5p14.1 (144), 5p15.2 (145), 20p12.1 (146), 9q35 (147) ve 1p13.2 bölgelerinde (148) bazı önemli risk lokusları tanımlanmış olmakla birlikte bunların hiçbirinin etki boyutu şizofrenidekinin tersine nedensel olarak kabul edilebilecek kadar büyük değildir (149). Risk üzerinde önemli bir etkisi olan (RR >1,5) varyantın olmadığı, orta derecede etkiye sahip (RR: 1,2-1,5) henüz tanımlanmamış az sayıda yaygın varyantın olduğu düşünülmektedir. Oysa ılımlı risk artışı yapan (RR <1,2) çok sayıda varyantın olduğu düşünülmektedir (150) ve bu varyantları ortaya çıkarmak için on binlerce örneğin yer aldığı çalışmalara ihtiyaç olduğu öngörülmektedir (151). Yine de bu çalışmalar TRIM33⁹⁷, MACROD2⁹⁸ gibi yeni genlerin haritalanmasında fayda sağlamıştır (100). Tüm yaygın varyantların kümülatif etkisi düşünüldüğünde ise toplam riskin %15 ila %50 arasında olduğu düşünülmektedir (152, 153).

Otizm Spektrum Bozukluğu fenotip alt tipleri

OSB erken gelişim döneminde ortaya çıkış şekline göre çeşitlilik gösterir. Buna göre geleneksel olarak; belirtilerin ilk yılda ortaya çıkmaya başladığı ve yaşla birlikte daha belirgin hale geldiği “erken başlangıçlı tip” ile ilk 1-2 yıl normal gelişim görülmesine rağmen

⁹⁶ Uluslararası HapMap Projesi: *International HapMap (Haplotype mapping) Project*

⁹⁷ TRIM33: *Tripartite Motif Containing 33*

⁹⁸ MACROD2: *MACRO Domain Containing 2*

sonrasında kazanılan becerilerin kaybedildiği ve OSB'nin karakteristik özelliklerinin sergilendiği “gerileyici (regresif) tip” olacak şekilde ikiye ayrılır. Ancak bu ayrım çok basit bir ayrımdır. Çünkü otistik davranışta geniş ölçüde farklılıklar olduğu gibi, otizm tanılı bireylerin bireysel gelişimsel eğrilerinde de geniş çapta varyasyonlar vardır. Çünkü nöronal gelişimin sayısız ve karmaşık süreçleri göz önüne alındığında (ör. nörogenesis, migrasyon, bölgeselleşme, sinaptogenez, sinaptik budanma uzun ve kısa vadeli nöronal bağlantılardaki değişiklikler) tipik olmayan davranışların çok çeşitli şekillerde ortaya çıkabileceği açıktır (154). İkincisi, tipik olmayan özellikler sürekli değişen bir toplumsal ve fiziksel çevre ile bireyin gelişmekte olan etkileşimlerinde ifade edildiğinden tecrübeler de tipik değildir; bu da devam eden nöronal gelişimi etkiler (155). Sinir sistemi ve davranışın yaşam boyunca gelişip değiştiği süreçler, diğer bir deyişle çift yönlüdür; sinir sistemi gelişen davranış, gelişen davranış da sinir sistemini etkiler.

Bazı genetik çalışmalar ise duyarlı genetik lokuslar ile OSB'nin alt fenotiplerine odaklanmıştır. Örneğin, 3p12.3 bölgesi (156) ve 7q35 bölgesi (157) gecikmiş dil kazanımı ile ilişkili bulunmuştur. Bunun yanında yüksek fonksiyonlu OSB olgularında ARNT2⁹⁹ geninde bir varyant (rs17225178) saptanmıştır (158). 3q29 bölgesindeki rs789859 varyantı ise hem OSB hem de öğrenme güçlükleri ile ilişkili bulunmuştur (159).

2.10.2. Perinatal ve çevresel etkenler

Çevresel etkenlerin OSB gelişimi için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Çevresel etkenler, hem DNA hasarına neden olarak; örneğin doğrudan oksidatif DNA hasarı yoluyla veya dolaylı olarak DNA tamir mekanizmalarının çalışmasına engel olarak *de novo* DNA mutasyonlar oluşturarak (160), hem de DNA yapısını bozmadan epigenetik mekanizmalara etki ederek otizm riskini arttırabilir. Çevresel etkenlerin gen ekspresyonunu etkileyebileceği bilinmesine rağmen bu konudaki doğrudan kanıtlar sınırlıdır ya da tutarsızdır ve etki mekanizmaları bilinmemektedir. Bilinen çevresel risk etkenler ise çoğunlukla OSB riskinde ılımlı artışlar ile ilişkilidir (161). Bu etkenlerden biri ebeveyn yaşıdır. 35 yaş üzerindeki annelerin OSB tanılı bir çocuğa sahip olma riski daha genç annelere göre 1,5 kat daha fazladır. Bu oran baba yaşı için daha da fazladır. Çünkü kendiliğinden oluşan *de novo* genetik

⁹⁹ ARNT2: *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2*

mutasyonlar, ağırlıklı olarak baba kaynaklıdır (162). Gestasyonel diyabeti ve kanamayı içeren gebelik komplikasyonları artmış OSB riski ile ilişkilendirilmiştir. Gebelikte valproik asit (epilepsi tedavisinde kullanılan), psikoaktif ilaçlar ve pestisid gibi kimyasallara maruz kalmak da OSB ile ilişkilendirilmiştir (163). Prenatal viral enfeksiyonların da otizm ile ilişkili olduğu düşünülse de bu annenin ve fetüsün bağışıklık durumu, virüsün tipi ve fetal gelişim evresi gibi pek çok diğer etkene bağlıdır. Gebelikte yüksek düzeyde strese maruz kalan annelerin çocuklarında da risk artışı saptanmıştır (164). Bunun yanında nikel, kadmiyum, trikloroetilen ve civa gibi maddeler de etiolojide suçlanmakla birlikte bu maddelerle ilgili henüz yeterli kanıt bulunamamıştır (160). 1988'de Wakefield ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada aşılardan otizm ile ilişkili olduğunu iddia edilmiş, ancak çalışma verilerin değiştirildiğinin tespit edilmesi üzerine çalışma yayınlandığı dergi olan *Lancet* tarafından resmi olarak geri çekilmiştir (165). 2014 yılında 1.256.407 çocuğu içeren beş olgu-kontrol çalışması ile 9.920 çocuğu içeren beş kohort çalışmasının meta-analiz sonuçlarına göre Kızamık-Kızamıkçık-Kabakulak (KKK) aşılması, çoklu aşılama, kombine aşı uygulamaları ve *thimerosal* maruziyeti ile otizm arasında ilişki olmadığı kanıtlanmıştır (166). Son yıllarda D vitamini eksikliği ile OSB arasında ilişki olduğunu iddia eden bulgular olsa da bu konu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (167). Gebelikten önce ve erken gebelik döneminde folik asit kullanımının ise koruyucu olduğu düşünülmektedir (168). Bunun yanında gebelikte ve gebelik öncesinde antidepresan maruziyeti çocukta artmış otizm riski ile ilişkili bulunmuştur. Bu durumun antidepresan kullanımından ziyade maternal ruhsal hastalıklar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (169).

2.10.3. Gen-Çevre etkileşimleri

Otizmde gen çevre etkileşimi, ilk olarak perinatal komplikasyonlar için önerilmiştir. Etkilenmemiş kardeşlerin prenatal ve perinatal komplikasyonlarının etkilenmiş kardeşlere göre daha az, kontrol grubuna göre ise daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu da otizm tanılı bireylerin benzer çevresel etkenlere kardeşlerine kıyasla farklı tepki gösterdiğini ve bu etkenlere daha az toleranslı olduklarını ortaya koymuştur (170). Hava kirliliğinin araştırıldığı bir çalışmada MET¹⁰⁰ geni ile prenatal hava kirliliğine maruz kalma arasındaki ilişkiye bağlı olarak OSB riskinde artış olduğu gösterilmiştir (171). *C. elegans* ile yapılan bir çalışmaya göre, Nöroligin eksikliği olan mutantların oksidatif strese karşı aşırı duyarlı olduğu, (172) bir başka çalışmada

¹⁰⁰ MET: *Proto-oncogene, receotor tyrosine kinase*

ise MECP2 eksikliği olan farelerin hipoksiye daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Başka bir hayvan çalışmasına göre, prematüre beynin en önemli patolojisinin sinaptik gelişimin bozulması olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sinaptik gen kusurlarının, çevresel etkenlerle etkileşerek otizm riskini arttırdığı düşünülmektedir. Diğer bir hipotez ise antioksidan etkisi *in vitro* olarak pek çok kez gösterilmiş olan melatonin hormonu ile ilgilidir. Hayvan çalışmalarına göre melatonin yenidoğanları fetal distress ve enfeksiyona karşı korumaktadır. OSB tanılı bireylerde melatonin metabolizmasının bozuk olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu da melatonin yollarındaki genetik varyasyon ve oksidatif stres arasındaki ilişki ile açıklanmaktadır (173). Gen-çevre etkileşimi ile ilgili kanıtları sağlayan bir çalışmalardan biri de, TSC2 haploetersiz farelerdir. Bu fareler, yalnızca maternal immun aktivasyona maruz kaldıklarında anormal toplumsal davranış göstermektedir (174). Benzer bir ilişki DISC-1¹⁰¹ geni için de gösterilmiştir (175). Farklı bir çalışmada annenin gebeliğinde sigara kullanımı ile SLC6A4¹⁰² genindeki bir polimorfizmin toplumsal iletişim problemlerinin artışı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (176). Gen-çevre etkileşimi için bu bulgular oldukça önemlidir ve daha fazla popülasyon temelli ilişki araştırmalara ihtiyaç vardır. *The Autism Birth Cohort* (ABC) ise gebelikten 7 yaşına kadar takip edilen 100.000 çocuk ve ebeveynlerini içeren bir çalışmadır. Çalışmanın uzun dönem sonuçlarının gen-çevre etkileşimini anlamada değerli olacağı düşünülmektedir (177).

2.10.4. Epigenetik etkenler

Epigenetik, primer DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Bunlar hem genetik mutasyonlar hem de çevresel etkenlere bağlı olarak ortaya çıkabilen DNA metilasyonu ve asetilasyonu, histon modifikasyonu gibi düzenlemelerdir (81). On binlerce transkripsiyonel ünite ve yoğunlaşmış kromatin kümeleri ile diğer epigenetik düzenlemeleri içeren epigenom organizmanın farklı hücre tiplerinde ve farklı gelişimsel evrelerinde farklı farklı düzenlenir. Otizmle ilgili pek çok epigenetik düzenleme gösterilmiştir. Örneğin, X kromozomunda bulunan ve RTT ile ilişkili MECP2 geninin kodladığı sinaptogenez ve uzun vadeli plastisitede önemli olan MeCP2 proteini metile DNA'ya bağlanır ve transkripsiyonu baskılar (178). Ayrıca OSB'de MECP2 mutasyonu çok nadir olmasına rağmen

¹⁰¹ DISC1: *Disrupted in schizophrenia 1*

¹⁰² SLC6A4: *Solute carrier family 6 member 4*

MECP2 ekspresyonunun hastaların %79'unda önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (179). Otizmde genomik damgalanmaya¹⁰³ uğrayan pek çok kromozom bölgesi gösterilmiştir. Bu bölgelerden biri olan 15q11.2-q13 bölgesinin mikrodublikasyon ve mikrodelesyonları otizmle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bölgede bulunan GABRB3¹⁰⁴ geni, Gamma-aminobütirik Asit (GABA)¹⁰⁵ nörotransmitterinin düzenlenmesinde ve SSS'nin gelişiminde önemli olan GABA_A reseptörünün bir subunitini kodlar. Bu gen genomik damgalanma bölgesinde bulunmasına rağmen genelde biallelik ekspresyon gösterir. Ancak OSB tanılı bireylerde monoallelilik eksprese olduğu gösterilmiştir (180). Angelman sendromu geni olarak bilinen UBE3A geni ise GABRB3'ün aksine genomik damgalanmaya uğrar. Bu gen sinaptik plastisite ve beyinde deneyim bağımlı değişikliklerde önemlidir. UBE3A geninin damgalanma özelliğini kaybetmesi *antisense* RNA üretimi ile sonuçlanır ve bu RNA da genin kendi mRNA'sına bağlanarak translasyonu baskılar. Bu kanıtlar GABRB3 ve UBE3A genlerinin epigenetik düzenlenmesinin otizm etiyojisinde önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca MeCP2 proteininin UBE3A ve GABRB3 genlerinin epigenetik düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (179). Bazı çalışmalarda DNA metilasyonu ile ilgili genlerdeki polimorfizmler ile otizm arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (181, 182). Wong ve arkadaşlarının 50 MZ diskordant ikizle yaptığı çalışmada, DNA genel metilasyon paternleri ikizler arasında benzer olmasına rağmen, OSB ilişkili özgül DNA metilasyon bölgelerinde farklılıklar saptamıştır (183). Ayrıca otistik hastaların lenfoblastoid hücrelerinde *RORA*¹⁰⁶ ve *BCL-2*¹⁰⁷ genlerinin ekspresyonunda azalmaya neden olan DNA metilasyon profillerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (184). Güncel bir postmortem beyin çalışmasında ise hem sendromik hem de idiyopatik otizm tanılı bireylerden oluşan heterojen bir grubun %68'den fazlasında ortak DNA asetilasyon paterni gösterdiği saptanmıştır (185). NGS yöntemlerinden WES ile OSB etiyojisinde önemi ortaya konmuş genlerden biri CHD8'dir. CHD8 β -katenin'e bağlanan ve Wnt sinyalizasyonu negatif olarak düzenleyen transkripsiyonel baskılayıcıdır. Ayrıca CHD8 mutasyonlarının otizm tanılı olguların %5'inden azında görülmesine rağmen CHD8 bağlanma hedeflerinin diğer otizm risk genleri için güçlü bir biçimde zenginleştiği görülmektedir. Bu da genlerin bozulmasında ortak

¹⁰³ *genomic imprinting*

¹⁰⁴ GABRB3: *Gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 subunit*

¹⁰⁵ GABA: *Gamma-Aminobutyric Acid*

¹⁰⁶ RORA: *Retinoic acid-related orphan receptor alpha gene*

¹⁰⁷ BCL-2: *B-cell lymphoma 2*

biyolojik süreçlerin rol oynadığını düşündürmektedir (103). Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan bir nükleozom yeniden düzenlenme sistemi olan BAF kompleksinin bir bileşeni olan ARID1B¹⁰⁸ geninin haployetersizliği, korpus kallozum anomalileri ve otistik özellikler ile ilişkilendirilmiştir (186)

Bilinen çevresel etkenlerin etkisi ile ortaya çıkan epigenetik değişikliklere ise *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve ovülasyon indüksiyonu sonucu damgalanmış genlerin düzenlenmesinde bozukluk ve anormal metilasyon profilleri örnek olarak verilebilir (187). Ancak yardımcı üreme yöntemlerinin kullanımı ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonuçları tutarsızdır (188). Yukarıda “Perinatal ve çevresel etkenler” başlığı altında bahsedilen valproik asit gibi “histon deasetilaz” inhibitörlerinin otizmle ilişkili bazı genlerin ekspresyonunu azalttığından bahsedilmiştir (189).

2.10.5. Nörobiyolojik etkenler

Elektrofizyolojik, fonksiyonel nörogörüntüleme (dinlenme durumu ve taska dayalı bağlantılar), yapısal nörogörüntüleme (beyaz madde hacmi ve mikroyapısal özellikler) ve moleküler genetik (hücre adezyon molekülleri sinaptik proteinler ve eksitator-inhibitör dengesizliği) çalışmalarından gelen kanıtlar, otizmde tipik olmayan beyin bölgelerinden ziyade tipik olmayan nöronal bağlantılar olduğunu göstermiştir. Azalmış fronto-posterior ve artmış parieto-okspital bağlantılar, azalmış uzun bağlantılar ve artmış kısa bağlantılar ve temporal bağlanma bozuklukları, bu tipik olmayan bağlantılar ile ilgili kanıtlardır (190).

Otizmin sık görülen nöroanatomik özelliği 6. ve 24. aylar arasındaki erken yaygın beyin büyümesidir ancak bu büyümenin yaşla birlikte azaldığı saptanmıştır (191). Amigdala hacmi çocukluk çağında büyük saptanmakla birlikte, ergenlikle birlikte böyle bir farklılık bulunamamıştır. Meta-analiz çalışmalarının sonucuna göre beyinde hem gri madde (ör. amigdala, hipokampus ve prekuneus) hem de beyaz madde (ör. arkuat ve uncinat fasikül) yapılarında ömür boyu tutarlı nöroanatomik farklılıklar olduğu saptanmıştır (192, 193). Korpus kallozum hacminde bir azalma da oldukça tutarlı bir bulgudur (194). Diğer pek çok bulgu yaşa bağlıdır ve gelişimsel değişimin önemini göstermektedir (195).

¹⁰⁸ ARID1B: AT-rich interaction domain 1B

OSB tanılı bireylerde beyinde mikroskobik değişiklikler de bildirilmiştir. Postmortem çalışmalar, amigdala, fusiform girus ve serebellum gibi beyin bölgelerinde hücre sayısında azalma ve kalıcı nöroinflamasyonun işaretlerine rastlamıştır. Ancak bu doku örneklerin çoğu daha büyük çocuklar, ergenler ve yetişkinlerden elde edilen örneklerdir. Daha küçük çocuklarla yapılan bir çalışmada ise prefrontal kortekste nöron sayısında azalmadan ziyade önemli oranda artış olduğunu göstermiştir (196). Ayrıca kortikal minikolumnların boyutunda azalma, nöronal yoğunluğunda artış ve hücre dağılımında artış olması gibi bulgular atipik sinaptogenez ve dengesiz ekstatör-inhibitör oranı ile olasılıkla ilişkili görünmektedir (197).

İmmünolojik anormallikler otizm tanılı bireylerde ve ailelerinde artmıştır. OSB tanılı bireylerde bu değişmiş immun süreçler, sürekli aktif nöroinflamasyon, artmış proinflamatuvar sitokinler ve değişmiş hücrel immun fonksiyonlar ile nörogenezis, proliferasyon, sinaptogenez ve sinaptik budanma gibi nörogelişimsel süreçleri etkileyebilir (198). Anneden gelen IgG antikoru fetal beyini etkileyerek bazı olgularda patojenik olabilir (199). Ayrıca OSB tanılı bireylerde GİS problemlerinin sık görülmesinin yanında, bağırsak geçirgenliği ile mikroflora bileşimi ve toplumsal davranış değişiklikleri arasında ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Bunun da bağırsak-beyin bağlantısının bir parçasını oluşturan ağlardan biri olan immun sistem fonksiyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada OSB tanılı çocuklar ve kontrollerde bağırsak mikrobiyotik bileşimleri arasında belirgin farklılıklar olduğu bulunmuştur (200). Genetik açıdan da CLDN15¹⁰⁹ ve OCLN¹¹⁰ gibi genlerin ekspresyonundaki varyasyonlar ve ilave olarak sitokin profilleri bazı OSB alt tiplerinde düşünülen “sızdıran bağırsak” teorisini güçlendirmektedir. Bir diğer örnek de immun sistemi de içeren birtakım hücrel yolları düzenleyen MET reseptör tirozin kinazı kodlayan MET geninin rs1858830 C allelinin OSB alt tiplerinden GİS disfonksiyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca birçok transkriptom analizi çalışmasında da immun ağlarla ilişkili genlerin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiş ve bu artışın çevresel bir tetikleyici ile ilgili olduğu düşünülmüştür (100). Nöroimmunolojik mekanizmalar otizmin patofizyolojisinde önemli rol oynayabilir ancak açığa kavuşturulması gereklidir.

¹⁰⁹ CLDN15: *Claudin 15*

¹¹⁰ OCLN: *Occludin*

OSB’de kanda hiperserotoninemi (201), beyin serotonin sentez aktivitesinde artış (202), eksitator Glutamat / inhibitör GABA oranlarında artış (203), GABA sentez enzim ve reseptörlerinde azalma (204) gibi nörotransmitter sistemlerinde tutarlı değişiklikler bildirilmiştir. Toplumsal davranışlar, bağlanma ve stereotipik davranışlarla ilişkili olduğu düşünülen oksitosin sistemi de araştırmalarda çalışılmakta, hatta oksitosin otizmin çekirdek belirtilerinin tedavisinde de denenmektedir (205). Androjen ve östrojen gibi cinsiyet hormonları da çalışmalarda araştırılmakta, fetal testosteron seviyeleri ile otizm belirtilerinde ilişki olduğunu ileri sürülmektedir (206).

2.11. Otizm genetiğinde tanı yöntemlerinin evrimi

1970’lerden sonra kromozomların karyotipleme ile tanımlanması ile translokasyonların yanında büyük delesyon ve duplikasyonlar da (genellikle >5 mb) keşfedilmeye başlanmıştır. Yöntemsel gelişmeler sayesinde tekniğin çözünürlüğü daha küçük genetik dengesizliklerinin de saptanabilmesini sağlayacak şekilde artmıştır. Ek olarak genetik hedeflere hibridize olan DNA problemlerinin kullanımı (FISH)¹¹¹, önceden belirlenmiş kromozomal bölgelerdeki küçük sapmaların tespiti için kullanılmıştır. Karyotipleme ve FISH yöntemlerinin kullanımı ile OSB’nin genetik heterojenitesi hakkında ilk bulgular elde edilmeye başlanmıştır. 2006 yılında OSB tanılı bireylerle ilgili sitogenetik bağlantı ve ilişkilendirme çalışmalarının bir derlemesinde kromozom 7, 15q11-q13 ve 5p14 gibi çoklu bölgelerde örtüşme olduğu saptanmıştır (207). Bir sonraki önemli buluş ise dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH)¹¹² ve SNP genotipleme içeren CMA yönteminin gelişmesidir. CMA, FISH’in özgül hedef niteliğinin aksine, genomda eş zamanlı test yapmayı sağlar ve sapmaları çok daha yüksek seviyede tespit edebilir. CMA testinin karyotiplemeden daha üstün ve daha maliyet etkin olduğu gösterilmiştir (208, 209). Bu nedenle Amerika Tıbbi Genetik ve Genomik Cemiyeti (ACMG)¹¹³, Uluslararası Standart Sitogenomik Dizi Konsoorsiyumu (ISCA, ClinGen olarak bilinen)¹¹⁴, Amerikan Pediatri Akademisi (AAP)¹¹⁵ ve Amerikan Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Akademisi (AACAP)¹¹⁶ klavuzlarında CMA’yı gelişimsel bozukluklu veya OSB tanılı çocuklar

¹¹¹ FISH: *fluorescence in situ hybridization*

¹¹² aCGH: *array comparative genomic hybridization*

¹¹³ ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

¹¹⁴ ISCA: *the International Standard Cytogenomic Array Consortium*

¹¹⁵ AAP: *the American Academy of Pediatrics*

¹¹⁶ AACAP: *the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*

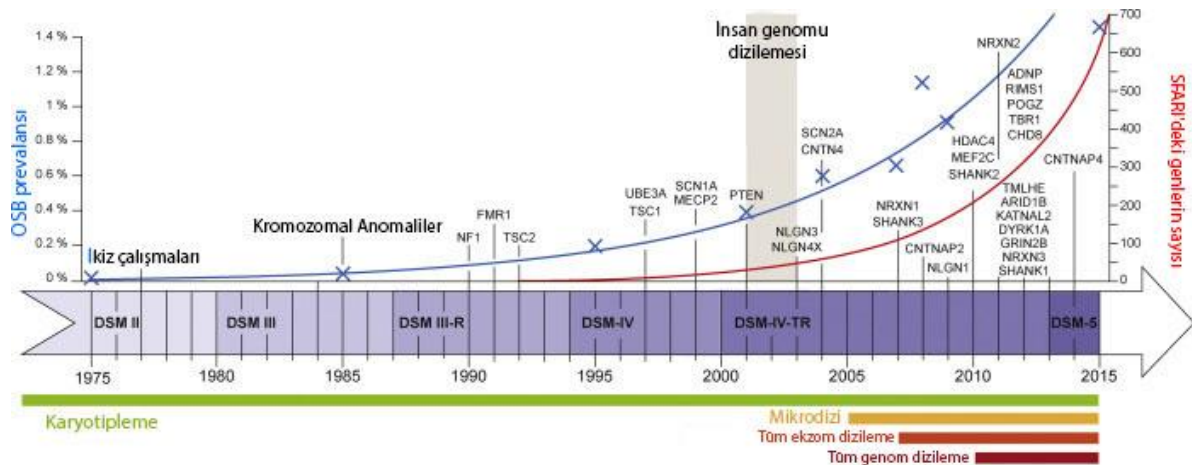
için ilk seçenek değerlendirme aracı olarak önermektedir (208-211). Ayrıca ACMG ve AAP uygulama kılavuzları otizmden şüphelenilen her erkek çocukta ve aile öyküsü veya uyumlu fenotipi olan kız çocukta FXS sendromu için DNA testi önermektedir (211, 212).

Son yıllarda WGS ve WES gibi NGS yöntemleri ile SNV'lerin tanımlanması seçici genotiplemeye alternatif haline gelmiştir. CMA yöntemleri OSB ile birlikte ortak genetik temelleri paylaşan diğer nörogelişimsel bozukluklar ile ilgili çeşitli CNV'leri saptayabilirken; NGS yöntemleri diğer nörogelişimsel bozukluklarla ilişkili olmayan yalnızca otizmle ilişkili CNV'leri de tanımlayabilmesi açısından üstündür (213). WES ve WGS'nin OSB ve diğer nöropsikiyatrik bozukluklarda gelişmekte olan kullanımı, dana önce belirlenen CNV'lerin yanı sıra, büyük etki boyutlu¹¹⁷ (küçük insersiyon ve delesyonlar da dahil) birçok yeni varyantın tanımlanmasını sağlamıştır. Bu tür “yeni”¹¹⁸ varyantlar bozuklukların risk tahmini, tanısı ve tedavisi için oldukça önemlidir.

Genetik danışmanlık ise OSB etiyolojisinde saptanan varyantların farklı ekspresivite, pleiotropik etkileri tam olmayan penetransları göz önüne alındığında yineleme oranlarını saptamada ortaya çıkan güçlük nedeniyle oldukça zorlayıcı olmaktadır. 22q11.2 gibi pleiotropik etkileri iyi gösterilmiş bazı CNV'ler penetransı nerdeyse tam iken, 16q11.2 gibi pleiotropik etkileri olan diğer bir CNV'nin sağlıklı kardeşler veya ebeveynlerde de gösterilmiş olması genetik danışmanlık açısından ikilem oluşturmaktadır. Sonuçların yorumlanmasında ve danışmanlık sağlanmasında bu ve benzeri komplikasyonlar dikkate alındığında “genom boyu” test, hastanın ve ilgili aile bireylerinin detaylı bir aile öyküsü ve dismorfoloji muayenesini içeren kapsamlı bir tıbbi genetik değerlendirme ile birlikte yapılmalıdır (214).

¹¹⁷ *effect size*

¹¹⁸ *novel*



1990 yılında başlayıp 2003 yılında biten projenin ilk insan DNA dizisi 2001 yılında yayınlanmıştır (218, 219).

HGP'nin sonlanmasıyla beraber genlerin kromozomlar boyunca homojen dağılmadığı, genlerden zengin kümeler ve genlerden fakir kümelerin yan yana yer aldığı ortaya çıkmıştır. Genden fakir bölgeler genomun yaklaşık %20'sine denk gelmektedir. İnsan genomunun yalnızca %2'sinin gen sentezine katıldığı ve tahmin edilen 100.000 gen yerine yalnızca yaklaşık 20.000 geni kodladığı saptanmıştır. Basit nematodlara eşit olan bu sayı bilim insanlarını şaşırtmak ile beraber onları organizmanın karmaşıklığının nereden kaynaklandığı konusunda araştırmaya itmiştir. Sonradan bu genlerin bir kısmının mRNA'nın alternatif kırılmasıyla ¹²² farklı proteinlerin yapımında kullanıldığı anlaşılmış; bu da merkezi dogmanın bir parçası olan “tek gen tek protein” hipotezinin gözden geçirilmesini gerekli kılmıştır. Ayrıca 1.200-1.500 bazda bir görülen SNV'ler ve CNV'ler ile insan genomunun kişiden kişiye değişiklik gösterdiği ortaya çıkmıştır (216).

Baştaki soruların çok azına cevap olan HGP tamamlandıktan sonra DNA'nın nasıl çalıştığı ile ilgili pek çok proje üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Eylül 2003'de başlatılan DNA Elementleri Ansiklopedisi (ENCODE)¹²³ projesi, HGP'den elde edilen verileri yorumlayarak, DNA yapısını ve tüm işlevsel elemanlarını kataloglamayı amaçlamaktadır (220).

HGP'nin sonlanması ile birlikte pek çok konsorsiyuma dayalı genom projesi başlatılmıştır ve bu projelerin bir kısmı halen daha sürmektedir. Bunlara HGP'ye benzer ulusal veya uluslararası projelerin yanında (ör. 1.000 Genom projesi, 100.000 genom projesi) bazı hastalıklara odaklanmış projeler (ör. Uluslararası kanser konsorsiyumu, Otizm genom projesi, Uluslararası nadir hastalık araştırma konsorsiyumu) örnek verilebilir (221).

1.000 genom projesi; 2008-2015 yılları arasında yürütülen, popülasyon çalışmalarında en az %1'lik sıklıktaki genetik varyantları saptamayı amaçlayan ilk büyük sayıda insanın genomunu dizileyen projedir. 2.504 insan genomunun dizilenmesi ile oluşturulmuş bu projeden

¹²² *alternative splicing*

¹²³ ENCODE: *ENCyclopedia of DNA Elements*

elde edilen veriler, kolayca erişilebilen açık veri tabanları ile kolayca ulaşılabilir şekilde sunulmaktadır. En son 2014 yılında GRCh38¹²⁴ güncellemesi yayınlanmıştır (222).

Uluslararası HapMap projesi ise, 2002 yılında başlayan insanlar arasındaki ortak genetik varyantları tanımlamak için altı ülkeden kamu ve özel kuruluşlardan bilim insanlarının bir araya gelerek yürüttüğü bir projedir. Projenin verileri tüm dünyadaki araştırmacılar tarafından serbestçe elde edilebilir. Haplotip haritası veya HapMap, araştırmacıların sağlığı ve hastalığı etkileyen genleri ve genetik varyasyonları bulmalarını sağlayan bir araçtır. Herhangi bir kişinin DNA dizisi %99,5 oranında aynıdır ve geri kalan varyasyonlar kişinin hastalık riskini büyük oranda etkileyebilir. Bireylerdeki aynı kromozomdaki SNP kümeleri bloklar halinde kalıtılır ve SNP'lerin bu paterni bir haplotiptir. Bloklar çok sayıda SNP içerebilir ancak birkaç SNP, bir bloğun içindeki haplotipleri benzersiz olarak tanımlamak için yeterlidir. HapMap bu haplotip bloklarının haritasıdır ve haplotipleri tanımlayan bu SNP'lere “tag SNP” denir. HapMap, bu şekilde genomu incelemek için gerekli SNP sayısını azaltarak daha az çabayla daha etkili ve kapsamlı şekilde hastalık genlerini etkileyen bölgelerin saptanması için genomun taramasını mümkün kılar (223).

2004 yılında başlayan AGP, otizme özel tıbbi tedaviler geliştirmek ve otizmin alt tiplerini tanımlamak amacıyla başlatılmış, CMA tekniği kullanılarak yürütülen en büyük genom araştırma projelerinden biridir. Birinci ve ikinci fazları tamamlanmış olan projenin, üçüncü fazı ise sürmektedir. Bu proje ile otizm ile doğrudan ilişkili ve yüksek riskli yüzden fazla gen tanımlanmıştır (221).

10K Genom Projesi, 2001 yılında başlatılmış, otizm tanılı ailelerden toplanmış yüksek kaliteli 12.000'den fazla DNA örneğinden oluşan AGRE koleksiyonu ile yapılan *Autism Speaks* ve Pekin Genomik Enstitüsü (BGI)¹²⁵ ortak yapımı büyük bir projedir.

MSSNG ise, *Autism Speaks* ve *Google* işbirliği ile yürütülen 10.000'den fazla otizm tanılı ailenin tüm genom dizilemesini hedefleyen dünyanın en büyük otizm genom dizileme programıdır. 2017'de *Nature Neuroscience* dergisinde yayınlanan 5.205 genom dizilemesini

¹²⁴ GRCh38: *Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12*

¹²⁵ BGI: *Beijing Genomics Institute*

içeren pilot çalışmasında OSB risk geni olarak saptanan 61 genden 18 tanesinin (CIC¹²⁶, CNOT3¹²⁷, DIP2C¹²⁸, MED13¹²⁹, PAX5¹³⁰, PHF3¹³¹, SMARCC2¹³², SRSF11¹³³, UBN2¹³⁴, DYNC1H1¹³⁵, AGAP2¹³⁶, ADCY3¹³⁷, CLASP1¹³⁸, MYO5A¹³⁹, TAF6¹⁴⁰, PCDH11X¹⁴¹, KIAA2022¹⁴² ve FAM47A¹⁴³) daha önce yazında tanımlanmayan genler olduğu saptamıştır. Bu genlerin en az ikisi nöbetlerle, biri artmış kardiyak bozuklukla ilgili artmış riskle, diğer biri ise erişkin diyabet hastalığı ile ilişkilidir. Bu da OSB’de WGS’nin bireylere, ailelere ve hekimlere tıbbi açıdan da rehberlik edebileceğini göstermektedir (12).

2.13. Önemli veritabanları

Genom Aggregation Database (gnomAD), uluslararası bir araştırmacı birliği tarafından geliştirilen, büyük ölçekli dizileme projelerinin geniş bir çeşitlilikteki hem ekzom hem genom dizileme verilerini toplamak ve uyumlaştırmak ve daha geniş bir bilimsel topluluk için özet veriler sunmak amacıyla geliştirilmiş bir kaynaktır. GnomAD web sitesinde sağlanan veri seti, çeşitli hastalığa özgül ve popülasyon genetiği çalışmalarının bir parçası olarak dizilenen ilişkisiz bireylerden 123.136 ekzom dizisi ve 15.496 tüm genom dizisi verisini kapsamaktadır (224). *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI), çok sayıda türün germline ve somatik varyantları ile ilgili işlenmiş, görüntülenmiş ve raporlanmış bir dizi veri tabanı oluşturur ve korur. Bu veri tabanlarından özellikle *Database of Short Genetic Variations* (dbSNP) (225) ve *Database of Genomic Structural Variations* (dbVar) (226) insan, bitki ve hayvanlar dahil olmak üzere 350’den fazla türe ait 1,5 milyar varyantı sunmaktadır. Her iki veri

¹²⁶ CIC: *Capicua transcriptional repressor*

¹²⁷ CNOT3: *CCR4-NOT transcription complex subunit 3*

¹²⁸ DIP2C: *Disco interacting protein 2 homolog C*

¹²⁹ MED13: *Mediator complex subunit 13*

¹³⁰ PAX5: *paired box 5*

¹³¹ PHF3: *PHD finger protein 3*

¹³² SMARCC2: *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regülator of chromatin subfamily C member 2*

¹³³ SRSF11: *Serine and arginine rich splicing factor 11*

¹³⁴ UBN2: *Ubinuclein 2*

¹³⁵ DYNC1H1: *Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1*

¹³⁶ AGAP2: *ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2*

¹³⁷ ADCY3: *Adenylate cyclase 3*

¹³⁸ CLASP1: *Cytoplasmic linker associated protian 1*

¹³⁹ MYO5A: *Myosin VA*

¹⁴⁰ TAF6: *TATA-box binding protein associated factor 6*

¹⁴¹ PCDH11X: *Protocadherin 11 X-linked*

¹⁴² KIAA2022: *Neurite extension and migration factor*

¹⁴³ FAM47A: *Family with sequence similarity 47 member A*

tabanının birincil rolü, gönderileri işlemek, verileri arşivlemek, genom ve NCBI Referans Dizileri üzerinde anlamlandırma yapmak ve dünya çapında dağıtmaktır. Veriler tanı, tedavi ve önleme için insan hastalıklarının temelini incelemek ve tür çeşitliliği, evrim ve koruma gibi çeşitli alanlarda araştırmalar için önemlidir. Veri tabanı dbSNP kısa (<50 bp) nükleotid varyasyonlarını, kısa multi-nükleotid değişiklikleri¹⁴⁴ (MNV) ve küçük delesyon ve insersiyonları; veri tabanı dbVar ise, büyük (>50 bp) varyasyonları (CNV, büyük delesyon ve insersiyonlar, inversiyonlar, translokasyonlar, mobil elementler ve daha fazlası) içermektedir (227).

Simons Vakfı Otizm Araştırma Girişimi (SFARI)¹⁴⁵ Gen ise, OSB ile ilgili çalışmaların farklı çeşitlerdeki genetik verilerini toplayan, böylece yeni hipotezler kurulmasını sağlayan bir veri tabanıdır. İnsan geni modülündeki aday genlerdeki bilgileri çeşitli ek veri modüllerinden gelen veriyle ilişkilendirerek bir sistem biyolojisi yaklaşımı sunmaktadır. Son güncellemesi 18 Ocak 2018’de yapılan veri tabanında 990 skorlanmış gen ve 2.223 CNV risk lokusu bulunmaktadır (226).

Otizm Veritabanı (AutDB)¹⁴⁶, güncel araştırmalarla birlikte artan sayıda OSB aday genlerinin de güncel bilgisini içeren, genetik ilişki çalışmalarından elde edilen aday genler, nadir tek gen mutasyonları ve sendromik otizm ile ilişkili tüm genleri içeren hastalığa dayalı halka açık bir web portalıdır. OSB ile ilişkilendirilen genleri içeren AutDB veri tabanı, Aralık 2017 tarihli verilerine göre 990 gen ve 2225 CNV içermekte ve bu sayı aralıklı olarak güncellenmekte ve sürekli artmaktadır. Veritabanı Simons Vakfı tarafından desteklenmektedir (228, 229).

2.14. Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri

1970’lerde Sanger ve arkadaşları ile Maxam ve Gilbert zincir sonlandırma ve parçalara bölme yaklaşımlarına dayalı DNA dizileme yöntemleri geliştirmişlerdir (230, 231). Doğal nükleotidlerin analogu olan modifiye edilmiş azot bazlarının eklenmesi ile DNA sentezinin kesilmesine dayanan ve “zincir sonlandırma yaklaşımı” olarak adlandırılan Sanger dizileme

¹⁴⁴ MNV: *Multi-nucleotide variation*

¹⁴⁵ SFARI: *Simons Foundation Autism Research Initiative*

¹⁴⁶ AutDB: *Autism Database*

teknikçi otomatik kapiller elektroforez¹⁴⁷ ile birleştirildiğinde doğruluk ve hız açısından oldukça gelişim göstermiştir. “Birinci nesil” dizileme yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem basit olması, ham okumaların yüksek oranda doğru olması ve okuma uzunluğunun fazla olması gibi nedenler ile DNA dizilemede yaklaşık yirmi yıl boyunca baskın yöntem olarak kullanılmıştır. HGP’de Otomatik Sanger dizileme teknikçi Mullis’in Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)¹⁴⁸ (232) ile birlikte de başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen teknikçi en önemli sınırlılığı yüksek maliyetli olmasıdır. Özel olarak finanse edilmiş diğeri HGP’de ise DNA parçalarının doğrudan vektörlerle klonlanması, dizilenmesi ve bir araya getirilmesi şeklinde olan “tüm genom, rasgele av tüfeği dizilemesi”¹⁴⁹ teknikçi kullanılmıştır (219). Sonradan DNA dizileme için standart haline gelen bu yöntem NGS ve ilişkili diğeri yöntemler içinde zaman içinde geliştirilmiştir.

NGS ise 2000’li yılların başlarında ortaya çıkmış ve ilk büyük paralel dizilme yaklaşımı Brenner’in grubu tarafından raporlanmıştır. Bu yaklaşımla maya ve bir insan hücre dizisinin gen ekspresyon profillerini üretmek için mikro boncuklar¹⁵⁰ kullanılmıştır (233). NGS yöntemleri ile dizileme çıktısı elektroforez gerektirmeden doğrudan tespit edilir baz sorgulaması döngüsel ve paralel olarak gerçekleştirilir (234). 2005 yılında NGS yöntemleri 454 *Life Sciences* tarafından geliştirilen “sentez yoluyla dizileme” (SBS)¹⁵¹ yöntemi (235) ve George Church laboratuvarının çoklu “*polony* dizileme protokolü”¹⁵² (236) teknolojilerinin gelişmesi ile daha da kullanılabilir hale gelmiştir. Sonrasında ilave NGS teknolojileri de geliştirilmiştir ve ticari olarak mevcuttur. Çalıştırma başına 20 megabaz çiftlik (Mbp) bir çıktı ile çalışan ilk sistem olan *Roche 454 Life Sciences* tarafından üretilen GS20’nin piyasaya sürülmesinden bu yana NGS teknolojisi oldukça gelişmiştir. Örneğin *Illumina HiSeqX* sistemi, çalıştırma başına 1,8 terabaz çiftlik (Tbp) veri dizisi üretme kapasitesine sahiptir. Bu da veri üretme kapasitesinin yaklaşık son 10 yılda 100.000 kat arttığını göstermektedir. “Tek nükleotid dizileyiciler” olarak adlandırılan *Pacific Biosciences* ve *Nanopore* tarafından üretilen yeni NGS sistemleri ise PCR amplifikasyonundan doğan yan tutmaları önleyen DNA veya

¹⁴⁷ *automated capillary electrophoresis*

¹⁴⁸ PCR: *Polymerase Chain Reaction*

¹⁴⁹ *shotgun sequencing*

¹⁵⁰ *microbeads*

¹⁵¹ SBS: *sequence-by-synthesis*

¹⁵² *multiplex polony sequencing protocol*

RNA kalıbının klonal amplifikasyonunu gerektirmemesi ve böylece maliyeti ciddi ölçüde azaltması ve artmış okuma uzunluğu avantajının yanında gerçek zamanlı DNA veya RNA veya DNA metilasyonu gibi baz modifikasyonlarını değerlendirebilme kapasitesi açısından önem kazanmaktadır (237, 238). Illumina günümüzde sentez yoluyla dizileme sistemleri içinde endüstrideki en önde gelen NGS firmasıdır. Illumina platformunu kullanan NGS teknolojileri, milyonlarca hatta milyarlarca DNA parçalarını paralel olarak dizileyen ve analiz için analiz için birleştiren SBS yöntemini kullanmaktadır. Rutin dizileme protokolünde örnek kütüphane hazırlama, küme üretimi ve SBS'yi içeren üç adım yer almaktadır.

NGS yöntemleri içinden WGS ve WES ile genom, RNA-seq tekniği ile transkriptom, ChIP-seq¹⁵³, DNase-seq¹⁵⁴ ve ATAC-seq¹⁵⁵ gibi yöntemlerle ise epigenom dizilenebilmektedir (237). WES, Mendelyan hastalıklar ile ilişkili yüksek oranda penetran varyantları tanımlamada en uygun yöntemdir. Hedeflenmiş yeniden dizileme¹⁵⁶ ise, seçili genomik bölgelerin yakalanması ve dizilenmesi içerir ve WES ve WGS'yi tamamlar (237). WGS ise özellikle genomun kodlanmayan ve olası düzenleyici bölgeleri için genetik varyasyonların WES, SNP CMA, aCGH gibi genomik teknolojilerle mümkün olandan daha kapsamlı değerlendirilmesini sağlamaktadır (239). Önceki yayınlar, protein kodlayan dizinin WGS tarafından yeterince iyi örtülmüş olduğunu ve WES teknolojisinden daha kapsamlı olduğunu ileri sürmektedir (240). WGS'nin, WES'e göre patojenik varyantı saptama açısından da daha hassas olduğu düşünülmektedir (13). Ayrıca WES tekniğinde gerekli olan ve laboratuvarlar arasında hassaslık (sensivite) ve başarı oranları farklılıklarına yol açan DNA zenginleştirme işleminin WGS'de gerekli olmaması bir diğer üstün özelliğidir.

WGS için HGP'de 2001 Eylül'de genom başına yaklaşık 95.300.000 dolar olan dizileme maliyeti, 2017 Temmuz'da 1.120 dolara kadar düşmüştür. Özellikle 2008 yılından itibaren maliyetlerde yaşanan bu önemli orandaki düşme, Sanger dizilemeye dayanan birinci nesil dizileme yöntemlerinden çok büyük ölçekte paralel yüksek çıktı¹⁵⁷ teknolojiye yeni nesil dizileme yöntemlerine geçilmesine bağlıdır (241).

¹⁵³ ChIP-seq: *Chromatin Immunoprecipitation*

¹⁵⁴ DNase-seq: *DNase I hypersensitive sites sequencing*

¹⁵⁵ ATAC-seq: *Accessible Chromatin Assay with high-throughput sequencing*

¹⁵⁶ *Targeted re-sequencing*

¹⁵⁷ *massively parallel throughput*

2.15. Otizmle ilgili Transkriptomik çalışmalar

OSB tanılı bireyler ve kontroller arasındaki gen ekspresyon patern farklılıklarını gösteren periferik kan, beyin hücreleri ve lenfoblastoid hücre hatları gibi çok sayıda farklı dokularla yapılmış çalışma mevcuttur. RNA-seq gibi yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi, beyin dokusundaki gen ekspresyonunu derinlemesine analizi için oldukça faydalı olmuştur (100). OSB tanılı bireyler ve kontrollerden elde edilmiş 100'den fazla postmortem beyin dokusunda yalnızca farklı transkriptomik profil saptanmakla kalmamış, MAL¹⁵⁸ ve C11orf30¹⁵⁹ gibi immün sistem genlerinden zenginleşmiş bulunmuştur (242). Bu sonuç, daha küçük örneklem büyüklüğü ile yapılmış daha önceki bir RNA-seq çalışması ile tutarlıdır (242). Pek çok gen ekspresyonu çalışmasının sonuçları, bağışıklık genlerinin yukarı yönlü düzenlenmesi ile ilgili görünmektedir. Bu da inflamasyon ve immün yanıtlar ile nöronal ve sinaptik gelişimin birlikte nasıl yürüdüğünü anlamaya katkı sağlamıştır (243). Genom çalışmaları, hastalığın etiyolojisini anlamak için önemli rol oynarken, ekspresyon çalışmaları da doğrulamayı sağlar ve otizm tanılı bireylerin beyinlerinde değişen moleküler yolların ayırt edilmesine yardımcı olur (244). Alternatif olarak, ekspresyon analizinden elde edilen veriler, genetik bağlantı çalışmalarından elde edilmiş yeni, henüz tanımlanmamış genlerin aday olarak gösterilmesinde yardımcı olabilir. Gelecekteki araştırmalarda, otizm alt tiplerinde bozulan yolların daha iyi ve daha hızlı anlaşılabilmesi için ilişki çalışmalarının ve transkriptom analizlerinin birlikte yürütülmesi gerekmektedir (100).

2.16. Geniş Otizm Fenotipi

GOF, otizm tanılı kişilerin yakınları arasında sık görülen ve otizm tanısının karakteristik özelliklerinin daha hafif belirtileri olduğuna inanılan, eşik altı toplumsal beceriler ve iletişimsel belirtiler ile kişilik özelliklerini tanımlayan bir terimdir (245). Aslında GOF tanımının geçmiş Kanner ve Asperger'in olgularının aileleri ile ilgili yaptıkları gözleme dayanmaktadır (246). GOF özellikleri, otizmin çekirdek belirtilerine paralel olarak toplumsal beceri, iletişim ve tekrarlayan basmakalıp davranış örüntüleri alanlarını içerir. Fakat bu belirtiler otistik bireylerin yakınlarında farklı görünümsergilemektedir. Otistik Bozukluk tanısı alan çocukların birinci derece yakınlarının %25'inde otizme benzeyen belirtiler görüldüğü bildirilmektedir (247). Bazı

¹⁵⁸ MAL: *mal, T cell differentiation protein*

¹⁵⁹ C11orf30: *Chromosome 11 open reading frame 30*

Çalışmalarda eşik altı otistik belirtilerin multipleks ailelerde simpleks ailelere göre daha sık görüldüğünü öne sürmüştür (248, 249). SCC ile yapılan çalışmada da GOF özelliklerinin düşük oranda çıkması bu bulguları desteklemektedir (250). Ayrıca GOF araştırmalarının otizmin altta yatan genetik mekanizmalarını anlamada yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (14).



3. AMAC ve HİPOTEZLER

3.1. Araştırmanın amacı

OSB tanılı ikisi de etkilenmiş ikiz çocuk ve ergenlerden ve bu çocukların anne-babalarından alınan örneklerin WGS yöntemi ile genomik, RNA-seq yöntemi ile transkriptomik analizlerinin yapılarak elde edilen verilerle çocuklardaki otizmin etiyolojisinin saptanması; ayrıca bozukluğun şiddeti ve anne veya babalardaki GOF özellikleri dahil tüm bireylerin özellikleri ile bu verilerin sonuçları arasında bağ kurulması amaçlanmaktadır.

3.2. Araştırmanın Hipotezleri

1) WGS teknolojisi ve bu teknolojinin aile deseni ile birlikte kullanılması, OSB etiyolojisinin çok genli ve multifaktoriyel doğası nedeniyle bozukluğun altta yatan hem kalıtılan hem de *de novo* genetik nedenlerini saptamada avantajlı ve etkin bir yöntemdir.

2) OSB şiddeti ile periferik kan tek-çekirdekli hücrelerin (PBMC)¹⁶⁰ transkriptomları arasında ilişki mevcuttur.

3) WGS teknolojisi ve bu teknolojinin aile deseni ile birlikte kullanılması, DZ ikiz kardeşlerde bile otizmin etiyolojisinden sorumlu hem *de novo* hem kalıtılan varyantların farklı olabileceği görüşünü test etmek için iyi bir yöntemdir.

4) GOF özellikleri taşıyan ebeveynler genlerin penetrans özelliklerindeki farklılıklar ve bozukluğun çok genli doğası nedeniyle çocuklarındaki otizmden sorumlu varyantları taşımalarına rağmen bozukluk tanısını karşılayacak kadar etkilenme göstermemektedirler.

¹⁶⁰ PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma kesitsel tanımlayıcı bir araştırmadır.

4.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (IBG) Genomik ve Biyoinformatik Birimleri'nde Ocak 2017 – Ocak 2018 tarihleri arasında yapılmıştır.

4.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma evreni Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğinde izlenmekte olan 5-18 yaş arası, DSM-5 ölçütlerine göre OSB tanılı ikisi de etkilenmiş DZ ikiz çocuk ve ergenler ve etkilenmemiş anne-babaları olarak belirlenmiştir. Araştırmanın örneklemi her aileden 4 kişi olmak üzere toplamda 3 aile (toplamda 12 birey) oluşturmaktadır.

4.3.1. Olgu grubunun çalışmaya dahil edilme ölçütleri

- 1) Çalışmaya katılımı planlanan ikiz çocuk ve ergenlerin 5 yaşından büyük 18 yaşından küçük olması,
- 2) Çalışmaya katılımı planlanan ikiz çocuk ve ergenlerinin DZ ikiz olmaları,
- 3) Çalışmaya katılımı planlanan ikiz çocuk ve ergenlerin ikisinin de DSM-5 tanı ölçütlerine göre OSB tanısına sahip olması,
- 4) Çalışmaya katılımı planlanan OSB tanılı ikisi de etkilenmiş ikiz çocuk ve ergenlerin anne ve babalarının çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul etmeleri; anne ve babaların yazılı onam vermeleri.

4.3.2. Olgu grubunun çalışmaya dahil edilmeme ölçütleri

- 1) Çalışmaya katılımı planlanan OSB tanılı ikisi de etkilenmiş ikiz çocuk ve ergenlerin uygulanan Okul Çağı Çocukları İçin Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme

Çizelgesi- Şimdi ve Yaşam Boyu Versiyonu (ÇDGŞG-ŞY)¹⁶¹ görüşme formuna göre eşlik eden şizofreni tanısının bulunması,

2) Çalışmaya katılımı planlanan OSB tanılı ikisi de etkilenmiş ikiz çocuk ve ergenlerin bilinen genetik bir sendroma sahip olmaları,

3) Çalışmaya katılımı planlanan anne ve babaların uygulanan DSM-IV için yapılandırılmış klinik görüşme (SCID-I)¹⁶² ölçeğine göre şizofreni tanısının olması,

4.4. Veri toplama araçları

Dahil edilme ölçütlerine uyan olgulara (iletişim becerileri yeterli düzeyde ise) ve ebeveynlerine araştırma ve yapılacak uygulama hakkında ayrıntılı bilgi verildi. Olguların bilişsel düzeyleri yeterli olmadığı için araştırma ve yapılacak uygulama hakkında yalnızca ebeveynlerine ayrıntılı bilgi verilebildi. Ebeveynlerinden bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup imzalayarak çalışmada yer almayı kabul eden aileler çalışmaya alındı. Daha önce poliklinikte OSB tanısı ile izlenen olgular, DSM-5 ölçütlerine göre tanısal açıdan yeniden değerlendirildi. DSM-5 ölçütlerine göre OSB tanısı netleşen olguların araştırmaya uygun olup olmadıklarını saptamak için dahil edilme ve edilmeme ölçütleri açısından incelendi. DSM-5 tanı ölçütlerine göre OSB tanısını karşılayan olgular ve ailelerine aşağıdaki form ve ölçekler uygulandı, sonrasında kan alma işlemine geçildi. Alınan kan örnekleri aşağıdaki basamaklara tabi tutuldu ve moleküler tanı yöntemleri basamağına geçildi.

4.4.1. Değerlendirmede kullanılan formlar ve ölçekler

1) Sosyodemografik Veri Formu

Sosyodemografik veri formu çocuk ve ergenlerin sosyodemografik özellikleri hakkında bilgi toplama amacıyla yazın temel alınarak, araştırmacılar tarafından hazırlanmıştır. Bu veri formunda çocuğa ilişkin; doğum tarihi, cinsiyeti, varsa doğum komplikasyonları, annenin gebelikte kullandığı ilaçlar, gelişim basamakları, öğrenim ve özel eğitim durumu, okul başarısı, akran ilişkileri, ailenin kaçınıcı çocuğu olduğu bilgileri yer almaktadır. Aileye ilişkin olarak;

¹⁶¹ ÇDGŞG-ŞY : *Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Age Children Present and Life-time Kiddie-SADS-PL*

¹⁶² SCID-I: *Structured Clinical Interview for the DSM-IV Axis I Disorders*

anne ve babanın yaşı, eğitim düzeyleri, mesleki durumları ve gelir düzeyleri, ebeveynlerin birliktelik durumu, ailenin kaç çocuğa sahip olduğu, varsa kullandıkları yardımcı üreme teknikleri, anne, baba, çocuk ve akrabalarında tanı konmuş herhangi bir fiziksel ve/veya ruhsal hastalık öyküsü bilgileri bulunmaktadır. Sosyodemografik veri formu EK.8’de sunulmuştur.

2) Okul Çağı Çocukları İçin Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi-Şimdi ve Yaşam Boyu Versiyonu (ÇDGŞG-ŞY) (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Age Children Present and Life-time Kiddie-SADS-PL)

Kaufman ve arkadaşları (1997) tarafından geliştirilen ÇDGŞG-ŞY, çocuk ve ergenlerin geçmişteki ve şu andaki psikopatolojilerini DSM-III-R ve DSM-IV tanı ölçütlerine göre değerlendirmek amacıyla geliştirilmiş oldukça yaygın kullanılan yarı yapılandırılmış bir görüşme formudur. Form; sosyodemografik özelliklerin sorgulandığı ilk bölüm, şimdi ve geçmiş psikiyatrik belirtilerin sorgulandığı ikinci bölüm ve çocuğun değerlendirme yapıldığı andaki genel işlevinin değerlendirildiği üçüncü bölümden oluşmaktadır. Görüşmede duygudurum bozuklukları, psikotik bozukluklar, anksiyete bozuklukları, dışa atım bozuklukları, yıkıcı davranım bozuklukları, alkol ve madde kullanım bozuklukları, yeme bozuklukları ve tik bozuklukları değerlendirilebilmektedir (251). ÇDGŞG-ŞY’nin Türkçe çevirisi ve geçerlik ve güvenilirlik çalışması Gökler ve arkadaşları (2004) tarafından yapılmıştır (252).

3) Çocukluk Otizmini Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ)

ÇODÖ, 1971 yılında Schoppler ve Reichler tarafından geliştirilmiştir (54). Ölçeğin Türkçeye uyarlanması Sucuoğlu ve arkadaşları (253), geçerlik ve güvenilirlik çalışmaları ise İncekaş ve Baykara tarafından yapmış, ölçeğin Türkçe formunun kesme puanı 30 olarak saptanmıştır (254). ÇODÖ yaygın olarak otizmin tanısında ve bu çocukların diğer gelişimsel bozukluğu olan çocuklardan ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Ölçek aile ile görüşme ve çocuğun gözlemlenmesi sonucunda elde edilen bilgiler temel alınarak doldurulmaktadır.

Ölçek ayrı birer alt ölçek görünümünde olan 15 maddeden oluşmakta, ölçeği doldurulmasıyla çocuğun otizm derecesi belirlenebilmektedir. Ölçekte yer alan maddeler; kişilerle ilişki, taklit, duygusal tepkiler, vücudun kullanımı, değişikliğe tepki, görsel tepkiler,

dinleme tepkileri, tat, koku ve dokunmanın kullanılması, korku/sinirlilik, sözel iletişim, sözel olmayan iletişim, zihinsel etkinlikler ve genel izlenimler başlıkları altında toplanmakta ve her madde 1 ile 4 arasında yarım derecelik puanlama ile derecelendirilmektedir. 15. madde; diğer maddelerde özellikleri değerlendirilen çocuğa ilişkin klinisyenin genel değerlendirmesini içerir. Toplam puan 15-60 arasında seyredebilir. 30-36 arası puanlar hafif-orta derece otizmi, 37 ve üzeri puanlar ağır derecede otizmi ifade eder. ÇODÖ EK.9'de sunulmuştur.

4) Otizm Davranış Kontrol Listesi (ODKL)

Otizm Davranış Kontrol Listesi (ODKL)¹⁶³, Krug ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (255). Pek çok ülkede otizmde tarama ve eğitimin değerlendirilmesi amacı ile sıklıkla kullanılan ölçekler arasındadır. ODKL, duysal, ilişki kurma, beden ve nesne kullanımı, dil becerileri, sosyal ve öz bakım becerileri olmak üzere toplam beş alt ölçekten oluşan 57 maddelik bir değerlendirme aracıdır. Ölçekten alınabilecek en düşük puan 0, en yüksek puan ise 159'dur. ODKL'nin en önemli avantajlarından biri, hem öğretmenlerden hem de anne-babadan bilgi almaya olanak sağlayan kolay uygulanabilir bir araç olmasıdır. Ölçeğin Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması Irmak ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Ölçeğin Türkçe formunun kesme puanı 39 olarak saptanmıştır (256). ODKL ölçeği EK.3'de sunulmuştur.

5) DSM-IV için Yapılandırılmış Klinik Görüşme (Structured Clinical Interview for the DSM-IV Axis I Disorders; SCID)

First ve arkadaşları tarafından DSM-IV Eksen I bozuklukları için yapılandırılmış klinik görüşmedir. SCID-I, tanısal değerlendirmenin standart biçimde uygulanmasını sağlayarak tanının güvenirliliğinin ve geçerliliğinin artırılması, belirtilerin sistematik olarak araştırılması için geliştirilmiştir (257). Ölçeğin geçerlilik, güvenirlik çalışmaları Çorapçıoğlu ve arkadaşlarınca yapılmıştır (258).

6) Otizm-Spektrum Anketi (OSA)

Baron-Cohen ve arkadaşları tarafından hazırlanan Otizm-Spektrum Anketi (OSA), normal zekâ kapasitesine sahip herhangi bir erişkinin hangi derecede otistik özellikler

¹⁶³ ODKL: *Autism Behavior Checklist (ABC)*

sergilediğini veya “geniş fenotip”e sahip olduğunu belirlemeyi amaçlamaktadır (259). Ölçeğin Türkçe *güvenilirlik ve psikometrik özellikleri* Köse ve arkadaşları (2010) tarafından çalışılmıştır (260).

Anket, beş farklı alanı değerlendiren onar soru ve toplam 50 sorudan oluşmaktadır. Beş farklı alan toplumsal beceri, dikkati kaydırabilme, ayrıntıya dikkat etme, iletişim ve hayal gücü alanlarıdır. Anormallik zayıf toplumsal beceri, zayıf iletişim becerisi, zayıf hayal gücü, ayrıntılara olağanüstü dikkat etme, dikkati kaydırmada yetersizlik/dikkatin kuvvetli odaklanması olarak değerlendirilmiştir. OSA EK.11’de sunulmuştur.

4.4.2. Moleküler Yöntemler

Yukarıdaki veri toplama formları ve ölçeklerinin uygulanmasından sonra gönüllülerden kan alma işlemine başlandı. Olgulardan ve ebeveynlerinden toplanan EDTA¹⁶⁴’lı tüpe alınan periferik kan örnekleri DNA izolasyonu için 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine 1’er ml olacak şekilde konularak -20°C’de saklandı. RNA izolasyonu için ise örnekler laboratuvara gelir gelmez PBMC izolasyonu için hemen işleme alındı.

DNA İzolasyonu

1. Öncelikle hazırlanışı aşağıda nasıl hazırlandığı detaylı anlatılan tampon çözeltileri A ve B hazırlandı.
2. -20°C’de saklanan 1’er ml’lik kanlar eriyene kadar +4°C’de bekletildi.
3. 50 ml’lik santrifüj tüplerine 1 ml kan ve 10 ml tampon çözeltisi A eklendi.
4. Karışması için 4 dakika çalkalama cihazında karıştırıldı.
5. Sonrasında santrifüj cihazına alınarak 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj yapıldı.
6. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve 5 ml tampon çözeltisi A pelletin üzerine eklendi. Homojen karışım oluşana kadar pipetleme yapıldı.
7. 4 dakika karışması için çalkalama cihazında karıştırıldı.
8. 10 dakika 3000 rpm’de santrifüj yapıldı.
9. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve 2 ml tampon çözeltisi B pelletin üzerine eklendi. Homojen karışım oluşana kadar pipetleme yapıldı.

¹⁶⁴ EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik asit

10. 2 ml'lik tampon çözeltisi B ve pelleti içeren karışım 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
11. 500 µl 5M NaCl₄ eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında karışması için çalkalama cihazında karıştırıldı.
12. 25 dakika, 65°C su banyosunda 5 dakikada bir vorteks yapılarak inkübe edildi.
13. 2 ml soğuk kloroform eklendi, 10 dakika oda sıcaklığında karışması için çalkalama cihazında karıştırıldı.
14. 10 dk. 4°C de 3000 rpm'de santrifüj yapıldı.
15. 15 ml'lik santrifüj tüpü %98'lik 6 ml etanol eklenerek, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü ise %70'lik 500 µl etanol eklenerek hazırlandı.
16. Santrifüjden sonra iki ayrı faz oluştu ve üstte kalan sıvı %98'lik 6 ml etanol içeren santrifüj tüpüne eklendi. Tüp 20-25 kere çevrilerek karıştırıldı ve "medusa" denilen DNA'ları içeren bir pellet oluşumu gözlemlendi.
17. Medusa pipet yardımıyla alındı ve %70'lik 1,5 ml etanol içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
18. 1 dk. 14000 rpm'de santrifüj yapıldı.
19. Üstte kalan sıvı (supernatant) uzaklaştırıldı.
20. Alkol kontaminasyonunu önlemek için pellet kuruyana kadar bekletildi.
21. Pellet kuruduktan sonra 50 µl tampon çözelti tris-EDTA (TE) içinde çözüldü.
22. Pelletin TE içinde çözülebilmesi için bir gece 4°C de bekletildi.
23. Ertesi gün, pelletin (DNA'nın) çözüldüğünden emin olmak için 54°C'lik su banyosunda 1 saat boyunca bekletildi.
24. Nanodrop ile DNA miktarı ölçüldü.

Tampon Çözeltisi A'nın hazırlanışı

- 2,42 g 10 mM Tris-HCl, 219,10 g 320 mM sükröz, 2,03 g 5 mM MgCl₂ ve 1,98 litre distile H₂O dereceli silindire eklendi.
- İlk pH ölçüldü (pH 7 ve pH10 standartlarında kalibre edildi).
- Her pH ölçümü arasında dikkatlice karıştırılarak %40'lık NaOH ile pH 8'e ayarlandı.
- Çözelti 2 litrelik silindirde otoklavlandı.
- Otoklav yapıldıktan sonra, Tampon çözeltisi A soğuduktan sonra 20 ml Triton X-100 eklendi ve hafifçe ters çevrilerek iyice karıştırıldı.

- 4 °C’de saklandı.

Tampon Çözeltisi B’nin hazırlanışı

- 30,50 g 400 mM Tris-HCl, 60 ml (pH 8) 0,5 M EDTA, 4,40 g 150 mM NaCl ve 450 ml distile H₂O dereceli silindire eklendi.
- İlk pH ölçüldü (pH 7 ve pH10 standartlarında kalibre edildi).
- Her pH ölçümü arasında dikkatlice karıştırılarak %40’lık NaOH ile pH 8’e ayarlandı.
- Çözelti 500 ml’lik silindirde otoklavlandı.
- Otoklav yapıldıktan sonra, Tampon çözeltisi B soğuduktan sonra 50 ml %10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) eklendi ve hafifçe ters çevrilerek iyice karıştırıldı.

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için öncelikle kan örneklerinden PBMC izole edildi. Sonrasında elde edilen PBMC’lerden RNA izolasyon işlemine geçildi.

PBMC İzolasyonu

1. EDTA’lı tüpte bulunan 4 ml’lik taze kan santrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 1/1 oranında (4 ml) Fosfat tampon solüsyonu (PBS)¹⁶⁵ konularak kan seyreltildi.
2. Yeni bir 15 ml’lik santrifüj tüpü alındı ve içerisine 4 ml “lenfosit ayırma solüsyonu” konuldu.
3. PBS ile karıştırılan kan, lenfosit ayırma solüsyonunun üzerine, bu solüsyonla karışmayacak şekilde eklendi.
4. Hazırlanan örnek 2200 rpm’de 25 dk. boyunca hızlanma ve yavaşlama ivmesi “0” olacak şekilde santrifüj yapıldı.
5. Santrifüjden sonra tüp içinde aşağıdan yukarıya doğru kırmızı kan hücreleri, lenfosit ayırma solüsyonu, PBMC ve plazma şeklinde katmanlara ayrılan örneklerden PBMC’ler lenfosit ayırma solüsyonuna değmeden toplandı ve 15 ml’lik ayrı bir santrifüj tüpüne konuldu.

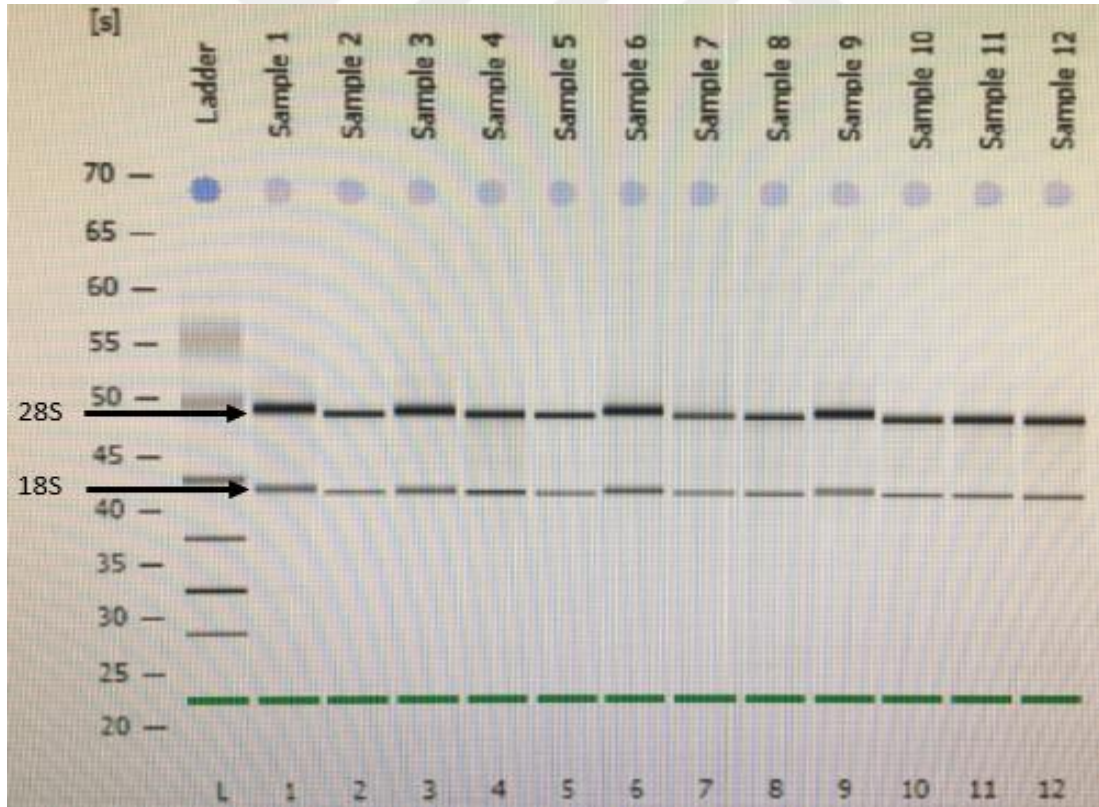
¹⁶⁵ PBS: Phosphate Buffered Saline

6. İçerisinde PBMC olan yeni tp, 14 ml'ye kadar PBS ile tamamlandı ve normal ivmelerde (9,9) 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
7. zerindeki sıvı tamamen atıldı, santrifüj tüpü 10 ml'e kadar PBS ile tamamlandı ve hücreler PBS içinde tekrar homojen bir karışım oluşturana kadar pipetlendi.
8. Normal ivmelerde (9,9), 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
9. zerindeki sıvı tamamen atıldı ve hücre pelleti 500 l'de trizol içerisinde zlerek 1,5 ml'lik santrifüj tüpleri içerisinde -80°C'de saklandı.

PBMC'den RNA izolasyonu

1. Trizol içerisindeki PBMC hücrelerinin üzerine 1/5 oranında kloroform eklendi.
2. 15 sn. karışması için çalkalandı (vortekslendi). Sonrasında 2 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm'de 15 dk. +4°C'de santrifüj yapıldı.
4. RNA'yı içeren en üstteki sıvı katman/faz alındı.
5. Alınan miktar ölçüldü ve miktarın 1,5 katı izopropil alkol eklendi.
6. Macherey-Nagel (MN) RNA izolasyon kitinin NucleoSpin® filtresine (lila renkli) yüklendi.
7. Bir dk. boyunca 11.000 g'de santrifüj yapıldı.
8. Filtre atıldı ve filtreden geçip toplama tüpünde biriken sıvıya 350 l'lik %70'lik etanol eklenerek beş kez pipetlenerek karışırıldı.
9. NucleoSpin® RNA kolonu (açık mavi renkli) alındı ve toplama tüpüne yerleştirildi. Sekizinci basamaktan elde edilen karışım bu kolona yüklendi ve 30 sn. boyunca 11000 g'de santrifüj yapıldı.
10. Aynı kolan yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve eskisi atıldı. Kolonun zerine kit içerinde bulunan 350 l Molibdovanadat Reaktif zltisi (MDB, zarı tuzdan arındırma tampon zltisi) eklenerek bir dk. boyunca 11.000 g'de santrifüj yapıldı.
11. Ayrı bir yerde, 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde 10 l DNase ve 90 l DNase için reaksiyon tampon zltisi içeren DNase reaksiyon karışımı hazırlandı.
12. Hazırlanan DNase reaksiyon karışımından 95 l santrifüjden alınan kolonun üzerine eklenerek 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

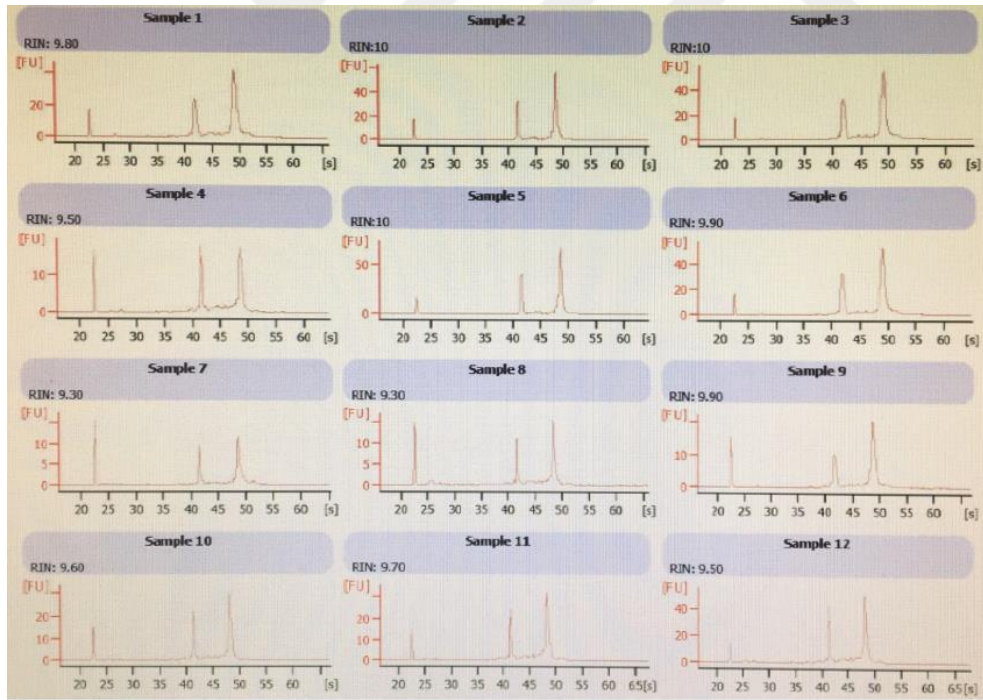
13. Kolonun üzerine 200 µl RWE2 yıkama tampon çözeltisi eklendi ve 30 sn. boyunca 11000 g'de santrifüj yapıldı.
14. Kolon yeni toplama tüpü üzerine alınarak, 60 µl RNase-free H₂O eklenerek bir dk. boyunca 11000 g'de santrifüj yapıldıktan sonra mikrosantrifüj tüpüne toplandı. Örnek -80 °C'ye kaldırıldı.
15. Elde edilen RNA'ların kalite tayini için *Agilent 2100 Bioanalyzer System* kullanıldı. Biyoanaliz sisteminin tüm RNA görüntüsü Şekil 3'de gösterilmiştir. Bu sistem, elde edilen RNA'lar için RNA bütünlük numarası (RIN) ve 18S/28S oranını verir. RNA kalitesini belirlerken, RIN değerinin 7'den büyük ve 18S/28S oranının 1'den büyük olması gerekir. Gönüllülerden elde edilen RNA'ların RIN değeri 9'un üzerinde çıkmıştır (Şekil 4). *Electropherogram*'da elde edilen RNA kalitesi ise Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 3: *Agilent Bioanalyzer* tüm RNA görüntüsü. Tüm RNA görüntüsü *Biyoanalyzer 2100* ile görüntüldü. İlk sütun(L) marker 1, ve anne-baba ve çocuklar olmak üzere sırasıyla 1-4 stünları 1. Aile. 5-8 stünları 2. Aile, 9-12 sütunları 3. Aileyi gösterir. 28S ve 18S ribozomal RNA bandları herbir örnek için görüldü.

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label
Sample 1		✓	RIN: 9.80
Sample 2		✓	RIN:10
Sample 3		✓	RIN:10
Sample 4		✓	RIN: 9.50
Sample 5		✓	RIN:10
Sample 6		✓	RIN: 9.90
Sample 7		✓	RIN: 9.30
Sample 8		✓	RIN: 9.30
Sample 9		✓	RIN: 9.90
Sample 10		✓	RIN: 9.60
Sample 11		✓	RIN: 9.70
Sample 12		✓	RIN: 9.50
Ladder		✓	All Other Samples

Şekil 4: Bioanalyzer RNA bütünlük numarası (RIN) tablosu. Anne-baba ve çocuklar olmak üzere sırasıyla 1-4 satırları 1. Aileyi, 5-8 satırları 2. Aileyi, 9-12 satırları 3. Aileyi gösterir.



Şekil 5: RNA kalitesini gösteren *electropherogram*.

Aşağıdaki tablolarda (Tablo 4 ve 5) araştırmada kullanılan makine-teçhizat ve malzeme listesi gösterilmiştir.

Tablo 4: Araştırmada Kullanılan Mevcut Makine – Teçhizat Listesi

Adı/Modeli	Araştırmada kullanım amacı
<i>Agilent 2100 bioanalyzer system</i>	RNA kalitesini kontrol etmek
<i>Thermo scientific- microCL 17R-centrifuge</i>	RNA izolasyonu
<i>Eppendorf centrifuge 5810R</i>	PBMC izolasyonu
<i>Hettich-zentrifugen-Rotanta 460 R</i>	RNA izolasyonu

Tablo 5: Araştırmada Kullanılan Malzeme Listesi

<i>Agilent technologies-RNA Nano Chips</i>	1 Adet
<i>MN-Nucleospin RNA kit</i>	1 Adet
<i>SIGMA-TRI Reagent</i>	1 Adet
<i>Lonza-Lymphocyte Separation Medium-100ml</i>	2 Adet
<i>Lonza-phosphate Buffered Saline-500 ml</i>	2 Adet

DNA Analizi

İkiz çocuk ve ergenler ile ailelerinden alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinin uygun kalitede olduğu nanodrop ile görüldükten sonra WGS teknolojisi ile dizilenmesi amacı ile Novagene firmasına gönderildi. Firmada dizileme öncesi iki farklı metotla DNA'ların kalite kontrolü yapıldı. Agaroz jel elektroforez sistemi ile DNA bozulması ve potansiyel kontaminasyon testleri yapıldıktan sonra DNA'nın konsantrasyonu tam olarak ölçüldü. Daha sonra, kütüphane kurulumu için *Truseq Nano HT Sample preparation Kit (Illumina US)* kullanılarak dizileme kütüphanesi yapıldı. PCR ürünleri *AMPure XP system* ile saflaştırıldı ve

Agilent 2100 Bioanalyzer ile analiz edildi. DNA'ların etkili konsantrasyonlarına ve kabul edilen veri miktarına göre havuzlama yapıldıktan sonra dizileme için, kaliteli kütüphaneler *HiSeqX/MiSeq* dizileme ile arttırıldı. Her bir örnek için 90 Gb veri üretilerek, veriler harici disk yardımıyla IBG-İzmir genomik birimine gönderildi. Daha sonra biyoinformatik analiz IBG-İzmir Genomik ve Biyoinformatik biriminde gerçekleştirildi. Veri kalitesinin özeti Tablo 6'de sunulmuştur.

Tablo 6: WGS analizi veri kalitesi özeti

Sample	Library	Flowcell/Lane	Raw reads	Raw data(G)	Effective(%)	Error(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
A1A	DHG16284	H53NFCCXY_L1	64849809	94.26	99.82	0.01	95.75	90.41	41.07
A1A	DHG16284	H53NFCCXY_L3	64751883		99.81	0.03	95.47	89.88	41.02
A1A	DHG16284	H53NFCCXY_L2	63757008		99.82	0.03	95.29	89.52	40.98
A1A	DHG16284	H53NFCCXY_L4	67585475		99.83	0.01	96.06	91.06	41.11
A1A	DHG16284	H53MJCCXY_L1	53265519	97.20	99.83	0.01	96.50	91.86	40.95
A1B	DHG16285	H53NFCCXY_L2	78829363		99.83	0.03	95.22	89.38	40.91
A1B	DHG16285	H53NFCCXY_L4	84242146		99.84	0.01	95.99	90.92	41.03
A1B	DHG16285	H53NFCCXY_L1	80654222		99.83	0.01	95.69	90.28	40.98
A1B	DHG16285	H53NFCCXY_L3	80283107	96.73	99.82	0.03	95.41	89.76	40.94
A1Ç2	DHG16286	H53NFCCXY_L3	79946128		99.83	0.03	95.39	89.72	41.07
A1Ç2	DHG16286	H53NFCCXY_L1	80204165		99.84	0.01	95.67	90.25	41.11
A1Ç2	DHG16286	H53NFCCXY_L4	83768367		99.85	0.01	95.98	90.90	41.16
A1Ç2	DHG16286	H53NFCCXY_L2	78522411	103.86	99.84	0.03	95.20	89.34	41.03
A1Ç1	DHG16287	H53NFCCXY_L4	90022364		99.80	0.01	95.94	90.84	41.20
A1Ç1	DHG16287	H53NFCCXY_L2	84342260		99.79	0.03	95.16	89.30	41.07
A1Ç1	DHG16287	H53NFCCXY_L3	85778260		99.78	0.03	95.35	89.66	41.11
A1Ç1	DHG16287	H53NFCCXY_L1	86053862	92.27	99.79	0.01	95.63	90.19	41.14
A2A	DHG16288	H53NFCCXY_L5	70485078		99.84	0.01	95.94	90.75	40.94
A2A	DHG16288	H53NFCCXY_L6	70136440		99.81	0.01	95.90	90.63	40.94
A2A	DHG16288	H53NFCCXY_L7	69487804		99.82	0.01	95.72	90.31	40.91
A2A	DHG16288	H53MJCCXY_L1	27543564	92.14	99.82	0.01	96.39	91.66	40.90
A2A	DHG16288	H53NFCCXY_L8	69926743		99.81	0.03	95.44	89.81	40.91
A2B	DHG16289	H53MJCCXY_L1	29916678		99.79	0.01	96.40	91.67	40.93
A2B	DHG16289	H53NFCCXY_L6	69442037		99.78	0.01	95.91	90.67	40.98
A2B	DHG16289	H53NFCCXY_L8	69185860	90.36	99.78	0.03	95.46	89.84	40.95
A2B	DHG16289	H53NFCCXY_L5	69766039		99.82	0.01	95.95	90.78	40.97
A2B	DHG16289	H53NFCCXY_L7	68813378		99.79	0.01	95.74	90.34	40.95
A2Ç2	DHG16290	H53NFCCXY_L8	73971519		99.76	0.03	95.44	89.81	40.96
A2Ç2	DHG16290	H53MJCCXY_L1	4753278	90.76	99.77	0.01	96.37	91.63	40.94
A2Ç2	DHG16290	H53NFCCXY_L7	73550900		99.77	0.01	95.71	90.30	40.97
A2Ç2	DHG16290	H53NFCCXY_L6	74289528		99.76	0.01	95.89	90.64	40.99
A2Ç2	DHG16290	H53NFCCXY_L5	74649606		99.80	0.01	95.94	90.75	40.98
A2Ç1	DHG16291	H53NFCCXY_L7	72963141	110.75	99.78	0.03	95.41	89.77	41.06
A2Ç1	DHG16291	H53NFCCXY_L5	74358862		99.80	0.02	95.63	90.24	41.08
A2Ç1	DHG16291	H53NFCCXY_L8	73119150		99.77	0.03	95.13	89.30	41.05
A2Ç1	DHG16291	H53MJCCXY_L1	8033347		99.77	0.01	96.13	91.22	41.05
A2Ç1	DHG16291	H53NFCCXY_L6	74068540	91.71	99.76	0.02	95.59	90.11	41.09
A3A	DHG16292	H53NFCCXY_L6	92724301		99.77	0.02	95.55	90.03	40.78
A3A	DHG16292	H53NFCCXY_L8	91712108		99.78	0.03	95.07	89.19	40.75
A3A	DHG16292	H53NFCCXY_L5	93176587		99.81	0.02	95.59	90.15	40.77
A3A	DHG16292	H53NFCCXY_L7	91538285	91.71	99.79	0.02	95.35	89.67	40.75
A3B	DHG16293	H53NFCCXY_L5	72481227		99.82	0.02	95.62	90.21	41.00
A3B	DHG16293	H53NFCCXY_L7	71163455		99.79	0.03	95.39	89.73	40.99
A3B	DHG16293	H53MJCCXY_L1	18402322		99.79	0.01	96.12	91.19	40.97
A3B	DHG16293	H53NFCCXY_L8	71552502	94.67	99.79	0.03	95.11	89.25	40.99
A3B	DHG16293	H53NFCCXY_L6	72104968		99.78	0.02	95.58	90.09	41.02
A3Ç1	DHG16294	H53KHCCXY_L1	85144521		99.69	0.01	96.03	90.73	40.71
A3Ç1	DHG16294	H53KHCCXY_L3	84787765	101.66	99.67	0.01	96.36	91.47	40.69
A3Ç1	DHG16294	H53KHCCXY_L2	84639991		99.71	0.01	96.20	91.12	40.69
A3Ç1	DHG16294	H53KHCCXY_L4	84310216		99.68	0.01	96.49	91.78	40.70
A3Ç2	DHG16295	H53KHCCXY_L2	78705028	94.67	99.79	0.01	96.07	90.82	41.16
A3Ç2	DHG16295	H53KHCCXY_L4	78386168		99.76	0.01	96.37	91.49	41.17
A3Ç2	DHG16295	H53KHCCXY_L1	79324327		99.77	0.01	95.88	90.40	41.18
A3Ç2	DHG16295	H53KHCCXY_L3	79140154		99.76	0.01	96.23	91.20	41.16

RNA Analizi

RNA kalitesi *Bioanalyzer 2100* yardımı ile belirlendikten sonra, uygun miktarda RNA dizilenmesi için servis sağlayıcı firmaya gönderildi. Burada, RNA-seq için kütüphane hazırlama işlemi *TruSeq Stranded Total RNA LT* (Illumina) kiti yardımı ile yapıldı. Kalite kontrolünü geçen kütüphaneler *NextSeq 500 High Output v2 Kit (150 cycles)* kiti yardımı ile 2x75 uzunluğunda *paired-end* (çift yönlü, 150 döngü) 50 milyon/örnek okuma verecek şekilde dizilendi. Her bir örnek için hazırlanan veriler harici disk yardımı ile İBG-İzmir genomik birimine kargo ile gönderildi. Biyoinformatik analiz İBG-İzmir Genomik ve Biyoinformatik birimlerinde yapıldı.

Tablo 7: RNA dizilemede kullanılan adaptör dizileri

Adaptör adı	Adaptör sekasları
<i>PE_adapters</i>	GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG
<i>PE_Read1_sequencing_primer</i>	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
<i>PE_Read2_sequencing_primer</i>	CGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT
<i>SE_adapter</i>	GATCGGAAGAGCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
<i>SE_PCR_primer</i>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGATCT
<i>PE_PCR_primer1</i>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT
<i>PE_PCR_primer2</i>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGC TGAACCGCTCTTCCGATC
<i>I7_primer</i>	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
<i>I7_primer_rc</i>	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC

4.5. Verilerin Değerlendirilmesi

4.5.1. Tüm Genom Dizileme (WGS) verilerinin değerlendirilmesi

WGS sonrası elde edilen *fastq* formatındaki ham verilerin kalite kontrolleri FASTQC yazılımı (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) ile yapıldı. FASTQC, yeni nesil dizileme verilerinden elde edilen verilen transkriptom ve genom kütüphanelerinin kalite kontrollerinin (QC)¹⁶⁶ gerçekleştirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bir uygulamadır. QC, modern yüksek çıktı dizileycilerden elde edilen ham verilerin derinlemesine analizinden önce yeterli kalite standartlarına sahip olup olmadığının test edilmesinde kullanılır. QC sonrası, analize hazır DNA kısa okumaları, *Ensembl* veri tabanından elde edilen insan referans genomuna (GRCh37) *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA; <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) hizalama algoritması ile hizalandı. BWA, düşük-ayrı dizileri insan genomu gibi büyük bir referans genoma karşı haritalamak için oluşturulmuş bir yazılım paketidir ve BWA-*backtrack*, BWA-SW ve BWA-MEM isimli üç algoritmadan oluşur. BWA-*backtrack*, Illumina için 100bp'ye kadar okumalar için, diğerleri 70bp'den 1Mbp'ye kadar olan daha uzun diziler için tasarlanmıştır. Çalışmadaki hizalama basamaklarında BWA *aln* argümanından faydalanıldı (261). Referans genoma hizalama sonrası elde edilen *Sequence Alignment/Map* (SAM) dosyaları *samtools* (<http://samtools.sourceforge.net/>) aracılığıyla *Binary Aligned/Map* (BAM) formatına dönüştürüldü. SAM formatı, büyük nükleotid dizisi hizalamalarını depolamak için olan genel bir formattır. SAM, çeşitli hizalama programları tarafından üretilen tüm hizalama bilgilerini depolamaya yetecek kadar esnek; hizalama programları tarafından kolaylıkla üretilebilecek veya mevcut hizalama formatlarından dönüştürülebilecek kadar basit; hizalama işlemlerinin çoğunun bellekteki tüm hizalamayı yüklemekten bir akış üzerinde çalışmasına izin verebilen bir format olmayı hedeflemektedir. *Samtools* ise, sıralama, birleştirmek, dizine eklemek ve pozisyon başına bir formatta hizalamalar üretmek dahil olmak üzere, hizalamaları SAM formatında işlemek için çeşitli araçlar sağlar (262). Bu işlemten sonra BAM formatındaki dosyalardaki duplike PCR okumaları *Picard Tools* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) aracılığıyla uzaklaştırıldı. *Picard*, SAM/BAM/CRAM ve VCF gibi yüksek çıktı dizileme verilerini ve formatlarını

¹⁶⁶ QC: Quality control

işlemek için geliştirilmiş bir dizi komut satırı aracıdır. Sonrasında verilerin *Broad Institute* tarafından geliştirilen *Genome Analysis Tool Kit* (GATK; <https://software.broadinstitute.org/gatk/>) analiz araçları ile *indel* yeniden hizalaması ve baz rekaliibrasyon basamakları gerçekleştirildi ve 50 nükleotidden daha kısa uzunluktaki varyasyonların belirlendi. *GATK*, germline ve somatik DNA ve RNA dizileme verilerindeki SNP'leri ve *indel*'leri tanımlamak için oluşturulmuş, genom dizilemede varyant tanımlama için altın standart olarak kabul edilebilecek, çok sayıda alt modülden oluşan *Java* tabanlı bir yazılım paketidir. Kapsamı somatik varyant arama araçları CNV'leri ve yapısal varyantları (SV)¹⁶⁷ da içerecek şekilde genişlemektedir. Yüksek çıktılı dizileme verilerini işleme ve kalite kontrolü gibi ilgili görevleri yerine getiren birçok yardımcı programı da içerir. Bu araçlar esas olarak Illumina dizileme teknolojisi üretilen ekzom ve tüm genom verilerini işlemek için tasarlanmıştır ancak diğer çeşitli teknolojileri ve deneysel tasarımları ele alacak şekilde uyarlanabilirler. Bunun için yüksek çıktılı dizileme verileri için varyant keşif analizi gerçekleştirmek için adım adım tavsiyeler sunan *GATK Best Practices* kullanıldı. İlgilenilen varyasyon türüne ve kullanılan teknolojiye bağlı olarak belirli uygulamalara göre uyarlanmış çeşitli *Best Practices* iş akışlarından WGS'ye uygun olan ve *germline* SNP ve *indel* tipi varyasyonları bulmak için kullanılan *Haplotypecaller GVCF* basamağı kullanıldı.

Haplotypecaller GVCF'nin sırasıyla “ön işleme” ve “varyant keşfi” adımları uygulandı. “ön işleme” basamağına göre ham verilerin kalite kontrolü, referans genoma hizalaması ve duplike PCR'lerin uzaklaştırılması işlemlerini içeren ilk iki adım *GATK* dışı araçlarla daha önceden yapılmış olduğu için, sıradaki adım olan temel kalite skorlarının yeniden kalibrasyonu yapıldı ve böylelikle veriler analize uygun hale getirildi. Varyant arama algoritmaları ciddi ölçüde her dizi okumasının bireysel baz tanımlamalarına (*calling*) verilen kalite skorlarına dayanır. Bu skorlar, dizileme araçları tarafından yayılan baz başına hata temelinde tahminlerdir. Çoğunlukla dizileme araçları tarafından üretilen skorlar çeşitli sistematik yöntemsel hatalara maruz kalmaktadır ve bu verilerde baz kalite skorlarının aşırı veya düşük tahminlerine yol açmaktadır. Temel kalite skoru yeniden kalibrasyonu (BQSR),¹⁶⁸ bu hataları ampirik olarak modellemek kalite skorlarını buna göre ayarlamak için makine öğreniminin uygulandığı bir süreçtir. Böylece daha hatasız baz kalitesi elde edilmesini sağlar. Temel yeniden kalibre etme

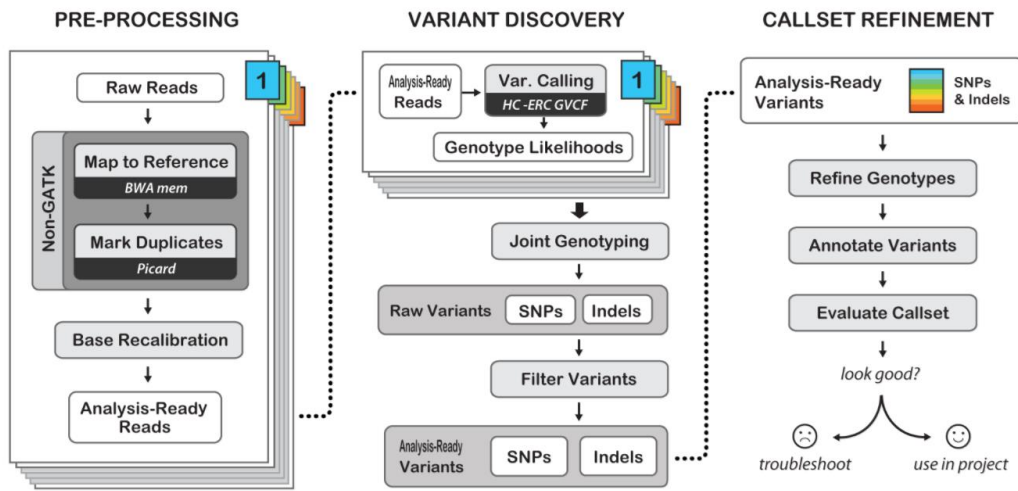
¹⁶⁷ SV: *Structural variation*

¹⁶⁸ BQSR: *Base quality score recalibration*

süreci iki adım içerir; ilk olarak program verilere ve bir takım bilinen varyantlara dayanan bir kovaryasyon modeli oluşturur, daha sonra modele dayalı verilerdeki taban kalitesi skorlarını ayarlar. BQSR aşamasından sonra “varyant tanımlama” ve “varyant filtreleme” olarak iki aşamadan oluşan “varyant keşfi” aşamasına geçildi. Varyant tanımlama aşaması duyarlılığı (yanlış negatifliği en aza indirmek, yani gerçek varyantları tanımlamakta başarısızlık) en üst düzeye çıkarmak için tasarlanırken; filtreleme aşaması her proje için özelleştirilebilen bir düzeyde özgüllük (yanlış pozitifleri en aza indirmek, yani işlem hatalarını çıkarmakta başarısızlık) sağlamayı amaçlamaktadır. DNA için varyant arama basamağı pek çok bireysel örneği içeren kohortların ölçeklenebilir ve aşamalı olarak işlenebilirliğini sağlamak için iki adıma (örnek başına arama ve takiben örneklerde boydan boya ortak genotiplendirme) bölünmüştür.

Varyant arama aşamasında *HaplotypeCaller*, SNP’leri ve *indel*’leri aynı anda arayabilir. Program, varyasyon gösteren bir bölge ile karşılaştığında, mevcut haritalama bilgisini yok eder ve o bölgedeki okumaları tamamen yeniden birleştirir. *HaplotypeCaller* DNA dizi verilerinde ölçeklenebilir varyant aramak için kullanılan GVCF modunda, ara genomik bir GVCF oluşturmak için örnek başına çalışır. Varyant arama aşamasından sonra, bir sonraki adımda eşzamanlı olarak alınması gereken dosyaların sayısını azaltmak için GVCF dosyaların birleştirilmesini içeren isteğe bağlı olan “birleştirme” basamağı uygulandı. Genotip birleştirme adımı ise GVCF’ler toplandı ve ortak genotiplendirme aracı olan *GenotypeGVCF*’ye gönderildi. Bu, filtrelemeye hazır SNP ve *indel* birleşik arama dizisi üretilmesini sağladı. Bu analiz zor bölgelerde bile varyantların hassas bir şekilde tespit edilmesine ve pek çok aşağı yönlü analiz için önemli, tüm örneklerdeki ilgi konusu olan alanlar hakkında bilgi sağlayan genotiplerin kareli matriksini üretilmesine olanak tanır. *GATK*’nin varyant arama araçları gerçek varyantları kaçırma şansını en aza indirmeyi sağlayan yüksek düzeyde hassasiyete sahiptir. Ancak bu oldukça büyük olabilecek ham arama setindeki yanlış pozitiflerin miktarını azaltmak için filtrelene gerekliliği doğurmaktadır. Ham varyant arama setini filtrelemenin en iyi yolu, olası gerçek varyantların ek açıklama profillerini tanımlamak için makine öğrenimini kullanan değişken kalite skoru yeniden kalibrasyonunu kullanmak ve her varyanta bir VQSLOD puanı atamaktır. Varyant keşfinin ikinci basamağı olan bu varyantların filtrelemesi aşamasında ham arama seti filtrelenerek istenen kalite seviyesine sahip aramaların alt kümesi üretildi.

VCF formatında elde edilen aday varyantlar üzerinde mantıksal sorgulamaların yapılabilmesi için GEMINI (<https://gemini.readthedocs.io>) yazılımından faydalanıldı (263). Öncelikle VCF dosyaları sorgulanabilir veri tabanlarına dönüştürüldü ve *de_novo* ve *mendelian_error* komutları ile her bir ailede Mendelyan kalıtım göstermeyen aday varyantlar belirlendi (Tablo 9). Aday varyantların belirlenmesinde, gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>) veri tabanında toplumda görülme sıklığı %5’den daha az olan ve etki şiddeti “yüksek” (ör. *splice_acceptor_variant*) ya da “orta” (ör. *missense_variant*) olarak sınıflanan varyantlar dahil edildi. Dizi ontoloji terimlerinin Gemini terimlerindeki karşılığı, terimlerin açıklaması ve her bir varyantın etki şiddeti sınıflandırması Tablo 8’de verilmiştir. *Calpha* ve *burden* testlerin gerçekleştirilmesinde ise yine GEMINI komut satırından faydalanıldı. Elde edilen nadir varyantlar, NGS yöntemlerinin doğasından kaynaklı hataları ortadan kaldırmak için tanımlama oranı¹⁶⁹ değeri 0,95’in üzerindeki ve okuma derinliği¹⁷⁰ 10’un üzerinde olan varyantları dahil edecek şekilde filtrelendi.



Best Practices for Germline SNPs and Indels in Whole Genomes and Exomes - June 2016

Şekil 6: WGS ve WES verilerinin işlenmesinde GATK tarafından tavsiye edilen biyoinformatik araçların ardışık düzeni (GATK *best practices*’den değiştirilmeden alınmıştır)

¹⁶⁹ call rate

¹⁷⁰ read depth

Tablo 8: Dizi ontoloji terimleri ve anlamları

GEMINI terimleri	Dizi Ontoloji terimleri	Etki şiddeti
<i>splice_acceptor</i>	<i>splice_acceptor_variant</i>	YÜKSEK
<i>splice_acceptor_variant</i> : bir intronun 3' ucundaki 2 baz bölgesini değiştiren bir kırılma (<i>splice</i>) varyantı.		
<i>splice_donor</i>	<i>splice_donor_variant</i>	YÜKSEK
<i>splice_donor_variant</i> : bir intronun 5' ucundaki 2 baz çifti bölgesini değiştiren bir kırılma varyantı.		
<i>stop_gain</i>	<i>stop_gained</i>	YÜKSEK
<i>stop_gained</i> : kısalmış bir polipeptide yol açan bir erken dur kodonuyla sonuçlanan bir kodonun en az bir bazının değiştiği bir dizi varyantı.		
<i>stop_loss</i>	<i>stop_lost</i>	YÜKSEK
<i>stop_lost</i> : Uzamış bir transkript ile sonuçlanan, dur kodonunun en az bir bazının değiştiği bir dizi varyantı.		
<i>frame_shift</i>	<i>frameshift_variant</i>	YÜKSEK
<i>frameshift_variant</i> : <i>indel</i> 'e uğrayan nükleotidlerin sayısı üçün katları olmadığı için translasyonel okuma çerçevesinin bozulmasına neden olan bir dizi varyantı.		
<i>start_loss</i>	<i>start_loss</i>	YÜKSEK
<i>start_loss</i> : kanonik başlangıç kodonunun en az bir bazını değiştiren bir kodon varyantı.		
<i>exon_deleted</i>	<i>exon_loss_variant</i>	YÜKSEK
<i>exon_loss_variant</i> : transkriptten bir eksonun kaybolduğu dizi varyantıdır.		
<i>non_synonymous_start</i>	<i>initiator_codon_variant</i>	YÜKSEK
<i>initiator_codon_variant</i> : bir transkriptin ilk kodonunun en az bir bazını değiştiren bir kodon varyantı.		
<i>transcript_codon_change</i>	<i>initiator_codon_variant</i>	YÜKSEK
<i>initiator_codon_variant</i> : bir transkriptin ilk kodonunun en az bir bazını değiştiren bir kodon varyantı.		
<i>chrom_large_del</i>	<i>chromosomal_deletion</i>	YÜKSEK
<i>chromosomal_deletion</i> : tam olmayan kromozom.		
<i>rare_amino_acid</i>	<i>rare_amino_acid_variant</i>	YÜKSEK
<i>rare_amino_acid_variant</i> : nadir bir aminoasidi kodlayan bir kodonun en az bir bazının değişmesi ile farklı kodlanmış bir aminoasit ile sonuçlanan bir dizi varyantıdır.		
<i>non_syn_coding</i>	<i>missense_variant</i>	ORTA
<i>missense_variant</i> : farklı bir aminoasit dizisi oluşumu ile sonuçlanan, ancak uzunluğun uzunluğun korunduğu, bir ya da daha fazla bazı değiştiren bir dizi varyantıdır.		
<i>inframe_codon_gain</i>	<i>inframe_insertion</i>	ORTA
<i>inframe_insertion</i> : kodlayan diziye baz ekleyen eş anlamlı olmayan (<i>non synonymous</i>) çerçeve içi (<i>inframe</i>) varyanttır.		
<i>inframe_codon_loss</i>	<i>inframe_deletion</i>	ORTA
<i>inframe_deletion</i> : kodlayan diziden baz silen eş anlamlı olmayan çerçeve içi varyanttır.		

<i>inframe_codon_change</i>	<i>coding_sequence_variant</i>	ORTA
<i>coding_sequence_variant</i> : kodlayan diziye değiştiren bir dizi varyantıdır.		
<i>codon_change_del</i>	<i>disruptive_inframe_deletion</i>	ORTA
<i>disruptive_inframe_deletion</i> : mevcut kodondan başlayarak kodlayan diziden bazıları silen kodlayan dizilerin uzunluğunda bir çeręeve içi azalma.		
<i>codon_change_ins</i>	<i>disruptive_inframe_insertion</i>	ORTA
<i>disruptive_inframe_insertion</i> : mevcut kodondan başlayarak kodlayan diziye bir veya daha fazla kodon ekleyen kodlayan dizilerin uzunluğunda bir çeręeve içi artış.		
<i>UTR_5_del</i>	<i>5_prime_UTR_truncation+ exon_loss_variant</i>	ORTA
<i>5_prime_UTR_truncation</i> : referans diziye göre bir 5'UTR'nin azalmasına neden olan bir dizi varyantı. <i>exon_loss_variant</i> : transkriptten bir eksonun kaybolduğu bir dizi varyantı.		
<i>UTR_3_del</i>	<i>3_prime_UTR_truncation+ exon_loss_variant</i>	ORTA
<i>3_prime_UTR_truncation</i> : referans diziye göre bir 3'UTR'nin azalmasına neden olan bir dizi varyantı. <i>exon_loss_variant</i> : transkriptten bir eksonun kaybolduğu bir dizi varyantı.		
<i>splice_region</i>	<i>splice_region_variant</i>	ORTA
<i>splice_region_variant</i> : kırıılma bölgesinin içinde ya ekzonun 1-3 bazında ya da intronun 3-8 bazında değişikliğin meydana geldiği dizi varyantı.		
<i>mature_miRNA</i>	<i>mature_miRNA_variant</i>	ORTA
<i>mature_miRNA_variant</i> : olgun miRNA dizisi ile birlikte konumlanmış bir transkript varyantı. ??		
<i>regulatory_region</i>	<i>regulatory_region_variant</i>	ORTA
<i>regulatory_region_variant</i> : bir dzenleyici blge içinde konumlanmış bir dizi varyantı.		
<i>TF_binding_site</i>	<i>TF_binding_site_variant</i>	ORTA
<i>TF_binding_site_variant</i> : bir transkripsiyon faktr bağlanma bölgesi içinde konumlanmış bir dizi varyantı.		
<i>regulatory_region_ablation</i>	<i>regulatory_region_ablation</i>	ORTA
<i>regulatory_region_ablation</i> : bir dzenleyici blgeyi içeren silinmiş blge vasıtasıyla oluşmuş bir ablasyon zelliği.		
<i>regulatory_region_amplification</i>	<i>regulatory_region_amplification</i>	ORTA
<i>regulatory_region_amplification</i> : bir dzenleyici blge içeren bölgenin bir amplifikasyon zelliği.		
<i>TFBS_ablation</i>	<i>TFBS_ablation</i>	ORTA
<i>TFBS_ablation</i> : bir transkripsiyon faktr bağlanma bölgesi içeren <i>delesyon</i> bölgesi vasıtasıyla oluşmuş bir ablasyon zelliği.		
<i>TFBS_amplification</i>	<i>TFBS_amplification</i>	ORTA
<i>TFBS_amplification</i> : bir transkripsiyon faktr bağlanma bölgesi içeren bölgenin bir amplifikasyon zelliği.		
<i>synonymous_stop</i>	<i>stop_retained_variant</i>	DÜşÜK
<i>stop_retained_variant</i> : stop kodonundaki en az bir bazın değiştiği, ancak stop kodonu olarak kaldığı bir dizi varyantı.		
<i>synonymous_coding</i>	<i>synonymous_variant</i>	DÜşÜK
<i>synonymous_variant</i> : kodlanan aminoasitte değişiklikle sonuğlanmayan bir dizi varyantı.		
<i>UTR_5_prime</i>	<i>5_prime_UTR_variant</i>	DÜşÜK

<i>5_prime_UTR_variant</i> : 5'UTR'nin bir UTR varyantı.		
<i>UTR_3_prime</i>	<i>3_prime_UTR_variant</i>	DÜŞÜK
<i>3_prime_UTR_variant</i> : 3'UTR'nin bir UTR varyantı.		
<i>intron</i>	<i>intron_variant</i>	DÜŞÜK
<i>intron_variant</i> : intronda ortaya çıkan bir transkripsiyon varyantı.		
<i>CDS</i>	<i>coding_sequence_variant</i>	DÜŞÜK
<i>coding_sequence_variant</i> : kodlayan diziyi değiştiren bir dizi varyantı.		
<i>upstream</i>	<i>upstream_gene_variant</i>	DÜŞÜK
<i>upstream_gene_variant</i> : bir genin 5' bölgesinde yerleşmiş bir dizi varyantı.		
<i>downstream</i>	<i>downstream_gene_variant</i>	DÜŞÜK
<i>downstream_gene_variant</i> : bir genin 3' bölgesinde yerleşmiş bir dizi varyantı.		
<i>intergenic</i>	<i>intergenic_variant</i>	DÜŞÜK
<i>intergenic_variant</i> : genler arası (<i>intergenic</i>) bölgede, genlerin arasında bulunan bir dizi varyantı.		
<i>intergenic_conserved</i>	<i>conserved_intergenic_variant</i>	DÜŞÜK
<i>conserved_intergenic_variant</i> : korunmuş genler arası bölgede, genlerin arasında bulunan bir dizi varyantı.		
<i>intragenic</i>	<i>intragenic_variant</i>	DÜŞÜK
<i>intragenic_variant</i> : bir gen içerisinde ortaya çıkan ancak tüm transkript özelliklerinin dışına çıkan bir varyant. Bu varyant bir genin alternatif transkriptlerinin çıkarılan diziyi paylaşmadığında ortaya çıkar.		
<i>gene</i>	<i>gene_variant</i>	DÜŞÜK
<i>gene_variant</i> : genin yapısının değiştiren bir dizi varyantı.		
<i>transcript</i>	<i>transcript_variant</i>	DÜŞÜK
<i>transcript_variant</i> : transkriptin yapısını değiştiren bir dizi varyantı.		
<i>exon</i>	<i>exon_variant</i>	DÜŞÜK
<i>exon_variant</i> : ekzon sekansını değiştiren bir dizi varyantı.		
<i>start_gain</i>	<i>5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant</i>	DÜŞÜK
<i>5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant</i> : erken bir başlanıç kodonunun kazanıldığı bir 5'UTR varyantı.		
<i>synonymous_start</i>	<i>start_retained_variant</i>	DÜŞÜK
<i>start_retained_variant</i> : başlama kodonundan en az bir bazın değiştiği ancak başlama kodonu olarak kaldığı bir dizi varyantı.		
<i>intron_conserved</i>	<i>conserved_intron_variant</i>	DÜŞÜK
<i>conserved_intron_variant</i> : bir intronun korunmuş bir bölgesi içinde bulunan bir transkript varyantı.		
<i>nc_transcript</i>	<i>nc_transcript_variant</i>	DÜŞÜK
<i>nc_transcript_variant</i> : bir kodlamayan RNA geninin bir transkript varyantı.		
<i>NMD_transcript</i>	<i>NMD_transcript_variant</i>	DÜŞÜK
<i>NMD_transcript_variant</i> : NMD'nin (<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>) hedefi olan bir transkript varyantı.		
<i>incomplete_terminal_codon</i>	<i>incomplete_terminal_codon_variant</i>	DÜŞÜK
<i>incomplete_terminal_codon_variant</i> : tamamlanmamış açıklamalı bir transkriptin en az bir bazının değiştiği bir dizi varyantı.		

nc_exon	non_coding_exon_variant	DÜŞÜK
<i>non_coding_exon_variant</i> : kodlamayan bir transkriptin kodlamayan ekzon dizisini değiştiren bir dizi varyantı.		
transcript_ablation	transcript_ablation	DÜŞÜK
<i>transcript_ablation</i> : bir transkript özelliği içeren bir <i>delesyon</i> bölgesiyle oluşmuş bir ablasyon özelliği.		
transcript_amplification	transcript_amplification	DÜŞÜK
<i>transcript_amplification</i> : bir transkript içeren bölgenin bir amplifikasyon özelliği.		
feature_elongation	feature_elongation	DÜŞÜK
<i>feature_elongation</i> : referans dizisi bakımından bir genomik özelliğin uzamasına (ekstensiyon) yol açan bir dizi varyantı.		
feature_truncation	feature_truncation	DÜŞÜK
<i>feature_truncation</i> : referans dizisi bakımından genomik bir özelliğin azalmasına neden olan bir dizi varyantı.		

(Tablo *Gemini user documentation* 'dan faydalanılarak hazırlanmıştır (263).)

Tablo 9: Kalıtım senaryoları ve GEMINI gösterimi

Anne	Baba	Çocuk	Kalıtım tanımlaması
HOM_REF*	HOM_REF	HOM_REF	Beklenen kalıtım
HOM_REF	HOM_REF	HET**	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (<i>de novo</i> olması muhtemel)
HOM_REF	HOM_REF	HOM_ALT***	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (<i>de novo</i> olması muhtemel değil)
HOM_REF	HOM_ALT	HOM_REF	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (uniparental disomi)
HOM_REF	HOM_ALT	HET	Beklenen kalıtım
HOM_REF	HOM_ALT	HOM_ALT	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (uniparental disomi ^a)
HOM_REF	HET	HOM_REF	Beklenen
HOM_REF	HET	HET	Beklenen
HOM_REF	HET	HOM_ALT	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (heterozigosite kaybı ^b)
HOM_ALT	HOM_REF	HOM_REF	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (uniparental disomi)
HOM_ALT	HOM_REF	HET	Beklenen kalıtım
HOM_ALT	HOM_REF	HOM_ALT	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (uniparental disomi)
HOM_ALT	HOM_ALT	HOM_REF	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (<i>de novo</i> olması muhtemel değil)

HOM_ALT	HOM_ALT	HET	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (<i>de novo</i> olması muhtemel)
HOM_ALT	HOM_ALT	HOM_ALT	Beklenen kalıtım
HOM_ALT	HET	HOM_REF	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (heterozigosite kaybı)
HOM_ALT	HET	HET	Beklenen kalıtım
HOM_ALT	HET	HOM_ALT	Beklenen kalıtım
HET	HOM_REF	HOM_REF	Beklenen kalıtım
HET	HOM_REF	HET	Beklenen kalıtım
HET	HOM_REF	HOM_ALT	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (heterozigosite kaybı)
HET	HOM_ALT	HOM_REF	Mendelyan kalıtımla uyumsuz (heterozigosite kaybı)
HET	HOM_ALT	HET	Beklenen kalıtım
HET	HOM_ALT	HOM_ALT	Beklenen kalıtım
HET	HET	HOM_REF	Beklenen kalıtım
HET	HET	HET	Beklenen kalıtım
HET	HET	HOM_ALT	Beklenen kalıtım

* HOM_REF: referans allel için homozigot ** HET: heterozigot *** HOM_ALT: alternatif allel için homozigot ^a uniparental dizomy ^b loss of heterozygosity
(Tablo <https://gist.github.com/arq5x/9413506> adresinden değiştirilerek alınmıştır.)

Filtrelenmiş bu varyantları içeren genlerden SFARI Gen veritabanındaki genlerle kesişenler kategorilere göre (Kategori 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve sınıflandırılmayan) ayrı ayrı belirlendi. SFARI Gen, yukarıda “Önemli veritabanları” başlığı altında daha detaylı bahsedildiği gibi OSB ile ilişkili kanıtların niteliğine bakılmaksızın otizmle ilişkili her geni kapsayan çok kapsamlı bir veritabanıdır. Bu da yanlış pozitiflik oranlarını arttırdığı için kullanıcılara her gen için kanıt gücünün tahminini sağlayan bir sıralama sistemi oluşturulmuştur. Veritabanında yer alan genler sistematik bir skoreleme sistemi ile sendromik ve kategori 1,2,3,4,5,6 olmak üzere yedi tane kategoriye ayrılmıştır. Bu kategorilerin genlerin hangi sisteme göre oluşturulduğu Tablo 10’da özetlenmiştir.

Varyantların yorumlanması aşamasında yalnızca OSB etiyolojisi için en güçlü kanıta sahip SFARI gen kategori 1-3'deki genlerle ilişkili varyantlar yorumlanmıştır. Varyantların patojenite tahmininde gene ve varyanta ait gen intoleransı değerleri, genin homozigot ve/veya heterozigot allel intoleransları, varyantın ACMG sınıflandırması, evrimsel olarak korunmuşluğu, patojenite tahmini ile popülasyondaki görülme sıklığı gibi bazı özellikleri hepsi birlikte değerlendirilmiştir. İlişkili genlerin mutasyon intoleransının saptanmasında, (<http://genic-intolerance.org/>) isimli web sayfasından sorgulanan, NHLBI-ESP6500 ekzom dizisi veri kümesinde sunulan allel frekansı verilerine dayanarak insan dizisi verilerinin yorumlanmasına yardımcı olmak amacıyla oluşturulmuş “kalıntı varyasyon intolerans skoru” (RVIS)¹⁷¹ skorlarından faydalanılmıştır. Ayrıca varyantlar tek tek insan genomik varyantları bilgisi toplayıcısı olan VarSome'da incelenmiştir (<https://varsome.com/>) (264). Varsome'dan sorgulanan her bir varyantın ACMG sınıflandırması, Genomik evrim oranı profillemesi (GERP)¹⁷², DANN skoru, gnomAD *exoms* ve gnomAD *genomes*'da görülme sıklığı (özellikle Finli olmayan Avrupalı alt popülasyonundaki sıklığı dikkate alınmıştır), ayrıca her bir genin pLi, pRec ve pNull değerleri ile RVIS skoru gibi veriler birlikte değerlendirilerek varyantların patojenitesi hakkında tahminde bulunulmuştur. Bu tahmin yapılırken çocukların fenotipik özellikleri, ebeveynlerin özellikleri ve kalıtım şekilleri de dikkate alınmıştır. ACMG sınıflandırılmasına göre varyantlar “benign”, “olasılıkla benign”, “belirsiz anlamlı”, “olasılıkla patojenik” ve “patojenik” olarak 5 kategoriye ayrılmaktadır. Bu kategoriler nüfus verileri, bilgisayarlısal (kompütasyonel), fonksiyonel ve ayrışma (segregasyon) verilerine dayanarak oluşturulmuştur (265). GERP skoru, 35 memelinin genomlarının değerlendirilmesi ile hesaplanmış bir koruma skorudur. Bu skor -12,3 ila 6,17 arasında değişmektedir. 6,17 değeri evrimsel olarak en çok korunmuş değeri ifade eder. DANN skoru ise varyantların açıklanması (annotasyonu) için geliştirilmiş bir yaklaşımdır (266). pLi değeri, hem heterozigot hem de homozigot fonksiyon kaybı mutasyonlarına intoleransı, pRec ise yalnızca homozigot fonksiyon kaybı mutasyonlara karşı intoleransı, pNull ise hem heterozigot, hem de homozigot fonksiyon kaybı mutasyonlarına karşı intoleransı göstermektedir (264).

¹⁷¹ RVIS: *Residual variation intolerance score*

¹⁷² GERP: *Genomic evolutionary rate*

Tablo 10: SFARI Gen kategorileri ve kategorilerin skorlanma özellikleri

Gen kategorileri		Özellikler	Gen Sayısı
S	Sendromik	OSB için artmış risk ile ilişkili ancak OSB tanısı için gerekli olmayan ek karakteristik özelliklerle tutarlı şekilde bağlantılı olan mutasyonlara sahip genleri içerir.	59
1	Kategori 1.1	Bağımsız tekrarlanma ile doğrulanmış, kontrollere göre mutasyon sıklığı açısından istatistiksel olarak önemli olan tekrarlayan ve tatmin edici kanıtlara sahip mutasyonları gösterilmiş genleri içerir.	24
	Kategori 1.2	İlişkilendirme çalışmalarından elde edilen sonuçlarla anlamlılığa ulaşmış tek genin benzersiz şekilde rol oynadığı ve bağımsız olarak tekrarlanmış veya güncel ilişkilendirme çalışmalarının meta-analizi yoluyla genom çapı anlamlılığa ulaşmış genleri içerir. *	
2	Kategori 2.1	Bağımsız tekrarlanmanın (replikasyonun) gerekli olmadığı, kontrollerle güçlü istatistiksel karşılaştırmalarının yapılması sonucu tekrarlayıcı ve tatmin edici nadir mutasyonlara sahip olduğu bulunan genleri içerir.	59
	Kategori 2.2	İlişkilendirme çalışmalarından elde edilen sonuçlarla anlamlılığa ulaşmış tek genin benzersiz şekilde rol oynadığı ve ancak bağımsız olarak tekrarlanmamış genleri içerir.	
	Kategori 2.3	Tutarlı olarak tekrarlanan aynı allelde yer alan ve insanlar için fonksiyonel etkiye sahip olduğuna dair kanıtlarının olduğu risk varyantları içeren ancak genom-boyu anlamlılığının önemsiz olan genleri içerir.	
3	Kategori 3.1	Kategori 4.1, 4.2 ve 4.3 ölçütlerinden en az ikisini karşılayan, ya da bu ölçütlerden birini karşılayıp en az bir ilave kanıtı sahip genleri içerir.	169
	Kategori 3.2	Eşlik kanıt olmadan kategori 2.3 ölçütlerini karşılayan genleri içerir.	
	Kategori 3.3	İki ya da daha fazla ilişkisiz olguda bozucu olması muhtemel nadir <i>de novo</i> varyantlara sahip genleri içerir.	
4 **	Kategori 4.1	Başka herhangi bir bağımsız kanıtın bulunmadığı çok genli CNV'de yer alan herhangi bir gen bu kategoride yer alır.	339
	Kategori 4.2	Kategori 1 veya 2'nin ölçütlerini karşılamayan genom-boyunda anlamlı genler arası varyantlara yakın genleri içerir.	
	Kategori 4.3	Anlamlı, ikna edici, ancak tekrarlanmamış ilişkilendirme çalışması verileriyle birlikte, birden çok ama tutarsız ilişki raporları ve meta-analizlerde genel olarak anlamlı olmayan genleri içerir.	
	Kategori 4.4	Kontrollerle kesin bir istatistiksel karşılaştırmaların yapılmadığı belirlenen iki veya daha fazla varsayılan mutasyona sahip genleri içerir.	
	Kategori 4.5	Bozucu olması muhtemel tek nadir <i>de novo</i> varyantları içeren genleri içerir.	
5	Kategori 5.1	İnsan çalışmalarından gelen destek olmadan yalnızca model organizmalarla yapılan çalışmalardan gelen kanıtların olduğu genleri içerir.	142
	Kategori 5.2	Bir bağlantı bölgesinde yer alan ancak hakkında yakın bölgelerde yer alan genlerdeki göre eşsiz bir kanıt bulunmayan genleri içerir.	
	Kategori 5.3	Yalnızca kategori 1-3'deki genler ile etkileşime giren genleri içerir.	
	Kategori 5.4	Tek bir OSB olgusunda/ailesinde gözlenen nadir bir varyanta sahip genleri içerir.	
6	Kategori 6	Bu kategoride yer alan genler ile ilgili kanıtlar bu genlerin otizmde rolü olmadığını desteklemektedir.	19

*Bahsedilen genom-boyu anlamlılığa ulaşmış varyant genler arası (*intergenic*) bölgede ise, bu varyantın güçlü bağlantı dengesizliği (LD: *linkage disequilibrium*) gösterdiği yakınlardaki tek komşu gen varsa veya bu varyantın ekspresyonunu önemli şekilde değiştirdiği bir gen varsa bu genler de Kategori 1.2'de yer almaktadır. ** Kategori 4'de yer alan genlerden bazılarının herhangi bir dokuda kontrollere oranla artmış ekspresyonunun gösterilmesi, DEHB, OSB-ilişkili endofenotipler (ör. dil bozukluğu), BB, epilepsi, ZY ve şizofreni gibi fenotipler ve bozuklukların gelişimi ile ilgili önemli kanıtlarının olması, diğer bir genle genetik epistaksis yoluyla OSB ile ilişkili olduğunun gösterilmesi gibi bazı ilave kanıtlarla birlikte kategori 3'e kadar çıkabilir. Tablodaki bilgiler (<https://gene.sfari.org/about-gene-scoring/>) web adresinden alınmıştır (267).

4.5.2. RNA dizileme (RNA-seq) verilerinin değerlendirilmesi

RNA-seq verilerini değerlendirmek için ilk aşamada Illumina'nın iGenomes kaynağından (https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html) Ensembl GRCh37 insan referans genom ve indeksleri indirildi (ftp://igenome:G3nom3s4u@ussd-ftp.illumina.com/Homo_sapiens/Ensembl/GRCh37/Homo_sapiens_Ensembl_GRCh37.tar.gz). Daha önce yapılan RNA-seq'den elde edilen kısa okumaların referans genoma hizalanması ve bu diziler içindeki transkriptlerin tanımlanarak ifade düzeyinin belirlenmesi *rsem-calculate-expression* (-p 6 --bowtie2 --paired-end/) komutu kullanılarak yapıldı. Bu genlerin eş ifade ağının oluşturulabilmesi için WGCNA R paketinden yararlanıldı. WGCNA paketi, hücrede bulunan transkriptlerin farklı örneklerden alınan transkriptomlardaki seviyelerinin ortak şekilde değişimlerini temel alarak birlikte çalıştığı öngörülen genlerin modüllere ayrılmasını sağlayan bir araçtır. RSEM'den alınan çıktıların analizi için ilk aşama olarak örneklerin hiyerarşik kümeleme dendrogramı oluşturuldu ve diğer örneklerden uzaklık gösteren değerli örnek (A1Ç2) daha sonraki analizlerden çıkarıldı (Şekil 7). Daha sonra WGCNA'nın *blockwiseModules* komutu kullanılarak genler ağ modüllerine ayrıldı. ÇODÖ skorlarını ve ODKL alt skorlarını ayrı ayrı hesaplayıp bu skorların farklı modüllerle korelasyonu WGCNA kullanılarak hesaplandı ve modül-skor ilişkilerini gösteren ısı haritası oluşturuldu (Şekil 11 ve 12). Örneklerde bulunan genler modül üyeliklerine göre ayrıldı ve her modülde bulunan genlerin ortak *Gene Ontology* terim zenginleştirilmesi DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) web sitesi (sürüm 6.8, <https://david.ncifcrf.gov>) kullanılarak gerçekleştirildi ve modüllerdeki genlerin hücrede yer aldıkları biyolojik süreçler belirlendi.

4.6. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 24.03.2016 tarih, 2016/06-01 sayılı karar numarası ile onaylanmıştır.

5. BULGULAR

5.1. Gönüllülerin özellikleri

Aile 1'in örneklemini sağlıklı anne-baba ve biri kız diğeri erkek 5 yaşında ikiz kardeşlerden oluşmaktaydı. Ailenin başka çocukları yoktu. Birinci çocuk (A1Ç1), erkek, 1,5 yaşından beri OSB tanısı ile izlenmekteydi. 2 yaşından beri haftada 2 kez olacak şekilde özel eğitime devam etmekte ve ayrıca Risperidon tedavisi almaktaydı. Olgunun eşlik eden ZY ve DEHB tanıları mevcuttu. Nöbet öyküsü olmayan olgunun çekilen videolu EEG¹⁷³'sinde anormallik ve çekilen MRG¹⁷⁴'de anormallik saptanmıştı. Özgeçmişinde prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı ve doğum komplikasyonu gibi risk etkenleri mevcut değildi. Gelişim basamaklarında, motor gelişiminde gecikme bulunmayan olgunun konuşma becerisi ve tuvalet eğitimi kazanılmamıştı. Regresyon öyküsü bulunmamaktaydı. İkinci çocuk (A1Ç2) ise, kız, 2,5 yaşından beri OSB tanısı ile izlenmekteydi. Tanı aldığı dönemden beri haftada 2 gün olacak şekilde ÖE almakta ve ayrıca Risperidon tedavisi kullanmaktaydı. Olgunun OSB tanısına klinik olarak ZY tanısı da eşlik etmekteydi. Geçirilmiş nöbet öyküsü olmayan olgunun önceden çekilen videolu EEG'si normal saptanmıştı. Özgeçmişinde risk etkeni olarak düşük doğum ağırlığı mevcuttu. Gelişim basamaklarında motor gelişiminde gecikme bulunan olgunun konuşması son 1 yıl içinde 1-2 kelime olacak şekilde kazanılmıştı ve tuvalet eğitimi mevcuttu. Regresyon öyküsü ise bulunmamaktaydı. Aile 1'deki anne-babalarda OSA sonuçlarına göre GOF düşünülmeydi.

Tablo 11: Aile 1'de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri

	ÇODÖ	ODKL	ZY	DEHB	epilepsi	konuşma	regresyon
A1Ç1	45,5	69	+	+	EEG'de anormallik	-	-
A1Ç2	43	83	+	-	-	1-2 kelime	-

¹⁷³ EEG: Elektroensefalografi

¹⁷⁴ MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

Aile 2'nin örnekleme sağlıklı anne-baba ve 7 yaşında ikiz iki erkek kardeşten oluşmaktaydı. Ailenin başka çocukları mevcut değildi ve annenin gebeliği IVF tedavisi ile meydana gelmişti. Birinci çocuk (A2Ç1), 3 yaşından beri OSB tanısı ile takip edilmekte ve haftada 2 gün olacak şekilde ÖE'e devam etmekteydi. Ayrıca Risperidon ve Aripiprazol tedavisi almaktaydı. Nöbet öyküsü olmayan olgunun eşlik eden ZY ve DEHB tanıları mevcuttu. Özgeçmişinde risk etkeni olarak prematüre doğum bulunmayan olgunun düşük doğum ağırlığı mevcuttu. Gelişim basamaklarından motor gelişiminde gecikme bulunmayan olgunun konuşma becerisi ve tuvalet eğitimi ise kazanılmamıştı. Olgunun regresyon öyküsü mevcuttu. İkinci çocuk (A2Ç2) ise daha önceden gelişim geriliği tanısı ile takip edilmekle birlikte 6 yaşından beri OSB tanısı ile izlenmekteydi. 6 yaşından beri haftada 2saat olacak şekilde özel eğitim almaktaydı. Olgunun eşlik eden ZY tanısı mevcuttu. Gelişim basamaklarından motor gelişiminde gecikme bulunmayan olgunun konuşma becerisi 5 yaşında kazanılmaya başlamış ve bu sene bir iki cümle kurabilecek düzeyde gelişmişti. Olgunun tuvalet eğitimi ise kazanılmıştı. Olgunun regresyon öyküsü bulunmamaktaydı. OSA sonuçlarına göre annede GOF olabileceği düşünüldü.

Tablo 12: Aile 2'de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri

	ÇODÖ	ODKL	ZY	DEHB	epilepsi	konusma	regresyon
A2Ç1	51	110	+	+	-	-	+
A2Ç2	40	86	+	-	-	1-2 cümle	-

Aile 3'ün örnekleme ise sağlıklı anne-baba ve biri kız diğeri erkek 11 yaşında ikiz kardeşlerden oluşmaktaydı. Ailenin başka çocuğu bulunmamaktaydı. Birinci çocuk (A1Ç1), 11 yaşında erkek, 2 yaşından beri OSB tanısı ile izlenmekte ve 2 yaşından beri haftada 20-40 saat olacak şekilde özel eğitim almaktaydı. Olgunun eşlik eden ZY ve konjenital hipotiroidi tanıları mevcuttu. Olgu Levotiroksin tedavisi almaktaydı. Nöbet öyküsü olmayan olgunun daha önce videolu EEG'si çekilmemişti. Çekilen MRG normal saptanmıştı. Özgeçmişinde prematüre doğum, düşük doğum ağırlığı gibi risk etkenlerii mevcut değildi. Gelişim basamaklarında, motor gelişiminde gecikme bulunmayan olgunun konuşma becerisi 4 yaşında başlamış olmakla birlikte kullandığı kelime sayısı on kadar olup cümle kurma becerisi kazanılmamıştı. Olgunun tuvalet eğitimi ise gecikmeli olarak kazanılmıştı. Olgunun ılımlı regresyon öyküsü mevcuttu.

İkinci kardeş ise (A3Ç2), kız, 2 yaşından beri OSB tanısı ile takip edilmekte ve 2 yaşından beri haftada 20-40 saat olacak şekilde özel eğitim almaktaydı. Olgunun eşlik eden ZY ve konjenital hipotiroidi tanıları mevcuttu. Nöbet öyküsü olmayan olgunun önceden çekilen videolu EEG'si ve MRG görüntülemesi normal saptanmıştı. Özgeçmişinde ise düşük doğum ağırlığı öyküsü mevcuttu. Gelişim basamaklarında motor gelişimde gecikme bulunmayan olgunun konuşması 7 yaşında kelime, 8 yaşında ise basit cümle kurabilecek şekilde gelişmişti. Olgunun tuvalet eğitimi mevcuttu ve ılımlı regresyon öyküsü bulunmaktaydı. OSA sonuçlarına göre babada GOF olabileceği düşünüldü.

Tablo 13: Aile 3’de ikiz çocuk ve ergenlerin ölçek puanları, eşlik eden tanıları ve özellikleri

	ÇODÖ	ODKL	ZY	DEHB	epilepsi	konusma	regresyon
A3Ç1	47	48	+	+	-	10 kelime	+
A3Ç2	33,5	14	+	-	-	+	+

5.2. Tüm Genom Dizileme (WGS) ile edilen edilen SNP ve *indel* sonuçları

Çalışmaya katılan tüm bireylerin WGS analizi sonucunda oldukça yüksek çıktıtlı veri elde edildiği için öncelikle nadir varyantların (SNP ve *indel*) yorumlanmasına odaklanıldı. Yöntemde hem nadir ve etki gücü yüksek varyantları saptamak hem de NGS teknolojilerinin doğasından kaynaklanan okuma ve haritalama hataları en aza indirmek için yapılan filtrelemelerden sonra elde edilen toplam SNP ve *indel* sayısı Tablo 14’de belirtilmiştir. Bunlardan daha önce dbSNP’te yer alan ve almayan (yeni) varyantların sayısı ile etki gücü “yüksek” ve “orta” olanların sayısı da tabloda gösterilmektedir.

Toplam varyantlardan da yalnızca SFARI Gen veritabanındaki genlerle ilişkili olanlar kategorilere göre (Kategori 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve sınıflandırılmayan) ayrı ayrı çıkarılmış Tablo 15’de gösterilmiştir. Her bir bireydeki kategori 1,2 ve 3’deki genlerle ilişkili varyantlarının listesi ise Tablo 16-18’de kromozom sırasıyla verilmiştir. Varyantların yorumlanması en güçlü kanıt düzeyine sahip kategori 1’den başlayarak kategori 3’e kadar olan genlerdeki varyantlar değerlendirilerek yapılmıştır.

Tablo 14: Her bir bireyin filtrelenmiş varyantlarının listesi

	toplam SNV ve <i>indel</i> sayısı	dbSNP'deki SNP'ler	yeni	“yüksek” etki güçlü SNV ve <i>indel</i> 'ler	“orta” etki güçlü SNV ve <i>indel</i> 'ler	“yüksek” etki güçlü <i>de novo</i> SNV ve <i>indel</i> 'ler	“orta” etki güçlü <i>de novo</i> SNV ve <i>indel</i> 'ler
AİLE 1							
A1A	7152	6427	725	830	6322		
A1B	6726	6074	652	803	5923	Toplam	Toplam
A1Ç1	7068	6374	694	814	6254	101	663
A1Ç2	6893	6233	660	825	6068		
AİLE 2							
A2A	6865	6235	630	787	6078		
A2B	6931	6277	654	745	6186	Toplam	Toplam
A2Ç1	7191	6517	674	818	6373	116	688
A2Ç2	6936	6227	709	757	6179		
AİLE 3							
A3A	7273	6643	630	712	5931		
A3B	6711	6119	592	754	5957	Toplam	Toplam
A3Ç1	6958	6297	661	770	6188	667	101
A3Ç2	7110	6487	623	785	6325		

Tablo 15: Her bir bireyin SFARI kategorisine göre filtrelenmiş varyantlarının toplam sayısı

		SFARI KATEGORİSİ						
	etki gücü	1	2	3	4	5	6	sınıflandırılmayan
A1A	yüksek	-	3	3	21	-	-	8
	orta	3	24	40	159	16	3	56
A1B	yüksek	-	4	-	11	-	-	3
	orta	5	21	31	121	20	2	50
A1Ç1	yüksek	1	3	-	15	-	-	11
	orta	4	16	44	147	19	2	55
A1Ç2	yüksek	-	3	1	13	-	-	7
	orta	5	22	39	150	18	3	50
A2A	yüksek	-	3	2	11	-	-	13
	orta	7	24	37	152	18	1	69
A2B	yüksek	-	2	4	12	-	-	12
	orta	6	17	39	163	4	1	71
A2Ç1	yüksek	1	3	3	16	-	-	11
	orta	7	18	35	152	24	1	54
A2Ç2	yüksek	-	2	3	18	-	-	10
	orta	4	21	38	168	21	-	78
A3A	yüksek	-	1	1	21	-	-	12
	orta	4	19	39	188	26	1	67
A3B	yüksek	-	3	1	13	-	-	2
	orta	6	14	33	152	31	3	65
A3Ç1	yüksek	-	1	2	10	-	-	3
	orta	2	19	37	166	27	1	73
A3Ç2	yüksek	-	4	2	20	-	-	7
	orta	2	21	40	174	33	1	65

Tablo 16’de gösterilen OSB tanılı etkilenmiş çocuklarda bulunan SFARI gen kategori 1’deki genlere ait varyantlardan ASH1L, SETD5, ANK2, NAA15, SYNGAP1, ARID1B, RELN, CHD8, ASXL3, DSCAM, DYRK1A ve SHANK3 genlerinde yer alanlar aday varyant olma olasılığı açısından değerlendirilmiştir. Bunlardan SYNGAP1, RELN ve ASXL3 genlerindeki aday varyant olarak belirlenmiştir. SYNGAP1 geninde saptanan varyant ilginç olarak iki farklı ailenin birer çocuğunda (A1Ç1 ve A2Ç1) ortak ve *de novo* ortaya çıkmıştır. Bu varyant *indel* tipinde olup çerçeve kayması ile sonuçlandığı için “yüksek” riskli olarak sınıflandırılmıştır. RELN genindeki aday varyant ikinci ailedeki GOF özellikleri gösteren anneden (A2A) her iki çocuğuna da kalıtılmıştır. Bu varyant SNV tipinde olup proteinde bir aminoasitin değişmesine neden olan yanlış anlamlı bir varyanttır ve bu nedenle “orta” etki gücünde olduğu kabul edilmektedir. Birinci ailenin yalnızca bir çocuğunda (A1Ç1) saptanan ASXL3 genindeki varyantın da *de novo* ortaya çıktığı dikkat çekmektedir. Yine *indel* tipindeki bu varyant bir “korunmuş çerçeve içi” varyanttır.

Tablo 17’de gösterilen OSB tanılı etkilenmiş çocuklarda bulunan SFARI gen kategori 2’deki genlere ait varyantlardan ILF2, KDM5B, BAZ2B, SCN9A, GIGYF2, FOXP1, TBL1XR1, KMT2C, CNTNAP2, MET, WAC, SHANK2, SMARCC2, USP15, GRIP1, INTS6, IRF2BPL, MAGEL2, GABRB3, CHD2, CACNA1H, ANKRD11, MBOAT7, TCF20 ve DDX3X genlerinde yer alanlar aday varyant olasılığı açısından değerlendirilmiştir. Bunlardan KDM5B, MET, GRIP1, TCF20 genlerindeki aday varyant olarak belirlenmiştir. KDM5B’de yer alan SNV tipinde olup proteinin bir aminoasitin değişmesi ile sonuçlanan “yanlış anlamlı” bir varyanttır. GOF özellikleri gösteren anneden (A2A) her iki çocuğuna kalıtılmıştır. MET geninde yer alan varyant yine proteinde bir aminoasitin değişimi ile sonuçlanan SNV tipi bir varyanttır ve GOF özellikleri gösteren babadan (A3B) çocuklarına kalıtılmıştır. GRIP1 geninde yer alan varyant ise birinci ailedeki etkilenmemiş olduğu düşünülen anneden (A1A) ikinci çocuğuna (A1Ç2) kalıtılmıştır. Yine SNV tipinde olan bu varyant proteindeki bir aminoasitin değişmesine neden olan “yanlış anlamlı” bir varyanttır.

Tablo 18’de gösterilen OSB tanılı etkilenmiş çocuklarda bulunan SFARI gen kategori 3’deki genlere ait varyantlardan AMPP1, HIVEP3, PYHIN1, DISC1, ADCY3, DPP10, CLASP1, MBD5, ZNF804A, HECW2, VIL1, ROBO2, SETD2, PLXNB1, AMT, ZBTB20, CEP135, TET2, SEMA5A, RBM27, KIAA1586, PHIP, GRIK2, GIGYF1, KMT2E, AKAP9,

ACHE, LAMB1, PLXNA4, TBC1D31, TRAPPC9, DOCK8, PAX5, PHF2, EHMT1, CACNB2, ANK3, TCF7L2, NAV2, PHRF1, TRPC6, PRICKLE1, PAH, HECTD4, EP400, GPHN, NRXN3, UNC79, ATP10A, CYFIP1, TRPM1, FBN1, MYO5A, CGNL1, RBFOX1, CNTNAP4, WWOX, CHAMP1A, SLC38A10, KDM6B, ZC3H4, CNOT3, PLCB1, SLC12A5, MACROD2, NINL, DIP2A, PROHD, NLGN4X, CNKSR2, KDM5C ve KIAA2022 genlerinde yer alanlar aday varyant olasılığı açısından değerlendirilmiştir. Bunlardan DISC1, MBD5, ZNF804A, GIGYF1, KMT2E, NAV2, UNC79, ATP10A ve PLCB1 genlerindeki aday varyant olarak değerlendirilmiştir. DISC1, ZNF804A, NAV2, ATP10A ve PLCB1 ikinci ailede, MBD5, GIGYF1, KMT2E ve UNC79 ve PLCB1 üçüncü ailede saptanmıştır.



Tablo 16: Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 1’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi

Kr.	etki gücü	A1A	A1B	A1Ç1	A1Ç2	A2A	A2B	A2Ç1	A2Ç2	A3A	A3B	A3Ç1	A3Ç2
1	Y												
	O						ASH1L	ASH1L	ASH1L	ASH1L	POGZ		
2	Y												
	O	MYT1L								MYT1L TRIP12	MYT1L TRIP12		
3	Y												
	O			SETD5		SETD5	SETD5	SETD5	SETD5			SETD5	
4	Y												
	O		ANK2 NAA15		ANK2 NAA15								
6	Y			SYNGAP1				SYNGAP1					
	O					SYNGAP1 ARID1B ARID1B ARID1B		SYNGAP1			ARID1B		ARID1B
7	Y												
	O	RELN?	RELN	RELN	RELN RELN	RELN?	RELN	RELN	RELN		RELN?		
						RELN		RELN	RELN				
14	Y												
	O						CHD8	CHD8					
18	Y												
	O			ASXL3									
20	Y												
	O	DSCAM		DSCAM									
21	Y												
	O						DYRK1A	DYRK1A		DYRK1A	DYRK1A	DYRK1A	DYRK1A
22	Y												
	O		SHANK3 SHANK3		SHANK3		SHANK3						

*Kr. kromozomlar **Y: yüksek ***O: orta ****koyu yazılanlar: homozigot *****aynı varyantlar tabloda aynı hizada yazılmıştır.

Tablo 17: Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 2’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi

Kr.	etki gücü	A1A	A1B	A1Ç1	A1Ç2	A2A	A2B	A2Ç1	A2Ç2	A3A	A3B	A3Ç1	A3Ç2
1	Y												
	O					ILF2 KDM5B		ILF2 KDM5B	KDM5B				
2	Y												
	O	BAZ2B GIGYF2	BAZ2B SCN9A GIGYF2		GIGYF2	SCN9A	BAZ2B	BAZ2B	BAZ2B SCN9A	BAZ2B BAZ2B GIGYF2	BAZ2B	BAZ2B GIGYF2	BAZ2B
3	Y												
	O	CNTN4 FOXP1			FOXP1	FOXP1	FOXP1		FOXP1 TBL1XR1		FOXP1	FOXP1	
7	Y		KMT2C			KMT2C	KMT2C	KMT2C			KMT2C		KMT2C
		CNTNAP2	CNTNAP2		CNTNAP2	CNTNAP2					KMT2C		
	O	MET					CNTNAP2		, CNTNAP2		MET	MET	MET
		KMT2C			KMT2C	KMT2C KMT2C			KMT2C KMT2C		KMT2C	KMT2C	KMT2C
		KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C		KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C	KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C KMT2C
		KMT2C		KMT2C KMT2C	KMT2C					KMT2C			KMT2C
			KMT2C										

10	Y												
	O		WAC	WAC	WAC	WAC			WAC	WAC	WAC	WAC	WAC
11	Y	SHANK2	SHANK2		SHANK2	SHANK2	SHANK2	SHANK2	SHANK2		SHANK2	SHANK2	SHANK2
	O		SHANK2		SHANK2		SHANK2	SHANK2	SHANK2	SHANK2		SHANK2	SHANK2
12	Y												
	O	SMARCC2 GRIP1 GRIP1	SMARCC2 SMARCC2 USP15	SMARCC2 USP15 GRIP1	SMARCC2 SMARCC2 USP15 GRIP1	SMARCC2 SMARCC2	SMARCC2 USP15	SMARCC2	SMARCC2	SMARCC2 SMARCC2	SMARCC2 SMARCC2	SMARCC2 SMARCC2	SMARCC2 SMARCC2
13	Y												
	O					INTS6		INTS6	INTS6		INTS6	INTS6	
14	Y							IRF2BPL	IRF2BPL		IRF2BPL		IRF2BPL???
	O									IRF2BPL			IRF2BPL
15	Y												
	O	MAGEL2 GABRB3 GABRB3	GABRB3 CHD2	GABRB3 CHD2	MAGEL2 GABRB3 GABRB3	MAGEL2 GABRB3 CHD2	GABRB3 CHD2	GABRB3 CHD2	MAGEL2 CHD2		GABRB3	GABRB3	GABRB3
16	Y												
	O	ANKRD11	BCKDK ANKRD11	ANKRD11	ANKRD11	ANKRD11	CACNA1H	CACNA1H		SRCAP ANKRD11	ANKRD11	ANKRD11	SRCAP ANKRD11
19	Y												
	O	CIC MBOAT7		MBOAT7	MBOAT7								
22	Y												
	O	TNRC6B									TCF20	TCF20	TCF20
X	Y	DDX3X	DDX3X		DDX3X					DDX3X			DDX3X
	O												

Tablo 18: Her bir bireyin SFARI gen veri tabanına göre kategori 3’de yer alan filtrelenmiş varyantlarının listesi

Kr.	etki gücü	A1A	A1B	A1Ç1	A1Ç2	A2A	A2B	A2Ç1	A2Ç2	A3A	A3B	A3Ç1	A3Ç2
1	Y						AMPD1	AMPD1					
	O	HIVEP3 PYHIN1 PYHIN1 DISC1 DISC1	HIVEP3 HIVEP3	HIVEP3 HIVEP3 PYHIN1 PYHIN1 DISC1 DISC1	HIVEP3 HIVEP3 PYHIN1 DISC1 DISC1	HIVEP3 PYHIN1 DISC1	HIVEP3	HIVEP3	HIVEP3 DISC1	HIVEP3 PYHIN1	HIVEP3 PYHIN1	HIVEP3	PYHIN1
2	Y												
	O	DNMT3A	DPP10			ADCY3 ZNF804A HECW2	CLASP1 ZNF804A PAR3B PER2	ADCY3 ZNF804A ZNF804A	ADCY3 CLASP1 ZNF804A HECW2	DPP10 CLASP1 ZNF804A VIL1	MBD5 VIL1	DPP10 CLASP1 MBD5 VIL1 VIL1	CLASP1 ZNF804A VIL1 VIL1
3	Y	ROBO2			ROBO2				ROBO2	ROBO2			ROBO2
	O	ZBTB20 ZBTB20	PLXNB1 AMT ZBTB20 ZBTB20	PLXNB1 AMT ZBTB20 ZBTB20	ZBTB20 ZBTB20	ZBTB20	SETD2 ZBTB20 ZBTB20	SETD2 ZBTB20 ZBTB20	ZBTB20	ZBTB20	ZBTB20	ZBTB20 ZBTB20	ZBTB20
4	Y												
	O	TET2 TET2		TET2 TET2	TET2 TET2	CEP135 TET2	TET2 TET2 TET2	CEP135 TET2	CEP135 TET2 TET2				
5	Y												
	O	SEMA5A		SEMA5A	SEMA5A		SLC6A3 RBM27		RBM27	SEMA5A RBM27 RBM27	RBM27	RBM27	RBM27 RBM27

6	Y												
	O	KIAA1586 GRIK2	PHIP	GRIK2	KIAA1586 PHIP GRIK2	PTK7 GRIK2 GRIK2	GRIK2 GRIK2	GRIK2 GRIK2	GRIK2	CUL7		GRIK2 GRIK2	
7	Y	KMT2E									GIGYF1	GIGYF1 KMT2E	GIGYF1
	O	LAMB1 UBE3C	AKAP9 GIGYF1	LAMB1	KMT2E	LAMB1 PLXNA4	AKAP9 AKAP9 LAMB1	AKAP9 LAMB1 LAMB1	AKAP9 LAMB1 PLXNA4	AKAP9 GIGYF1 ACHE LAMB1	AKAP9 AKAP9 ACHE FOXP2 LAMB1 LAMB1	AKAP9 AKAP9 GIGYF1 LAMB1	AKAP9 AKAP9 ACHE LAMB1 LAMB1
8	Y												
	O	TRAPPC9	TRAPPC9	TRAPPC9		TRAPPC9	TRAPPC9			TRAPPC9	TBC1D31	TBC1D31 TRAPPC9	TBC1D31
9	Y												
	O	DOCK8 PHF2 EHMT1	DOCK8 PHF2 PHF2	DOCK8 DOCK8 PHF2 PHF2 EHMT1	DOCK8 DOCK8 PHF2	PHF2	PAX5 PHF2	PHF2	PAX5 PHF2	DOCK8 PHF2	DOCK8 DOCK8 DOCK8 PHF2	DOCK8 DOCK8 DOCK8 PHF2	DOCK8 DOCK8 DOCK8 PHF2
10	Y						CACNB2						
	O	ANK3 TCF7L2 TCF7L2	CACNB2		ANK3 TCF7L2 TCF7L2	CACNB2 ANK3 TCF7L2 TCF7L2		TCF7L2 TCF7L2	CACNB2 TCF7L2	CACNB2 CACNB2		TCF7L2 TCF7L2	TCF7L2 TCF7L2

11	Y						NAV2	NAV2					
	O	PHRF1			PHRF1 TRPC6								
12	Y					PRICKLE1							
	O	PAH		PAH HECTD4	PAH HECTD4			HECTD4				HECTD4	HECTD4
		HECTD4	HECTD4			HECTD4	HECTD4 HECTD4	HECTD4 HECTD4					
		EP400			EP400					EP400	EP400 EP400	EP400 EP400	EP400
14	Y												
	O			GPHN				GPHN		GPHN NRXN3	UNC79	GPHN UNC79	NRXN3 UNC79
15	Y					ATP10A			ATP10A				
	O		CYFIP1	CYFIP1		CYFIP1 ATP10A		CYFIP1	ATP10A	CYFIP1			CYFIP1
		ATP10A ATP10A	ATP10A	ATP10A TRPM1	ATP10A TRPM1	ATP10A				ATP10A TRPM1	ATP10A TRPM1 TRPM1	ATP10A TRPM1 TRPM1	ATP10A TRPM1
			CGNL1	CGNL1 CGNL1	CGNL1	MYO5A	FBN1 CGNL1	FBN1 CGNL1	FBN1 MYO5A CGNL1 CGNL1	CGNL1 CGNL1	CGNL1	CGNL1 CGNL1	CGNL1 CGNL1
16	Y												
	O	RBFOX1		RBFOX1	RBFOX1	RBFOX1 RBFOX1		RBFOX1 RBFOX1	RBFOX1 RBFOX1 CNTNAP4 WWOX	RBFOX1 RBFOX1	RBFOX1	RBFOX1	
		CNTNAP4	CNTNAP4	CNTNAP4	CNTNAP4		CNTNAP4			CNTNAP4	CNTNAP4	CNTNAP4	CNTNAP4
		WWOX CHMP1A	CHMP1A	WWOX	WWOX		CHMP1A		CHMP1A				
17	Y						SLC38A10	SLC38A10	SLC38A10				
	O									KDM6B KDM6B			KDM6B KDM6B
		SLC38A10	SLC35B1	SLC35B1 SLC38A10	SLC35B1 SLC38A10		SLC38A10	SLC38A10 SLC38A10	SLC38A10	SLC38A10		SLC38A10	SLC38A10

18	Y						CELF4						
	O			TCF4									
19	Y												
	O		MYO9B MYO9B MYO9B										
		CNOT3		CNOT3	CNOT3	ZC3H4	ZC3H4	ZC3H4		ZC3H4	ZC3H4	ZC3H4	ZC3H4
20	Y												
	O	PLCB1 PLCB1 MACROD2 MACROD2	SLC12A5	PLCB1 PLCB1 PLCB1 SLC12A5 MACROD2	PLCB1 PLCB1	PLCB1 PLCB1 SLC12A5 MACROD2 NINL	 MACROD2 NINL	 MACROD2 NINL	PLCB1 SLC12A5 MACROD2 NINL NINL	MACROD2			
21	Y												
	O										DIP2A	DIP2A	DIP2A
22	Y	PRODH											
	O	PRODH	PRODH	PRODH	PRODH	PRODH	PRODH	PRODH	PRODH PRODH	PRODH			PRODH
X	Y												
	O	NLGN4X KDM5C			NLGN4X				CNKSR2	NLGN4X KIAA2022	KDM5C?		CNKSR2 KDM5C KIAA2022

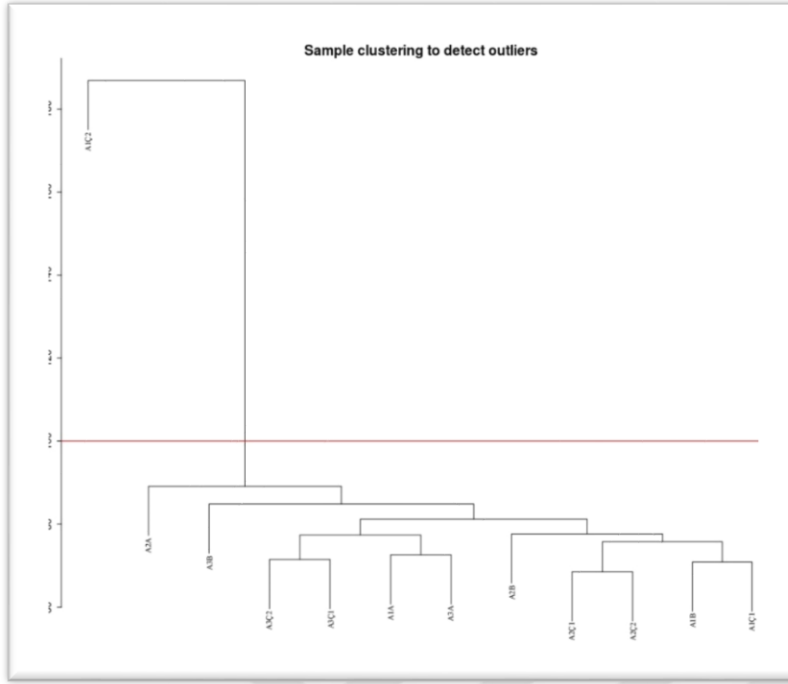
5.3. RNA dizileme (RNA-seq) sonuçları

Yukarıda “RNA-seq verilerinin değerlendirilmesi” başlığı altında detaylı olarak anlatılan yöntemle oluşturulan dendogramlar Şekil 7 ve 8 gösterilmiştir. Şekil 7’de birinci ailede yer alan OSB tanılı etkilenmiş çocuklardan birinin (A1Ç2) diğer tüm bireylere göre daha uzakta yer aldığı görülmektedir (Şekil 7). Bu örnek çıkarıldıktan sonra yeniden yapılan dendograma bakıldığında OSA’ya göre GOF özellikleri gösterdiği saptanmış iki ebeveynin (A2A ve A3B) dendogramda birbirlerine yakın konumlandığı dikkat çekmektedir. İkinci ve üçüncü ailede yer alan kardeşlerin ise yan yana, sağlıklı olduğu düşünülen annelerin (A1A ve A3A) yan yana konumlandığı gözlenmiştir. Ayrıca etkilenmemiş olduğu düşünülen birinci ailedeki babanın (A1B) transkriptomlarının ise etkilenmiş çocuklarından biri ile (A1Ç1) ile yan yana yer almaktadır (Şekil 8).

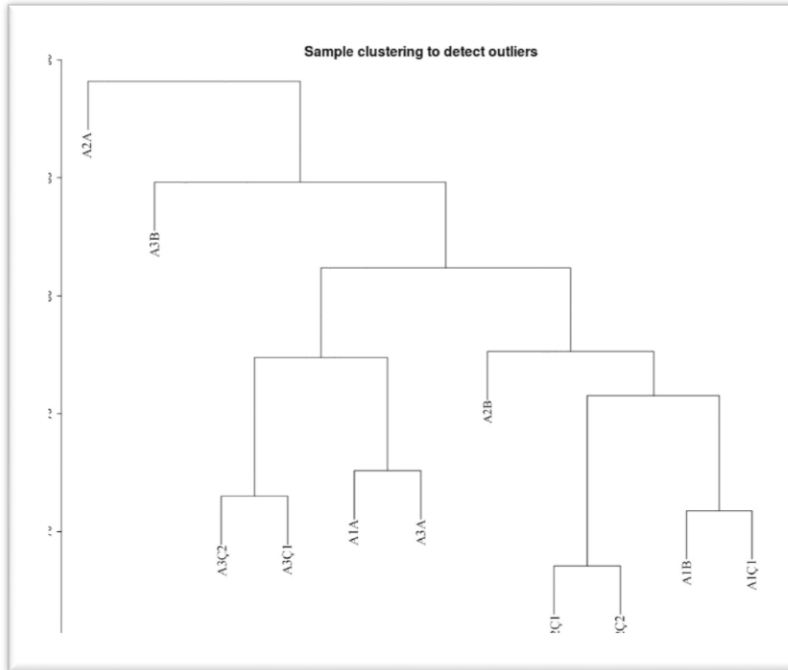
Yine öncelikle tüm örneklerin RNS-seq verileri esas bileşen analizi (PCA)¹⁷⁵ yapılmıştır. Tüm örneklerin yer aldığı ilk analizde dendogramda olduğu gibi birinci ailenin ikinci çocuğuna ait örneğin (A1Ç1) diğerlerinden ayrı konumlandığı dikkat çekmiştir (Şekil 9). Bu nedenle bu örnek analizden çıkarılıp yeniden değerlendirme yapıldığında A1Ç1 ile A2Ç1’in çok yakın yerleştiği görülmektedir. Yine GOF özellikleri gösteren anne (A2A) diğer tüm örneklerden uzakta konumlanmıştır (Şekil 10).

Ayrıca elde edilen transkriptomik verilerin ÇODÖ skorlarını ve ODKL hem toplam hem de alt skorlarının ayrı ayrı hesaplanarak oluşturulan modül-skor ilişkilerini gösteren ısı haritasından yararlanarak (Şekil 11 ve 12) her bir bireyde bulunan genler modül üyeliklerine göre ayrılmıştır. Sonrasında genlerin ortak *Gene Ontology* terim zenginleştirilmesi için büyük sayıda gen listelerinin biyolojik anlamlarını anlamak için oluşturulmuş fonksiyonel anotasyon (açıklama) aracı olan DAVID yazılımı kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizin sonucuna göre özellikle mitokondri ilişkili genlerin rol oynadığı biyolojik süreçlerde zenginleşme olduğu görülmüştür.

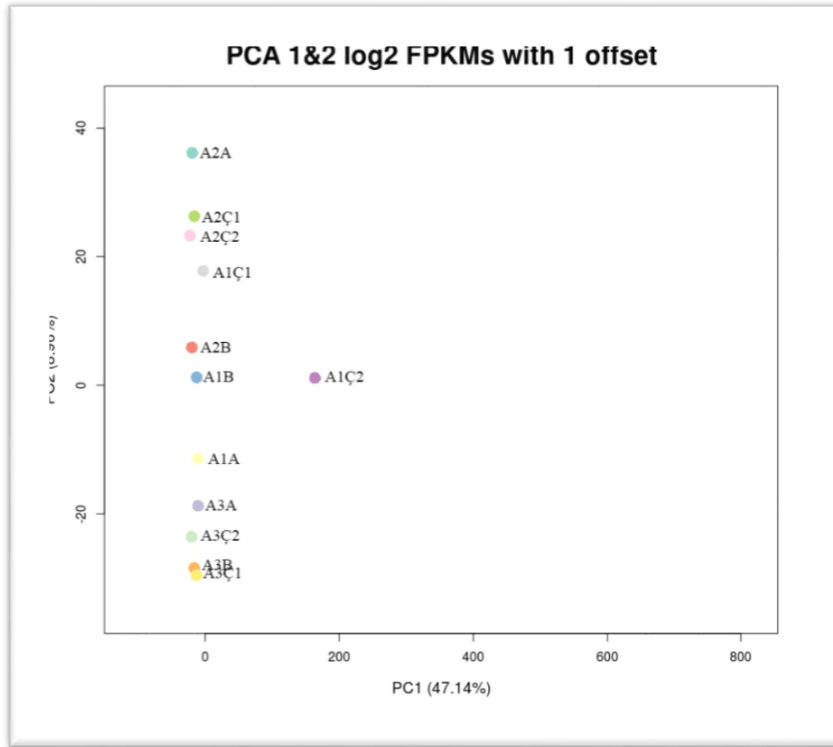
¹⁷⁵ PCA: *Principal component analysis*



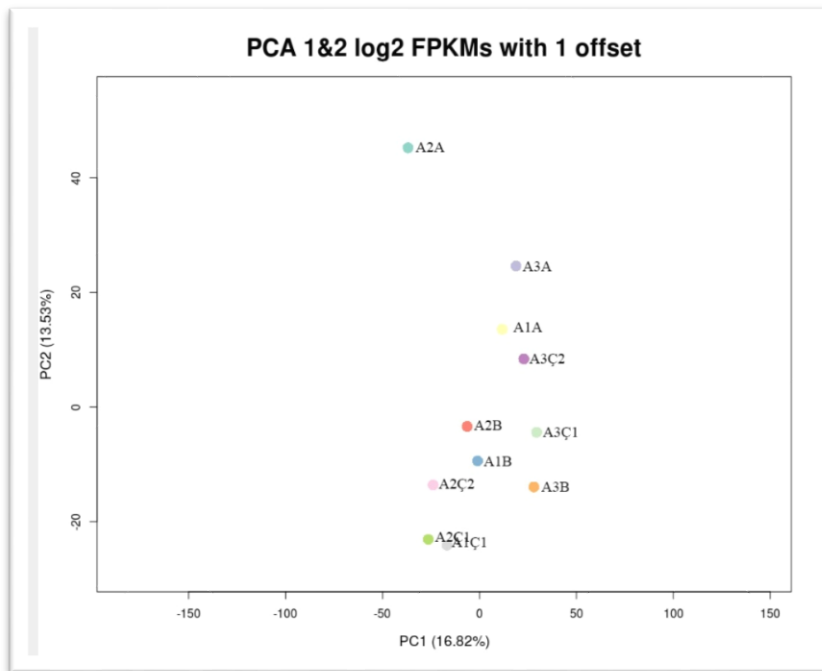
Şekil 7: Transkriptomik veriler ile yapılan ilk dendogram (hiyerarşik kümelenme)



Şekil 8: Transkriptomik veriler ile yapılan ilk dendogramda uzaklık gösteren örnek çıkarıldıktan sonra yapılan dendogram (hiyerarşik kümelenme)

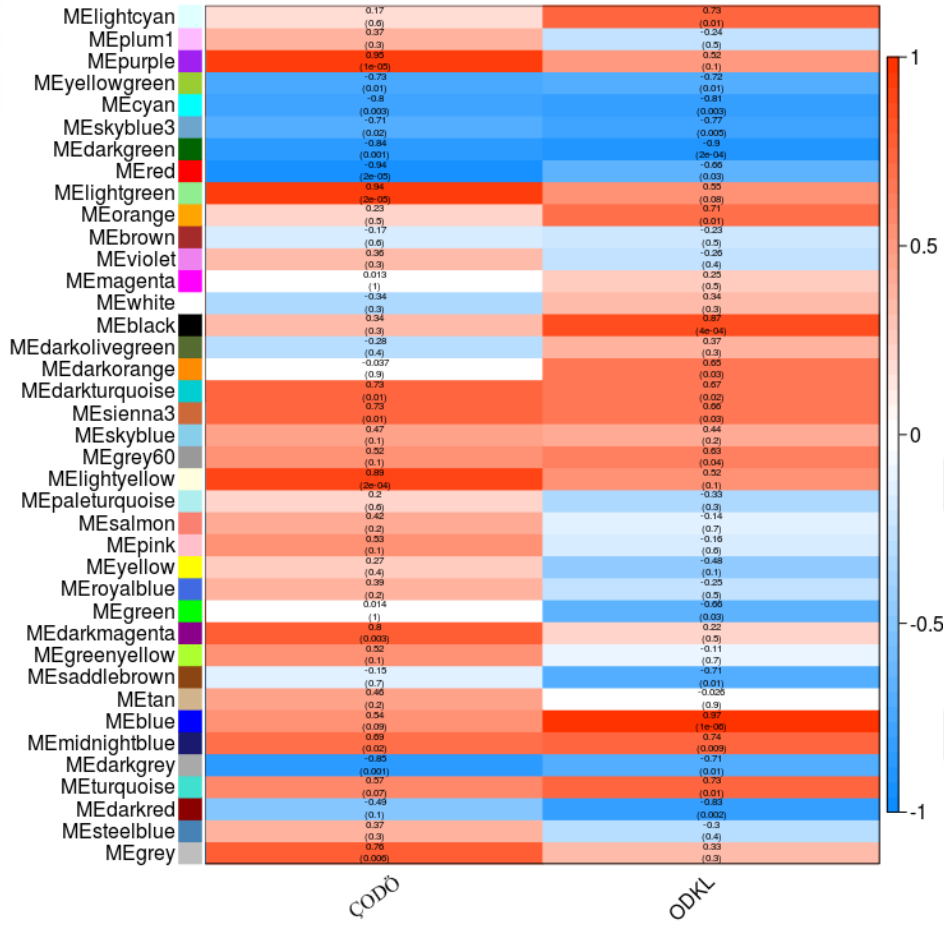


Şekil 9: Esas bileşen analizi 1 (PCA: *Principal component analysis 1*)

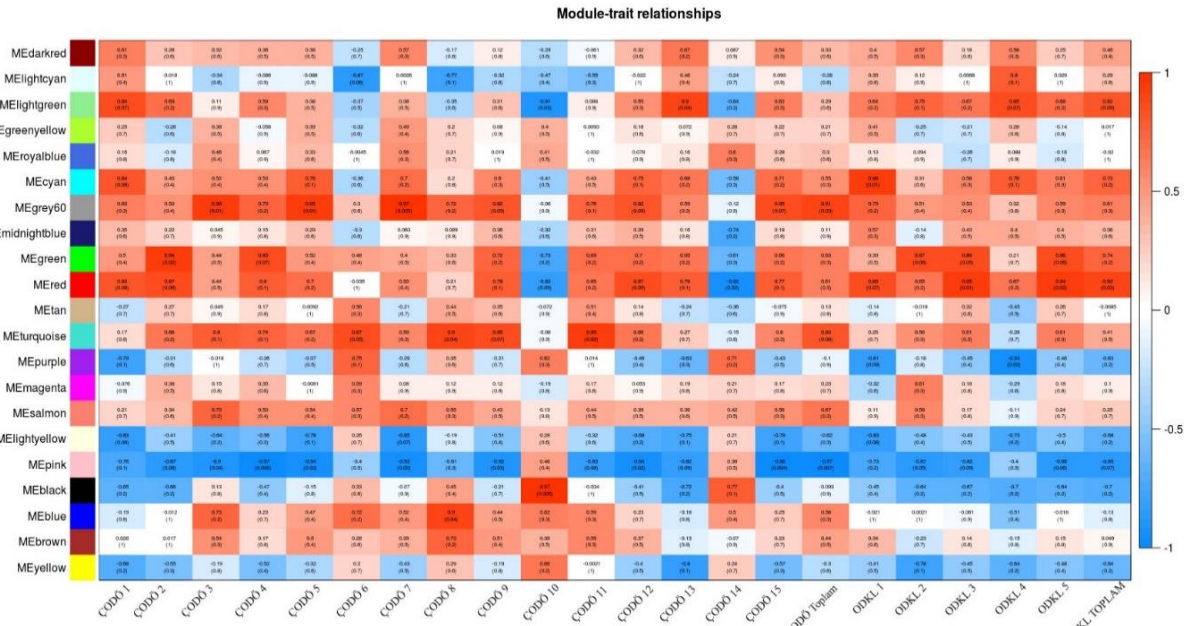


Şekil 10: Esas bileşen analizi 2 (PCA: *Principal component analysis 2*)

Module-trait relationships



Şekil 11: ÇODÖ ve ODKL toplam skorlarına göre oluşturulmuş transkriptomik ısı haritası



Şekil 12: ÇODÖ ve ODKL alt skorlarına göre oluşturulmuş transkriptomik ısı haritası

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada intrauterin epigenetik ve çevresel faktörlerin etkisini en aza indirmek ama aynı zamanda multipleks aile dizaynını oluşturabilmek için OSB tanılı etkilenmiş çocuklar DZ ikizler arasından seçilmiştir. İkizlerle çalışmak OSB risk faktörleri arasında yer alan artmış anne-baba yaşından kaynaklı yan tutmaları önlemek açısından ayrıca avantaj sağlamıştır.

6.1. Genomik veriler

Bu çalışma NGS teknolojilerinden hem WGS hem de RNA-seq yöntemler kullanılarak yapılmış OSB ile ilgili yazındaki ilk çalışmadır. Servis sağlayıcı firmadan gelen WGS ham verileri her bir örnek için 90 Gb büyüklüktedir. Bu kadar yüksek çıktılı ham verileri yorumlamak güçlük oluşturmaktadır ancak aynı zamanda bu pek çok çalışma için eşsiz bir kaynak demektir. Bu nedenle ilk aşamada yalnızca nadir varyantlar ve daha yüksek etki gücü olduğu düşünülen varyantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Bunlardan da SNV ve *indel* tipinde olanlar çalışılmış, OSB tanılı bireylerin %5 ila 10'unda görülen CNV'ler (215) ve yaygın varyantlar ise değerlendirilememiştir.

OSB'nin etiolojisinde hem nadir kalıtsal ve *de novo* varyantlar, hem de yaygın varyantlar sorumludur. Simpleks aile dizaynında daha çok *de novo* mutasyonlara odaklanılırken, multipleks aile modelinde ise nadir kalıtsal varyantlara odaklanılmaktadır. Yaygın varyantların saptanması için ise büyük örneklemli olgo-kontrol tipi çalışmalara ihtiyaç vardır (11). Tüm genom dizisi verisinin elde edilmesini sağlayan WGS yöntemi hem nadir hem de yaygın varyantların saptanabilmesi açısından oldukça avantajlıdır (268). OSB'nin hem kalıtılan hem de *de novo* nedenlerini araştırabilmek için bu çalışmada multipleks aile dizaynı tercih edilmiştir.

Tablo 14'de gösterilen her bir birey için ayrı ayrı hesaplanmış varyant sayılarına bakıldığında OSB tanılı etkilenmiş çocuklar ile etkilenmemiş veya GOF özellikleri sergileyen ebeveynler arasında sayısal açıdan anlamlı farklılık olmadığı dikkat çekmektedir. Elde edilen varyantlardan OSB ile ilişkisi daha önce gösterilmiş olanların saptanabilmesi için SFARI gende yer alan genlerle kesişen varyantlar göz önüne alınmış, bunlardan da kanıt gücü daha yüksek olan Kategori 1-3'dekilerin değerlendirilmesine öncelik verilmiştir. Tablo 16'de SFARI gen

veritabanında yer alan genlerde yer alan toplam varyant listesi verilmiştir. Bu sayısal değerlere bakarak varyantların patojenitesi ile bozukluk tanısı ve/veya şiddeti hakkında yorum yapmak mümkün değildir. Çünkü referans genoma göre daha önce tanımlanmış ya da tanımlanmamış bu varyantların bir kısmı nadir de olsa daha önce benign ya da olası benign olarak tanımlanmış olabilir. Bir kısmı ise Türkiye örnekleminde görece sık olmasına rağmen bu örnekleme içermeyen gnomAD veritabanında görülme sıklığının düşük olması nedeniyle nadir olarak algılanıp filtreye takılmamış olabilir. Bir genetik test karmaşıklıkça hem sağlık hizmeti sağlayıcı klinisyenin hem de klinik laboratuvarın birlikte çalışması gerekmektedir. Örneğin WES ve WGS yöntemler ile elde edilmiş bir varyant eğer nadir, yeni veya *de novo* ise nedensel olduğunu söylemek mümkün olmayabilir. Bu nedenle varyantın hastalık ilişkili, tesadüfi ya da benign olduğunun ayırt edilebilmesi için, varyant ve ilişkili gen ile hastanın ve aile öyküsünün, fiziksel muayenesinin ve önceki laboratuvar testlerinin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle WES ve WGS gibi yöntemler kullanılırken özellikle *de novo* ve resesif kalıtılan varyantları anlamlandırmak için “trio” test olarak adlandırılan üçlü (anne-baba-çocuk), anne veya babadan biri olmadığında ise sağlıklı bir kardeşin dahil edildiği çalışma dizaynı önerilmektedir. OSB etiyolojisindeki birçok varyantın sahip olduğu değişken ekspresyon ve azaltılmış penetrans özelliklerinin yorumlamayı güçleştirmesi nedeniyle klinik bilgi daha da fazla önem kazanmaktadır (265). Bu nedenle bu çalışmada elde edilen varyantları değerlendirirken pek çok değişken göz önüne alınmıştır. Varyantın patojenitesi yorumlanırken çocukların klinik özellikleri ile birlikte anne-babalarının klinik olarak GOF özellikleri gösterip göstermemesi de dikkate alınmıştır. Otizmin doğası gereği multipleks ailelerde çocukların bozukluktan etkilenip ebeveynlerinin ise etkilenmemiş olmasının yalnızca *de novo* ve resesif mutasyonlarla açıklanamayacağı düşünülmüştür. OSB ile ilişkili genlerin özellikleri gereği sağlıklı bir ebeveynde “azalmış (tam olmayan) penetrans gösteren” bir varyantın yanında, GOF özellikleri gösteren bir ebeveynde “değişken ekspresivite” gösteren bir varyant da çocuklarında bozukluğun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir. Bu nedenle varyant yorumlanırken çocuklar kadar ebeveynlerin de klinik bulguları dikkate alınmıştır.

SFARI Gen kategori 1-3’de yer alan genlerdeki ile kesişen varyantlardan (Tablo 16-18) aday olarak düşünülenlerden aşağıda sırayla tartışılmıştır. İlk aday varyant hem A1Ç1 hem de A2Ç2’de saptanan 6. kromozomun 6p21.3 bölgesinde eksprese olan ve SFARI Gen’e göre

kategori 1’de yer alan SYNGAP1¹⁷⁶ genindeki varyanttır. Sinaptik fonksiyonun ana düzenleyicilerinden olan SYNGAP1 proteini yalnızca beyin dokusunda eksprese olmaktadır ve yaklaşık 140 kDa ağırlığındadır. Bu protein beyinde esas olarak sinapslardaki eksitator nöronlarda bulunmakta, inhibitör nöronlarda bulunmamaktadır. İlginç bir şekilde çalışmada iki farklı ailenin birer çocuğunda *de novo* olarak ortaya çıktığı düşünülen iki çocukta da heterozigot olarak bulunan bu varyant *indel* tipi olup, proteinde çerçeve kaymasına (*frameshift*) yol açtığı için “yüksek” riskli varyant olarak sınıflandırılmıştır. SYNGAP1 geninin önemi otizmin ve/veya epilepsinin eşlik ettiği ZY’li bireyler arasında daha önceden gösterilmiştir. Olguların ikisine de ZY’nin eşlik etmesinin yanında birinde EEG’de anormallik saptanması da klinik olarak varyantın olası fenotipik etkileriyle uyumludur. Son 10 yılda sinaptik plastisitede görevli proteinleri kodlayan genlerde aday otozomal dominant mutasyonlar bulunmuştur. 2009 yılında yapılan bir çalışmada sendromik olmayan ZY tanılı 94 olgunun 3’ünde SYNGAP1 geninde *de novo* “protein-kesici”¹⁷⁷ mutasyonu saptanmıştır. Bu üç hastanın ikisi “anlamsız”¹⁷⁸ mutasyonlar için heterozigot iken, üçüncü hasta ise çerçeve kayması mutasyonu için heterozigot saptanmıştır. Bu çocukların ortak özelliği anne-babaları arasında akraba evliliği olmaması ve hipotoni ve gelişimin erken basamaklarında yaygın bir gecikmenin olmasıdır. Ayrıca iki çocukta tonik-klonik ve miyoklonik nöbetler olduğu dikkat çekmiştir (269). Sonrasında epilepsi ve OSB tanılı hastalarla yapılan bir kohortta SYNGAP1 ekzonu dizilenmiştir. Jeneralize epilepsisi ve mikrosefalisi olan sendromik olmayan ZY tanılı iki hastada *de novo* “çerçeve dışı”¹⁷⁹ delesyon saptanmıştır. Ayrıca mikrosefalisi ve epilepsisi olmayan bir otizm tanılı hastada ise *de novo* kırılma bölgesi mutasyonu saptanmıştır. Üç hastada da “yanlış anlamlı”¹⁸⁰ mutasyon saptanmıştır. Sonraki başka çalışmalarda da ZY, epilepsi ve şiddetli dil bozukluğu olan hastalarda 6p21.3 kromozomal bölgesinde mikrolelesyonlar saptanmıştır (270). Bu çalışmada otizmin etiyolojisi için güçlü olan bu varyantın dizileme teknolojilerinin okuma ve haritalama hatalarından kaynaklanmadığını kanıtlamak için Sanger dizileme gibi hedefli bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir.

¹⁷⁶ SYNGAP1: Synaptic Ras GTPase activating protein 1

¹⁷⁷ *protein-truncating*

¹⁷⁸ *nonsense*

¹⁷⁹ *out-of-frame*

¹⁸⁰ (*missense*)

SFARI Gen kategori 1’de yer alan diğer varyant ise 7. kromozomda yer alan RELN¹⁸¹ geninde saptanmıştır. Bu varyant GOF özellikleri gösteren anneden (A1A) her iki çocuğuna da kalıtılarak geçmiştir. GnomAD *exoms* ve gnomAD *genomes* veritabanlarında da daha önce gösterilmemiş olan bu varyantın dbSNP kimlik numarası da bulunmamaktadır. Proteinde bir aminoasit değişikliği ile sonuçlanan SNV tipinde “yanlış anlamlı” varyant olması nedeniyle “orta” etki gücüne sahiptir. Reelin beyin gelişimi sırasında hücre konumlanması ve nöronal göç için kritik olan hücre-hücre etkileşimlerini kontrol eden büyük bir ekstrasellüler matriks proteindir. Reelin yalnızca doğumdan önce değil, doğumdan sonra da sinaptik esneklikte ve nörotransmitter (NT) salınımında rol almak gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Pek çok çalışma RELN geni ile OSB ilişki bulmuştur. Bazı büyük örneklemli otizm çalışmalarda ise bazı olgularda RELN geninde “fonksiyon kaybı” varyantı ve olası bozucu “yanlış anlamlı” varyantlar saptanmıştır (105, 271). Ayrıca RELN genindeki bazı yaygın varyantların OSB ile ilişkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir (272). RELN geni ile ilişkili çok sayıda varyantın otizmle ilişkisi daha önce gösterilmesine rağmen bu varyantın daha önce gösterilmemiş olması ve “yanlış anlamlı” varyant olması nedeniyle patojenitesi hakkında yorum yapmak güçtür.

SFARI Gen kategori 1’ki diğer aday varyant A1Ç1’de *de novo* olarak ortaya çıkan 18. kromozomdaki ASXL3¹⁸² varyantıdır. Bu gen, gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir proteini kodlar. ovaryum, testisler ve beyin olmak üzere ek çok dokuda eksprese olan bu protein tiroit ve oksitosin hormonunu reseptörlerinin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek lipogenezi negatif olarak düzenler (273). ASXL3 genindeki *de novo* “fonksiyon kaybı” mutasyonları OSB tanılı probandlarda daha önce pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca genin *de novo* nadir varyantlarının analizi, bu genin yüksek istatistiksel anlamlılıkla otizm geni olduğunu göstermiştir (105). Çalışmadaki bireylerden A1Ç1’nin sahip olduğu bu varyant korunmuş çerçeve içi delesyon olması nedeniyle “orta” riskli olarak sınıflanmaktadır. Ancak varyantın etkilenmiş çocukta *de novo* ortaya çıkmış olması patojenite olasılığını arttırmaktadır. Varyantın proteinin fonksiyonunu bozucu olup olmadığını belirlemek ve olası fenotipik etkileri ile ilgili fikir sahibi olmak için *in vitro* insan kök hücre bazlı modelleme veya hayvan modellemesi yapmak faydalı olabilir.

¹⁸¹ RELN: Reelin

¹⁸² ASXL3: *Additional sex combslike 3, transcriptional regulator*

SFARI Gen kategori 2'deki varyantlara bakıldığında ise, ilk aday varyantın 1. kromozomdaki KDM5B¹⁸³ geninde olduğu görülmektedir. Genin kodladığı protein transkripsiyonel baskılama ve bazı tümör baskılayıcı genlerin yukarı yönlü düzenlemesini sağlar. Ayrıca genom stabilitesi ve DNA tamirinde de rol oynadığı düşünülmektedir (274). Bu genin iki “fonksiyon kaybı” ile sonuçlanan varyantı SCC koleksiyonu ile yapılan çalışmada gösterilmiştir (275). Bu varyant GOF özellikleri gösteren anneden her iki çocuğuna da kalıtılmıştır. SNV tipinde “yanlış anlamlı” olup “orta” etki gücüne sahip olduğu düşünülen bu varyant kırılma bölgesine çok yakın olması nedeniyle daha yüksek bir fonksiyonel etki gücüne sahip olabilir.

Diğer bir aday varyant ise 7. kromozomda yer alan MET¹⁸⁴ geninde yer almaktadır. Aslında bir onkogen olan MET geninin ürünü nöronal gelişimde kritik rol oynamaktadır. Çok sayıda ilişkilendirme çalışması ile MET geni arasında bağlantı saptanmıştır (276). Çalışmada saptanan MET varyantı üçüncü ailedeki GOF özellikleri gösteren babadan (A3B) her iki çocuğuna da kalıtılmıştır. SNV tipindeki bu varyant “yanlış anlamlı” protein sentezlenmesine neden olmaktadır. Varyant “yanlış anlamlı” olmasına rağmen protein etkileşim bölgesinde yer aldığı için “fonksiyon bozucu” olma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmüştür.

Diğer bir aday varyant birinci ailedeki etkilenmemiş anneden (A1A) çocuklarından birine (A1Ç2) kalıtılan GRIP1¹⁸⁵ geninde saptanan bir varyanttır. Gen ürünü protein sinapslarda görevli olmasının yanında nöronal gelişimde de önemlidir. Protein hem glutamerjik hem de GABAerjik sinapslarda sinaps organizasyonunda ve iletimde görevli olan glutamat reseptör etkileşim proteini ailesinin bir üyesidir (277). Bu genin hem genetik ilişkilendirilmesi hem de hem de nadir varyantları otizm ile ilişkili saptanmıştır (278, 279). Ayrıca bu varyantın ifadesi olan “yanlış anlamlı” protein (V54I), daha önce 480 OSB tanılı hasta ve 480 kontrolle yapılan bir çalışmada iki OSB’li çocukta gösterilmiş, sağlıklı kontrollerde ise hiç gösterilmemiştir (278). Bu veri varyantın patojen olma olasılığını güçlendirse de annenin varyantı taşıdığı halde etkilenmemiş olması ise yorum yapmayı güçleştirmektedir. Ancak A1Ç2’de bu varyanttan başka SFARI gen kategori 1-3’deki genlerde yer alan herhangi bir aday varyant

¹⁸³ KDM5B: *Lysine demethylase 5B*

¹⁸⁴ MET: *MET proto-onkogene, receptor tyrosine kinase*

¹⁸⁵ GRIP1: *Glutamate receptor interacting protein 1*

saptanamamıştır. Yine de bu çalışmada CNV analizi yapılmadığı için tüm bu varyantlar dışında etiyoloji ile ilişkili olabilecek CNV'lerin nedenselliği dışlanamaz.

Çalışmada kullanılan yüksek çıktılı dizileme yöntemleri ilk aşama testler olarak önerilmemekle birlikte NGS teknolojilerinin gelişmesi ve maliyetinin düşmesi ile birlikte OSB gibi oldukça heterojen ve genetik etiyolojiye sahip hastalıklar için son derece önemli konuma gelmiştir. Bu çalışmada ile aynı zamanda otizm etiyolojinin araştırılmasında WGS gibi bir yöntemin ilk basamak olarak kullanılabilirliği sınanmıştır. Ayrıca gelecekte OSB'nin genetik etiyolojisi ile ilgili bilgilerin artmasıyla, ortak bir genetik etiyolojiye sahip altta yatan ortak nörobiyolojik mekanizmaların rol oynadığı alt tiplerin tanımlanması mümkün olacaktır. Bu da bu alt tiplerin tedavi yanıtı ve ilaç yan etkisi açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar gösterebileceği varsayımı ile pek çok hastalık için geliştirilmeye çalışılan "hassas/kişisel tıp" için oldukça önemlidir (103). Genetik çalışmaların tedavi alanındaki katkılarına bir örnek elde edilen biyolojik bilgilerin bazı farmakolojik bileşiklerin gelişimi için yeni potansiyel hedefler de ortaya çıkarmasıdır. Örneğin bu genetik bulguları temel alan bileşiklerden biri mTOR inhibitörü olan rapamisin ve mGluR (metabotropik glutamat reseptörleri) antagonistleridir. Rapamisin TSC1, TSC2, PTEN ve NF1'de mGluR ise FMR1 geni ile ilişkili olguların tedavisinde çalışılmaktadır (103).

NGS teknolojilerinin bazı kısıtlılıkları vardır. Dizilemeye dayalı genetik testler için standart protokoller ve kalite kontrol ölçümleri hala gelişmektedir ve varyasyonların saptanması kullanılan metodun okuma uzunluğuna göre değişmektedir. Ayrıca önemli informatik kaynakların kullanılmasına rağmen bazen tanımlanmış her varyantın klinik önemini saptamak veya dışlamak zor olabilir. Sonuç olarak, genom dizileme yöntemleri ile tanımlanan anlamı bilinmeyen varyantlar, hedefli genetik testlere göre daha yüksek oranda görülür ve klinik yorumlama ve uygulama için zorluk oluşturur. Ek olarak, genom-boyu yaklaşımlar kliniğe uygun rastlantısal bulguları saptayabilir. Bunlar, çalışılmakta olan fenotiple direkt bağlantılı olmayan ancak klinik olarak önemli olan varyantlardır. OSB için dizileme umut vaat etmektedir, ancak öncelik pek çok genetik varyantın klinik etkilerini daha iyi anlamak olmalıdır (103).

OSB'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılmasının bir diğer önemli yanı ise her zaman genetik danışmanlık verme imkânı sağlamasa bile aileleri bilgilendirmek açısından bile olsa

önemlidir. Birçok bakım veren için, çocuğunda otizmin nedeninin bilinmesi, tedavi seçenekleri ile ilgili olası yararlar bir yana, yalnız başına önemlidir (280). Genetik test sonucunu alan 50 ebeveyn ile yapılan bir çalışmada, ebeveynlerin yaklaşık üçte ikisi sonuçların çocuk veya aile için faydalı olduğunu ifade etmiştir (281). Ayrıca, bir ailenin OSB için özgül genetik nedeninin bulunması, onlara daha güçlü bir destek ve toplumsal ağ sağlayabilecek aynı genetik profile sahip diğer ailelerle bağlantı kurma fırsatı verebilir (103).

6.2. Transkriptomik veriler

Bu çalışmada tüm gönüllülerin tüm transkriptomlarının analizi yapılmış, aynı zamanda bu verilerin fonksiyonel anotasyonuna bakılmıştır. İlk olarak Şekil 7’deki dendograma bakıldığında OSB tanılı etkilenmiş çocuklardan birinin (A1Ç2) diğer tüm bireylere göre daha uzakta yer aldığı görülmektedir (Şekil 7). Aynı zamanda A1Ç2’nin SFARI Gen kategori 1-3’de yer alan genlerle ilişkili varyantlarından GRIP1 geninde yer alan varyant dışında olası patojenik bir varyanta sahip olmaması da ilginç bir bulgudur. Bu iki durum birbiriyle ilişkili olabilir. Bu örnek çıkarıldıktan sonra yeniden yapılan dendograma bakıldığında OSA’ya göre GOF özellikleri gösterdiği saptanmış iki ebeveynin (A2A ve A3B) dendogramda birbirlerine yakın konumlandığı dikkat çekmektedir. İkinci ve üçüncü ailede yer alan çocukların kardeşleriyle ve sağlıklı olduğu düşünülen annelerin (A1A ve A3A) birbirleriyle yan yana konumlandığı gözlenmiştir. Ayrıca etkilenmemiş olduğu düşünülen birinci ailedeki babanın (A1B) transkriptom verilerinin ise etkilenmiş çocuklarından biri (A1Ç1) ile yan yana yer aldığı farkedilmektedir (Şekil 8). GOF özellikleri gösterdiği düşünülen ebeveynlerin ve fenotipik ve genotipik olarak benzer özellikler gösteren çocukların da dendogramda birbirine yakın konumlanması önemli bir bulgudur. Bu da gelecekte kandan kolaylıkla çalışılabilecek transkriptomik analizlerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesini olanaklı kılabilir.

PCA sonuçlarına bakıldığında dendogramda diğerlerinden uzakta konumlanan örneğin (A1Ç1) diğerlerinden PCA’da da uzakta konumlandığı dikkat çekmiştir (Şekil 9). Bu durum yine bu çocuktaki farklı genomik etiyoloji ile ilişkili olabilir. A1Ç2’nin çıkarıldığı PCA’da ise (Şekil 10), A1Ç1 ile A2Ç1’in çok yakın yerleştiği; yine GOF özellikleri gösteren annenin

(A2A) diğer tüm örneklerden uzakta yerleştiği dikkat çekmiştir (Şekil 10). Bu verilerin bir kısmı dendogramdaki veriler ile benzeşmektedir.

Transkriptomik verilerin fonksiyonel anotasyon çalışmasında ise ÇODÖ ve ODKL ölçekleri ile elde edilen sayısal değerlerden faydalanılmıştır. Fonksiyonel anotasyon sonuçlarının ortak olarak mitokondri ilişkili genlerin rol oynadığı biyolojik süreçlerde zenginleştiği dikkat çekmiş ve bu da önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Mitokondri memelilerdeki kendi genomunu içeren tek organeldir. Mitokondriyal hastalıklar (MH), OSB popülasyonunda %5 oran ile (%95 güven aralığı 3,2; %6,9) genel popülasyona göre (yaklaşık %0,01) daha yüksek oranda bulunmaktadır. OSB’de anormal mitokondriyal fonksiyon bozukluğu biyobelirteçleri ise MH’lerden daha yaygın bulunmaktadır. OSB tanılı bireylerde çok sayıda mitokondriyal biyobelirteçin (laktat, pirüvat, karnitin ve koenzim Q10) ortalama değerleri kontrollere göre önemli oranda farklıdır. Bulgular birlikte ele alındığında OSB’li çocukların farklı şiddette bir mitokondriyal fonksiyon bozukluğu spektrumuna sahip olduklarını düşündürmektedir. Bunun yanında 112 OSB ve MH’si olan ve 112 yalnızca MH’si olan çocukların yer aldığı 18 yayının derleme ve meta-analizini içeren bir çalışmaya göre, OSB ve MH tanılı çocukların MH tanılı çocukların bir alt grubu olduğu düşünülmüştür. Hem OSB, hem de MH tanılı çocukların çoğu (%79) genetik anomalilerle ilişkili değildir; bu da ikincil mitokondriyal fonksiyon bozukluğu olasılığını arttırmaktadır (282). Günümüzde ise bazı OSB tanılı bireylere mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun eşlik ettiği ve bazılarında ise bir “mitokondriyal otizm” alt grubu olduğu düşünülmektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bilinen bir genetik sendromun eşlik etmediği, DSM-5 tanı ölçütlerine göre OSB tanısı olan ikisi de etkilenmiş 5-18 yaş arası üç çift dizigot ikiz (DZ) çocuk ve ergen ile onların anne-babalarından oluşan bireyler genomik ve transkriptomik açıdan değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler çeşitli biyoinformatik araçlarla ölçek puanları ve klinik bulgular da dikkate alınarak anlamlandırılmıştır.

Genomik veriler değerlendirildiğinde, her bir birey için hesaplanmış varyant sayılarına bakıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir. İlişkili ilk varyant hem A1Ç1 hem de A2Ç2’de saptanan 6. kromozomun 6p21.3 bölgesinde eksprese olan ve SFARI Gen’e göre kategori 1’de yer alan SYNGAP1 genindeki varyanttır. İlginç bir şekilde çalışmada iki farklı ailenin birer çocuğunda *de novo* olarak ortaya çıktığı düşünülen ve iki çocukta da heterozigot olarak bulunan bu varyant *indel* tipi olup, proteinde çerçeve kaymasına yol açtığı için “yüksek” riskli varyant olarak sınıflandırılmıştır. Etiyoloji için güçlü bir aday olan bu varyantın dizileme teknolojilerinin okuma ve haritalama hatalarından kaynaklanmadığını kanıtlamak için Sanger dizileme gibi hedefli bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir.

SFARI Gen kategori 1’de yer alan diğer bir aday varyant 7. kromozomda bulunan RELN geninde saptanmıştır. Bu varyant GOF özellikleri gösteren anneden (A1A) her iki çocuğuna da kalıtılarak geçmiştir ve dbSNP kimlik numarası bulunmamasının yanında gnomAD *exoms* ve gnomAD *genomes* veritabanlarında da daha önce gösterilmemiştir. SNV tipinde olan bu varyant proteinde bir aminoasit değişikliği ile sonuçlanan “yanlış anlamlı” bir varyant olması nedeniyle “orta” etki gücüne sahiptir. Hem “orta” eki gücüne sahip olması, hem de otizm ile ilişkisinin gösterilememiş olması nedeniyle varyantın patojenitesi hakkında kesin yorum yapılamamıştır.

SFARI Gen kategori 1’ki diğer aday varyant A1Ç1’de *de novo* olarak ortaya çıkan 18. kromozomdaki ASXL3 varyantıdır. A1Ç1’nin sahip olduğu bu varyant korunmuş çerçeve içi delesyon olması nedeniyle “orta” riskli olarak sınıflanmakla birlikte etkilenmiş çocukta *de novo* olarak çıkması patojenite olasılığını arttırmaktadır. Varyantın proteinin fonksiyonunu bozucu olup olmadığını belirlemek ve olası fenotipik etkileri ile ilgili fikir sahibi olmak için *in vitro* insan kök hücre bazlı modelleme veya hayvan modellemesi yapmak yararlı olabilir.

SFARI Gen kategori 2'deki varyantlara bakıldığında ise, ikinci ailedeki GOF özellikleri gösteren anneden (A2A) her iki çocuğuna da kalıtılan 1. kromozomdaki KDM5B genindedir. SNV tipinde “yanlış anlamlı” olup “orta” etki gücüne sahip olduğu düşünülen bu varyant kırılma bölgesine çok yakın yerleşimli olduğundan önemli olabilir.

Diğer bir aday varyant birinci ailedeki etkilenmemiş anneden (A1A) çocuklarından birine (A1Ç2) kalıtılan GRIP1 geninde saptanan bir varyanttır. Bu varyantın ifadesi olan “yanlış anlamlı” protein (V54I), daha önce 480 OSB tanılı hasta ve 480 kontrolle yapılan bir çalışmada iki OSB'li çocukta gösterilmiş, sağlıklı kontrollerde ise hiç gösterilmemiştir. Bu durum varyantın patojenite olasılığını güçlendirmekle birlikte sağlıklı anneden kalıtılması nedeniyle yorum yapmayı güçleştirmektedir.

Transkriptomik verilere bakıldığında, GOF özelliklerine sahip olduğu düşünülen iki ebeveynin (A2A ve A3B) dendogramda birbirlerine yakın konumlanması önemli bir bulgudur. İkinci ve üçüncü ailede yer alan kardeşlerin ise yan yana, sağlıklı olduğu düşünülen annelerin (A1A ve A3A) yan yana konumlandığı gözlenmiştir. Ayrıca etkilenmemiş olduğu düşünülen birinci ailedeki babanın (A1B) verilerinin ise etkilenmiş çocuklarından biri ile (A1Ç1) ile yan yana yer aldığı görülmektedir. GOF özellikleri gösterdiği düşünülen ebeveynlerin ve fenotipik ve genotipik olarak benzer özellikler gösteren çocukların da dendogramda birbirine yakın konumlanması gelecekte kandan kolaylıkla çalışılabilecek transkriptomik analizlerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesini açısından umut vaat etmektedir.

Yapılan PCA analizindeki verilerin bir bir kısmı dendogramdaki veriler ile benzeşmektedir. Transkriptomik verilerin ölçeklerden faydalanarak yapılan fonksiyonel anotasyon çalışmasında ise ortak olarak mitokondri ilişkili genlerin rol oynadığı biyolojik süreçlerde zenginleşme olduğu dikkat çekmiştir.

OSB etiyolojisini araştırmada gün geçtikçe önem kazanan NGS yöntemlerini yorumlamak için çok merkezli daha büyük örneklemli araştırmalara ve bu araştırmalardan elde edilecek yüksek çıktılı veriyi daha hızlı yorumlamada oldukça önemli olan alt yapıya ihtiyaç vardır. Aynı zamanda ülkemiz popülasyonuna ait WGS ve RNA-seq verisinin olmaması elde edilen varyantların yorumlamada yaşanan güçlük yaratmaktadır. Günümüzde pek çok alanda NGS teknolojileri ile yapılan çalışmaların oldukça artmakta olduğu düşünüldüğünde,

ülkemizde sağlıklı popülasyon verilerine ait bir genom projesinin yapılması gerekliliği oldukça açıktır.

8. ARAŞTIRMANIN KISITLILIKLARI

Araştırmanın hem güçlü hem de kısıtlı yanları bulunmaktadır. NGS teknolojilerinin maliyetlerinin yüksek olması ve araştırmanın bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle az sayıda örnekleme çalışılması bir kısıtlılıktır. Özellikle RNA-seq analiz sonuçlarını yorumlarken bu durumun önemi artmaktadır. Çünkü transkriptomik verilerin analizi için çok daha büyük örneklem grubuna ihtiyaç vardır. Ayrıca kontrol grubunun olmaması ve analize birlikte dahil edilen bireylerin yaşlarının farklı aralıklarda olması da transkriptomik veriler için önemli bir kısıtlılıktır.

WGS analizinden önce CMA yönteminin bütçede kısıtlılık nedeniyle uygulanamaması da önemli bir kısıtlılıktır.

Ayrıca WGS ve RNA-seq ile elde edilen verilerin biyoinformatik analizinin ekstra bilgisayarlı yük getirmesi nedeniyle yalnızca SNV ve indel tipi varyantların çalışılabilmesi, OSB etiolojisinde önemi pek çok gösterilen CNV'lerin incelenememiş olması önemli bir kısıtlılıktır. Bu tez çalışmasından sonra CNV'lerin de tanımlanması ve olguların yeniden değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bunun yanında zaman sınırlılığı nedeniyle varyantları tanımlama aşamasında elde edilen verinin çok yüksek çıktı olması bazı filtrelemelerin yapılma gerekliliğini doğurmuştur. Böyle olunca yalnızca nadir varyantların etkisine odaklanılmış, otizmde tek başına etki gücü düşük ama çok sayıda olduğunda etki gücü yüksek ve otizmin etiolojisinden daha yüksek oranda sorumlu olduğu bilinen yaygın varyantların etkisi değerlendirilmeye alınamamıştır. Bu da gelecekteki çalışma hedefleri arasındadır. Ayrıca filtreleme ile yalnızca “yüksek” ve “orta” etki gücü olan varyantların dahil edilmesi, daha ılımlı etkisi olan ve “hafif” kategorisinde yer alan kodlanmayan bölgedeki varyantların elenmesine neden olmuştur. OSB'nin etiolojisinde kodlanmayan bölgedeki varyantların ortalama etki büyüklüğü (effect size) kodlayan bölgedekiler kadar olmasa da önemlidir (283).

OSB'nin genetik değerlendirilmesinde özellikle sendromik olan ve sendromik olmayan OSB'nin ayırımında önemi olan tıbbi genetik konsültasyonunun olmaması bir kısıtlılıktır.

Transkriptomik verilerin yalnızca kan örneklerinden elde edilen PBMC'den elde edilmesi önemli kısıtlılıktır. Çünkü MSS ekspresyon paterni kan hücrelerine göre oldukça farklılık göstermektedir. Ancak MSS'den hücre ve doku eldesi pratik olarak mümkün olmadığından kandan elde edilen örneklerin biyobelirteç olarak değerlendirilmesi açısından ise önemli bir faydadır.

Ebeveynlerin GOF özelliklerini saptamak için yalnızca bir tarama testi kullanılması da kısıtlılıktır. Çünkü çocukların olduğu kadar ebeveynlerin fenotipik özelliklerini tanımlamak da önemlidir.

NGS tekniklerinin doğası gereği dizileme ve haritalamadan doğabilecek hata payının olması bir kısıtlılık olarak değerlendirilebilir. O nedenle elde edilen bulguların Sanger dizileme gibi hedefli diğer yöntemlerle doğrulanması gerekebilir.

9. KAYNAKLAR

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-5) Fifth ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
2. Lotter V. Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*. 1966;1(3):124-35.
3. Treffert DA. Epidemiology of infantile autism. *Archives of general psychiatry*. 1970;22(5):431-8. Epub 1970/05/01. PubMed PMID: 5436867.
4. Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* (Washington, DC : 2002). 2016;65(3):1-23. Epub 2016/04/01. doi: 10.15585/mmwr.ss6503a1. PubMed PMID: 27031587.
5. 2018 [cited 2018 2nd, Feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
6. Wozniak RH, Leezenbaum NB, Northrup JB, West KL, Iverson JM. The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2017;8(1-2).
7. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011;13(4):278-94. Epub 2011/03/02. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba. PubMed PMID: 21358411.
8. Fatemi SH. *The Molecular Basis of Autism*. Fatemi SH, editor. New York: Springer; 2015.
9. Beaudet AL. Autism: highly heritable but not inherited. *Nature medicine*. 2007;13(5):534-6. Epub 2007/05/05. doi: 10.1038/nm0507-534. PubMed PMID: 17479094.
10. El-Fishawy P. The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatric Clinics*. 2010;33(1):83-105.
11. de la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, Geschwind DH. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature medicine*. 2016;22(4):345-61.
12. Yuen RK, Merico D, Bookman M, Howe JL, Thiruvahindrapuram B, Patel RV, et al. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature neuroscience*. 2017;20(4):602.
13. Jiang Y-h, Yuen Ryan K, Jin X, Wang M, Chen N, Wu X, et al. Detection of Clinically Relevant Genetic Variants in Autism Spectrum Disorder by Whole-Genome Sequencing. *American journal of human genetics*. 2013;93(2):249-63. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.06.012. PubMed PMID: PMC3738824.
14. Wong D, Maybery M, Bishop D, Maley A, Hallmayer J. Profiles of executive function in parents and siblings of individuals with autism spectrum disorders. *Genes, Brain and Behavior*. 2006;5(8):561-76.
15. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 1943;2:217-50.
16. Bleuler E. *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. New York: International Universities Press; 1911.
17. Volkmar F. Clinical Aspects of Autism. In: Fatemi S, editor. *The Molecular Basis of Autism*. New York: Springer New York; 2015. p. 3-14.

18. Asperger H. Die autistischen psychopathen im kindersalter. *Archive fur psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1944;117:76–136.
19. Wing L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychological medicine*. 1981;11(1):115-29. PubMed PMID: 7208735.
20. Wing L, Gould J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *Journal of autism and developmental disorders*. 1979;9(1):11-29. PubMed PMID: 155684.
21. Rett A. Uber ein eigenartiges hirntophisches Syndroem bei hyperammonie im Kindersalter. *Wein Med Wochenschr*. 1966;118:723–6.
22. Bettelheim B. Joey: a mechanical boy. *Scientific American*. 1959;200(3):116-20 passim. PubMed PMID: 13635040.
23. Bender L. Childhood schizophrenia; clinical study on one hundred schizophrenic children. *The American journal of orthopsychiatry*. 1947;17(1):40-56. PubMed PMID: 20282040.
24. Rimland B. *Infantile autism: the syndrome and its implications for a neural theory of behavior*. . New York: Appleton-Century-Crofts; 1964.
25. Rimland B. The differentiation of childhood psychoses: an analysis of checklists for 2,218 psychotic children. *Journal of autism and childhood schizophrenia*. 1971;1(2):161-74. PubMed PMID: 5172390.
26. Wing L. Childhood autism and social class: a question of selection? *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1980;137:410-7. PubMed PMID: 7470767.
27. Kolvin I. Studies in the childhood psychoses. I. Diagnostic criteria and classification. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1971;118(545):381-4. PubMed PMID: 5576635.
28. Rutter M. Childhood schizophrenia reconsidered. *Journal of autism and childhood schizophrenia*. 1972;2(4):315-37. PubMed PMID: 4581613.
29. Rutter M. Diagnosis and definition of childhood autism. *Journal of autism and childhood schizophrenia*. 1978;8(2):139-61. PubMed PMID: 670129.
30. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual*. 3rd ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association; 1980.
31. Motavalli Mukaddes N. *Otizm Spektrum Bozuklukları*. 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017.
32. Huerta M, Bishop SL, Duncan A, Hus V, Lord C. Application of DSM-5 criteria for autism spectrum disorder to three samples of children with DSM-IV diagnoses of pervasive developmental disorders. *The American journal of psychiatry*. 2012;169(10):1056-64. Epub 2012/10/04. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12020276. PubMed PMID: 23032385.
33. Volkmar FR, Reichow B. Autism in DSM-5: progress and challenges. *Molecular autism*. 2013;4(1):13.
34. Mattila M-L, Kielinen M, Linna S-L, Jussila K, Ebeling H, Bloigu R, et al. Autism spectrum disorders according to DSM-IV-TR and comparison with DSM-5 draft criteria: an epidemiological study. *Journal of the American academy of child & adolescent psychiatry*. 2011;50(6):583-92. e11.

35. Worley JA, Matson JL. Comparing symptoms of autism spectrum disorders using the current DSM-IV-TR diagnostic criteria and the proposed DSM-V diagnostic criteria. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2012;6(2):965-70.
36. Yaylaci F, Miral S. A Comparison of DSM-IV-TR and DSM-5 Diagnostic Classifications in the Clinical Diagnosis of Autistic Spectrum Disorder. *Journal of autism and developmental disorders*. 2017;47(1):101-9.
37. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric research*. 2009;65(6):591-8. Epub 2009/02/17. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e7203. PubMed PMID: 19218885.
38. Van Naarden Braun K, Pettygrove S, Daniels J, Miller L, Nicholas J, Baio J, et al. Evaluation of a methodology for a collaborative multiple source surveillance network for autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2002. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries (Washington, DC : 2002)*. 2007;56(1):29-40. Epub 2007/02/09. PubMed PMID: 17287716.
39. King M, Bearman P. Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *International journal of epidemiology*. 2009;38(5):1224-34. Epub 2009/09/10. doi: 10.1093/ije/dyp261. PubMed PMID: 19737791; PubMed Central PMCID: PMC2800781.
40. Wing L, Potter D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. 2002;8(3):151-61. Epub 2002/09/07. doi: 10.1002/mrdd.10029. PubMed PMID: 12216059.
41. Durkin MS, Maenner MJ, Newschaffer CJ, Lee LC, Cunniff CM, Daniels JL, et al. Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *American journal of epidemiology*. 2008;168(11):1268-76. Epub 2008/10/24. doi: 10.1093/aje/kwn250. PubMed PMID: 18945690; PubMed Central PMCID: PMC2638544.
42. Baio J. Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*. Volume 61, Number 3. Centers for Disease Control and Prevention. 2012.
43. Kim YS, Leventhal BL, Koh Y-J, Fombonne E, Laska E, Lim E-C, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *American Journal of Psychiatry*. 2011;168(9):904-12.
44. Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? *PLoS biology*. 2011;9(6):e1001081.
45. Robinson EB, Lichtenstein P, Anckarsäter H, Happé F, Ronald A. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(13):5258-62.
46. Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, et al. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron*. 2011;70(5):886-97. Epub 2011/06/11. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.015. PubMed PMID: 21658582.
47. Baron-Cohen S, Auyeung B, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Abdallah MW, Melgaard L, et al. Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Molecular psychiatry*. 2015;20(3):369.
48. Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, et al. A higher mutational burden in females supports a "female protective model" in neurodevelopmental disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 2014;94(3):415-25.
49. Kolevzon A, Baxbaum JD. Autism Spectrum Disorders. In: Baxbaum JD, editor. *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*. 1st ed. New York: Elsevier; 2013. p. 3-103.

50. Lai M-C, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *The Lancet*. 2013;383(9920):896-910. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61539-1.
51. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders*. 1994;24(5):659-85. Epub 1994/10/01. PubMed PMID: 7814313.
52. Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, et al. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *Journal of autism and developmental disorders*. 1989;19(2):185-212. Epub 1989/06/01. PubMed PMID: 2745388.
53. Luyster R, Gotham K, Guthrie W, Coffing M, Petrak R, Pierce K, et al. The Autism Diagnostic Observation Schedule-toddler module: a new module of a standardized diagnostic measure for autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*. 2009;39(9):1305-20. Epub 2009/05/06. doi: 10.1007/s10803-009-0746-z. PubMed PMID: 19415479; PubMed Central PMCID: PMC2893552.
54. Schopler E, Reichler RJ, BR. R. *The Childhood Autism Rating Scale (CARS) for Diagnostic Screening and Classification of Autism*. New York: Irvington Publishers; 1986.
55. Robins DL, Fein D, Barton ML, Green JA. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *Journal of autism and developmental disorders*. 2001;31(2):131-44. Epub 2001/07/14. PubMed PMID: 11450812.
56. Berument SK, Rutter M, Lord C, Pickles A, Bailey A. Autism screening questionnaire: diagnostic validity. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1999;175:444-51. Epub 2000/05/02. PubMed PMID: 10789276.
57. Constantino JN, Gruber CP. *Social Responsiveness Scale (SRS)*. Los Angeles, CA: Western Psychological Services.; 2005.
58. Elsabbagh M, Johnson MH. Getting answers from babies about autism. *Trends in cognitive sciences*. 2010;14(2):81-7.
59. Zwaigenbaum L, Bryson S, Lord C, Rogers S, Carter A, Carver L, et al. Clinical assessment and management of toddlers with suspected autism spectrum disorder: insights from studies of high-risk infants. *Pediatrics*. 2009;123(5):1383-91.
60. Mandell DS, Novak MM, Zubritsky CD. Factors Associated With Age of Diagnosis Among Children With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. 2005;116(6):1480-6. doi: 10.1542/peds.2005-0185. PubMed PMID: PMC2861294.
61. Johnson CP, Myers SM. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007;120(5):1183-215. Epub 2007/10/31. doi: 10.1542/peds.2007-2361. PubMed PMID: 17967920.
62. Motavalli Mukaddes N. *Otizm Spektrum Bozuklukları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. 25-46 p.
63. Baron-Cohen S, Leslie AM, Frith U. Does the autistic child have a "theory of mind"? *Cognition*. 1985;21(1):37-46.
64. Dichter GS. Functional magnetic resonance imaging of autism spectrum disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2012;14(3):319-51. PubMed PMID: PMC3513685.
65. Pelphrey KA, Shultz S, Hudac CM, Wyk BCV. Constraining Heterogeneity: The Social Brain and its Development in Autism Spectrum Disorder. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2011;52(6):631-44. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02349.x. PubMed PMID: PMC3096715.

66. Hughes C, Russell J, Robbins TW. Evidence for executive dysfunction in autism. *Neuropsychologia*. 1994;32(4):477-92. Epub 1994/04/01. PubMed PMID: 8047253.
67. Ozonoff S, Pennington BF, Rogers SJ. Executive function deficits in high-functioning autistic individuals: relationship to theory of mind. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 1991;32(7):1081-105. Epub 1991/11/01. PubMed PMID: 1787138.
68. Klin A, Jones W, Schultz R, Volkmar F, Cohen D. Defining and quantifying the social phenotype in autism. *The American journal of psychiatry*. 2002;159(6):895-908. Epub 2002/06/04. doi: 10.1176/appi.ajp.159.6.895. PubMed PMID: 12042174.
69. Ozonoff S, Strayer DL, McMahon WM, Filloux F. Executive function abilities in autism and Tourette syndrome: An information processing approach. *Journal of child Psychology and Psychiatry*. 1994;35(6):1015-32.
70. Johnson MH. Executive function and developmental disorders: the flip side of the coin. *Trends in cognitive sciences*. 2012;16(9):454-7. Epub 2012/07/28. doi: 10.1016/j.tics.2012.07.001. PubMed PMID: 22835639.
71. Tanıdır C, Motavallı Mukaddes N. Otizm Spektrum Bozuklukları. In: Pekcanlar Akay A, editor. *Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları*. İkinci baskı ed. Ankara: Türkiye Çocuk ve Genç Psikiyatrisi Derneği; 2016. p. 126-49.
72. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2008;47(8):921-9. Epub 2008/07/23. doi: 10.1097/CHI.0b013e318179964f. PubMed PMID: 18645422.
73. Eldevik S, Hastings RP, Hughes JC, Jahr E, Eikeseth S, Cross S. Meta-analysis of early intensive behavioral intervention for children with autism. *Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology*. 2009;38(3):439-50.
74. Dawson G, Rogers S, Munson J, Smith M, Winter J, Greenson J, et al. Randomized, Controlled Trial of an Intervention for Toddlers With Autism: The Early Start Denver Model. *Pediatrics*. 2010;125(1):e17-e23. doi: 10.1542/peds.2009-0958. PubMed PMID: PMC4951085.
75. Duifhuis EA, den Boer JC, Doornbos A, Buitelaar JK, Oosterling IJ, Klip H. The Effect of Pivotal Response Treatment in Children with Autism Spectrum Disorders: A Non-randomized Study with a Blinded Outcome Measure. *Journal of autism and developmental disorders*. 2017;47(2):231-42. doi: 10.1007/s10803-016-2916-0. PubMed PMID: PMC5309302.
76. Murray ML, Hsia Y, Glaser K, Simonoff E, Murphy DG, Asherson PJ, et al. Pharmacological treatments prescribed to people with autism spectrum disorder (ASD) in primary health care. *Psychopharmacology*. 2014;231(6):1011-21.
77. Coury DL, Anagnostou E, Manning-Courtney P, Reynolds A, Cole L, McCoy R, et al. Use of psychotropic medication in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2012;130(Supplement 2):S69-S76.
78. Woolfenden S, Sarkozy V, Ridley G, Coory M, Williams K. A systematic review of two outcomes in autism spectrum disorder - epilepsy and mortality. *Developmental medicine and child neurology*. 2012;54(4):306-12. Epub 2012/02/22. doi: 10.1111/j.1469-8749.2012.04223.x. PubMed PMID: 22348343.
79. Fein D, Barton M, Eigsti IM, Kelley E, Naigles L, Schultz RT, et al. Optimal outcome in individuals with a history of autism. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2013;54(2):195-205. Epub 2013/01/17. doi: 10.1111/jcpp.12037. PubMed PMID: 23320807; PubMed Central PMCID: PMC3547539.

80. Howlin P, Moss P, Savage S, Rutter M. Social outcomes in mid- to later adulthood among individuals diagnosed with autism and average nonverbal IQ as children. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2013;52(6):572-81.e1. Epub 2013/05/25. doi: 10.1016/j.jaac.2013.02.017. PubMed PMID: 23702446.
81. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2012;14(3):281-92. Epub 2012/12/12. PubMed PMID: 23226953; PubMed Central PMCID: PMC3513682.
82. Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Cohen D, Bronsard G, et al. Gene× Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Frontiers in psychiatry*. 2014;5.
83. Colvert E, Tick B, McEwen F, Stewart C, Curran SR, Woodhouse E, et al. Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA psychiatry*. 2015;72(5):415-23.
84. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *Jama*. 2014;311(17):1770-7.
85. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*. 2011;68(11):1095-102.
86. C Yuen RK, Merico D, Bookman M, L Howe J, Thiruvahindrapuram B, Patel RV, et al. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat Neurosci*. 2017;20(4):602-11. doi: 10.1038/nn.4524
<http://www.nature.com/neuro/journal/v20/n4/abs/nn.4524.html#supplementary-information>.
87. Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in cognitive sciences*. 2011;15(9):409-16. Epub 2011/08/23. doi: 10.1016/j.tics.2011.07.003. PubMed PMID: 21855394; PubMed Central PMCID: PMC3691066.
88. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*. 1995;25(1):63-77.
89. Hallmayer J, Glasson EJ, Bower C, Petterson B, Croen L, Grether J, et al. On the twin risk in autism. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(4):941-6.
90. Ronald A, Hoekstra RA. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2011;156(3):255-74.
91. Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L, Andersson L, Gillberg IC, Jakobsson G, et al. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1989;30(3):405-16.
92. Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2016;57(5):585-95.
93. Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(12):943-55. Epub 2001/12/06. doi: 10.1038/35103559. PubMed PMID: 11733747.
94. Werling DM, Geschwind DH. Recurrence rates provide evidence for sex-differential, familial genetic liability for autism spectrum disorders in multiplex families and twins. *Molecular autism*. 2015;6(1):27.

95. Wood CL, Warnell F, Johnson M, Hames A, Pearce MS, McConachie H, et al. Evidence for ASD recurrence rates and reproductive stoppage from large UK ASD research family databases. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*. 2015;8(1):73-81. Epub 2014/10/03. doi: 10.1002/aur.1414. PubMed PMID: 25273900.
96. Constantino J, Todorov A, Hilton C, Law P, Zhang Y, Molloy E, et al. Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Molecular psychiatry*. 2013;18(2):137.
97. Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Lehner T, Roeder K, State MW, et al. The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron*. 2012;76(6):1052-6.
98. Geschwind DH. Autism: many genes, common pathways? *Cell*. 2008;135(3):391-5.
99. State MW, Levitt P. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. *Nat Neurosci*. 2011;14(12):1499-506. Epub 2011/11/01. doi: 10.1038/nn.2924. PubMed PMID: 22037497; PubMed Central PMCID: PMC3940335.
100. Vijayakumar NT, Judy MV. Autism spectrum disorders: Integration of the genome, transcriptome and the environment. *Journal of the neurological sciences*. 2016;364:167-76. Epub 2016/04/17. doi: 10.1016/j.jns.2016.03.026. PubMed PMID: 27084239.
101. D’Gama AM, Pochareddy S, Li M, Jamuar SS, Reiff RE, Lam A-TN, et al. Targeted DNA sequencing from autism spectrum disorder brains implicates multiple genetic mechanisms. *Neuron*. 2015;88(5):910-7.
102. Schaaf CP, Sabo A, Sakai Y, Crosby J, Muzny D, Hawes A, et al. Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. *Human molecular genetics*. 2011;20(17):3366-75.
103. Vorstman JAS, Parr JR, Moreno-De-Luca D, Anney RJL, Nurnberger Jr JI, Hallmayer JF. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature reviews Genetics*. 2017;18(6):362-76. doi: 10.1038/nrg.2017.4
<http://www.nature.com/nrg/journal/v18/n6/abs/nrg.2017.4.html#supplementary-information>.
104. Stessman HA, Bernier R, Eichler EE. A genotype-first approach to defining the subtypes of a complex disease. *Cell*. 2014;156(5):872-7.
105. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014;515(7526):209-15.
106. Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, et al. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature medicine*. 2015;21(2):185-91.
107. Leppa VM, Kravitz SN, Martin CL, Andrieux J, Le Caignec C, Martin-Coignard D, et al. Rare inherited and de novo CNVs reveal complex contributions to ASD risk in multiplex families. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;99(3):540-54.
108. Murdoch JD, State MW. Recent developments in the genetics of autism spectrum disorders. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2013;23(3):310-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.02.003>.
109. Dolcetti A, Silversides CK, Marshall CR, Lionel AC, Stavropoulos DJ, Scherer SW, et al. 1q21. 1 Microduplication expression in adults. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013;15(4).

110. Stein JL, Parikshak NN, Geschwind DH. Rare inherited variation in autism: beginning to see the forest and a few trees. *Neuron*. 2013;77(2):209-11. Epub 2013/01/29. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.010. PubMed PMID: 23352155; PubMed Central PMCID: PMC3691080.
111. Pieretti M, Zhang F, Fu Y-H, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;66(4):817-22.
112. 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. *Nature genetics*. 1999;23(2).
113. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275(5308):1943-7. Epub 1997/03/28. PubMed PMID: 9072974.
114. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*. 1997;277(5327):805-8. Epub 1997/08/08. PubMed PMID: 9242607.
115. Hernandez O, Way S, McKenna J, Gambello MJ. Generation of a conditional disruption of the Tsc2 gene. *genesis*. 2007;45(2):101-6.
116. Baxbaum JD. *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*. 1st ed. Oxford, UK: Elsevier; 2013.
117. Kielinen M, Rantala H, Timonen E, Linna S-L, Moilanen I. Associated medical disorders and disabilities in children with autistic disorder: a population-based study. *Autism*. 2004;8(1):49-60.
118. Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S. Brief report: duplication of chromosome 15q11-13 in two individuals with autistic disorder. *Journal of autism and developmental disorders*. 1994;24(4):529-35.
119. 15q11-q13 2018 [cited 2018 8th, Feb]. Available from: <https://gene.sfari.org/database/cnv/15q11-q13>.
120. Smith SE, Zhou Y-D, Zhang G, Jin Z, Stoppel DC, Anderson MP. Increased gene dosage of Ube3a results in autism traits and decreased glutamate synaptic transmission in mice. *Science translational medicine*. 2011;3(103):103ra97-ra97.
121. Hae-Jin Hu Y-JC. Genome-Wide Association Studies of Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. In: Eapen V, editor. *Mental and Behavioural Disorders and Diseases of the Nervous System*: intech; 2011.
122. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American journal of human genetics*. 2008;82(2):477-88. Epub 2008/02/07. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.009. PubMed PMID: 18252227; PubMed Central PMCID: PMC2426913.
123. Ronemus M, Iossifov I, Levy D, Wigler M. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(2):133.
124. Golzio C, Willer J, Talkowski ME, Oh EC, Taniguchi Y, Jacquemont S, et al. KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11. 2 copy number variant. *Nature*. 2012;485(7398):363.
125. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature genetics*. 2003;34(1):27.
126. Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, et al. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature genetics*. 2010;42(6):489-91.

127. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. *Nature*. 2010;466(7304):368-72. doi: 10.1038/nature09146. PubMed PMID: PMC3021798.
128. Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu X-Q, et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics*. 2007;39(3):319-28.
129. Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet*. 2008;17(4):628-38. Epub 2007/12/25. doi: 10.1093/hmg/ddm376. PubMed PMID: 18156158.
130. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*. 2012;485(7397):237-41. Epub 2012/04/13. doi: 10.1038/nature10945. PubMed PMID: 22495306; PubMed Central PMCID: PMC3667984.
131. Timothy WY, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, et al. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron*. 2013;77(2):259-73.
132. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 2014;94(5):677-94.
133. Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, et al. Insights into autism spectrum disorder genomic architecture and biology from 71 risk loci. *Neuron*. 2015;87(6):1215-33.
134. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature genetics*. 2007;39(1):25.
135. Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, et al. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European journal of human genetics : EJHG*. 2013;21(3):310-6. Epub 2012/08/16. doi: 10.1038/ejhg.2012.175. PubMed PMID: 22892527; PubMed Central PMCID: PMC3573207.
136. Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, et al. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(1):160-4.
137. Laumonier F, Bonnet-Brilhaut F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, et al. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American journal of human genetics*. 2004;74(3):552-7. Epub 2004/02/14. doi: 10.1086/382137. PubMed PMID: 14963808; PubMed Central PMCID: PMC1182268.
138. Betancur C, Coleman M. Etiological Heterogeneity in Autism Spectrum Disorders: Role of Rare Variants. In: Buxbaum JD, editor. *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*. 1st. Oxford, UK: Elsevier; 2013. p. 113-44.
139. Hynes K, Tarpey P, Dibbens LM, Bayly MA, Berkovic SF, Smith R, et al. Epilepsy and mental retardation limited to females with PCDH19 mutations can present de novo or in single generation families. *Journal of medical genetics*. 2010;47(3):211-6.
140. Frye RE. Metabolic and mitochondrial disorders associated with epilepsy in children with autism spectrum disorder. *Epilepsy & Behavior*. 2015;47:147-57.

141. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome research*. 2005;15(11):1592-3. Epub 2005/10/28. doi: 10.1101/gr.4413105. PubMed PMID: 16251469; PubMed Central PMCID: PMC1310647.
142. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(11):745.
143. Besenbacher S, Liu S, Izarzugaza JM, Grove J, Belling K, Bork-Jensen J, et al. Novel variation and de novo mutation rates in population-wide de novo assembled Danish trios. *Nature communications*. 2015;6:5969.
144. Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, et al. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*. 2009;459(7246):528-33. doi: 10.1038/nature07999. PubMed PMID: PMC2943511.
145. Weiss LA, Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 2009;461(7265):802-8. Epub 2009/10/09. doi: 10.1038/nature08490. PubMed PMID: 19812673; PubMed Central PMCID: PMC2772655.
146. Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. 2010;19(20):4072-82. Epub 2010/07/29. doi: 10.1093/hmg/ddq307. PubMed PMID: 20663923; PubMed Central PMCID: PMC2947401.
147. Anney R, Klei L, Pinto D, Almeida J, Bacchelli E, Baird G, et al. Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*. 2012;21(21):4781-92. doi: 10.1093/hmg/ddc301.
148. Xia K, Guo H, Hu Z, Xun G, Zuo L, Peng Y, et al. Common genetic variants on 1p13.2 associate with risk of autism. *Mol Psychiatry*. 2014;19(11):1212-9. doi: 10.1038/mp.2013.146.
149. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JT, Farh K-H, Holmans PA, et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014;511(7510):421.
150. Devlin B, Melhem N, Roeder K. Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain research*. 2011;1380:78-84.
151. Sullivan P. Don't give up on GWAS. *Molecular psychiatry*. 2012;17(1):2.
152. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*. 2014;46(8):881-5. doi: 10.1038/ng.3039
<http://www.nature.com/ng/journal/v46/n8/abs/ng.3039.html#supplementary-information>.
153. Klei L, Sanders SJ, Murtha MT, Hus V, Lowe JK, Willsey AJ, et al. Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Molecular autism*. 2012;3(1):9.
154. Stiles J. Principles of brain development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2017;8(1-2).
155. Bick J, Nelson CA. Early experience and brain development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2017;8(1-2).
156. St Pourcain B, Cents RA, Whitehouse AJ, Haworth CM, Davis OS, O'Reilly PF, et al. Common variation near ROBO2 is associated with expressive vocabulary in infancy. *Nature communications*. 2014;5:4831.

157. Alarcón M, Cantor RM, Liu J, Gilliam TC, Geschwind DH, Consortium AGRE. Evidence for a language quantitative trait locus on chromosome 7q in multiplex autism families. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;70(1):60-71.
158. Di Napoli A, Warrier V, Baron-Cohen S, Chakrabarti B. Genetic variant rs17225178 in the ARNT2 gene is associated with Asperger Syndrome. *Mol Autism*. 2015;6:9. Epub 2015/03/10. doi: 10.1186/s13229-015-0009-0. PubMed PMID: 25745553; PubMed Central PMCID: PMC4350913.
159. Baron-Cohen S, Murphy L, Chakrabarti B, Craig I, Mallya U, Lakatošová S, et al. A genome wide association study of mathematical ability reveals an association at chromosome 3q29, a locus associated with autism and learning difficulties: a preliminary study. *PloS one*. 2014;9(5):e96374.
160. Kinney DK, Barch DH, Chayka B, Napoleon S, Munir KM. Environmental risk factors for autism: do they help cause de novo genetic mutations that contribute to the disorder? *Medical hypotheses*. 2010;74(1):102-6. Epub 2009/08/25. doi: 10.1016/j.mehy.2009.07.052. PubMed PMID: 19699591; PubMed Central PMCID: PMC2788022.
161. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *The British journal of psychiatry*. 2009;195(1):7-14.
162. Hultman C, Sandin S, Levine S, Lichtenstein P, Reichenberg A. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Molecular psychiatry*. 2011;16(12):1203.
163. Grubucker AM. Environmental factors in autism. *Frontiers in Psychiatry*. 2012;3.
164. Beversdorf DQ, Manning S, Hillier A, Anderson S, Nordgren R, Walters S, et al. Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of autism and developmental disorders*. 2005;35(4):471-8.
165. Godlee F, Smith J, Marcovitch H. Wakefield's article linking MMR vaccine and autism was fraudulent. *BMJ (Clinical research ed)*. 2011;342:c7452. Epub 2011/01/07. doi: 10.1136/bmj.c7452. PubMed PMID: 21209060.
166. Taylor LE, Swerdfeger AL, Eslick GD. Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*. 2014;32(29):3623-9.
167. Grant WB, Soles CM. Epidemiologic evidence supporting the role of maternal vitamin D deficiency as a risk factor for the development of infantile autism. *Dermato-endocrinology*. 2009;1(4):223-8. Epub 2010/07/02. PubMed PMID: 20592795; PubMed Central PMCID: PMC2835879.
168. Suren P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *Jama*. 2013;309(6):570-7. Epub 2013/02/14. doi: 10.1001/jama.2012.155925. PubMed PMID: 23403681; PubMed Central PMCID: PMC3908544.
169. Andrade C. Antidepressant Exposure During Pregnancy and Risk of Autism in the Offspring, 1: Meta-Review of Meta-Analyses. 2017.
170. Glasson EJ, Bower C, Petterson B, de Klerk N, Chaney G, Hallmayer JF. Perinatal factors and the development of autism: a population study. *Archives of general psychiatry*. 2004;61(6):618-27. Epub 2004/06/09. doi: 10.1001/archpsyc.61.6.618. PubMed PMID: 15184241.
171. Volk HE, Kerin T, Lurmann F, Hertz-Picciotto I, McConnell R, Campbell DB. Autism spectrum disorder: interaction of air pollution with the MET receptor tyrosine kinase gene. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2014;25(1):44-7.

172. Hunter JW, Mullen GP, McManus JR, Heatherly JM, Duke A, Rand JB. Neuroligin-deficient mutants of *C. elegans* have sensory processing deficits and are hypersensitive to oxidative stress and mercury toxicity. *Disease models & mechanisms*. 2010;3(5-6):366-76. Epub 2010/01/20. doi: 10.1242/dmm.003442. PubMed PMID: 20083577; PubMed Central PMCID: PMC2199264.
173. Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsater H, et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*. 2008;13(1):90-8. Epub 2007/05/17. doi: 10.1038/sj.mp.4002016. PubMed PMID: 17505466; PubMed Central PMCID: PMC2199264.
174. Ehninger D, Sano Y, de Vries PJ, Dies K, Franz D, Geschwind DH, et al. Gestational immune activation and Tsc2 haploinsufficiency cooperate to disrupt fetal survival and may perturb social behavior in adult mice. *Mol Psychiatry*. 2012;17(1):62-70. Epub 2010/11/17. doi: 10.1038/mp.2010.115. PubMed PMID: 21079609; PubMed Central PMCID: PMC2199264.
175. Abazyan B, Nomura J, Kannan G, Ishizuka K, Tamashiro KL, Nucifora F, et al. Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biological psychiatry*. 2010;68(12):1172-81.
176. Nijmeijer JS, Hartman CA, Rommelse NN, Altink ME, Buschgens CJ, Fliers EA, et al. Perinatal risk factors interacting with catechol O-methyltransferase and the serotonin transporter gene predict ASD symptoms in children with ADHD. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2010;51(11):1242-50. Epub 2010/09/28. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02277.x. PubMed PMID: 20868372; PubMed Central PMCID: PMC2970704.
177. Stoltenberg C, Schjolberg S, Bresnahan M, Hornig M, Hirtz D, Dahl C, et al. The Autism Birth Cohort: a paradigm for gene-environment-timing research. *Mol Psychiatry*. 2010;15(7):676-80. Epub 2010/06/24. doi: 10.1038/mp.2009.143. PubMed PMID: 20571529; PubMed Central PMCID: PMC2892398.
178. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*. 2008;320(5880):1224-9. Epub 2008/05/31. doi: 10.1126/science.1153252. PubMed PMID: 18511691; PubMed Central PMCID: PMC2443785.
179. Hall L, Kelley E. The contribution of epigenetics to understanding genetic factors in autism. *Autism*. 2014;18(8):872-81.
180. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11. 2-q13. *Neurobiology of disease*. 2010;38(2):181-91.
181. Mohammad NS, Jain JM, Chintakindi KP, Singh RP, Naik U, Akella RR. Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism. *Psychiatric genetics*. 2009;19(4):171-6. Epub 2009/05/15. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832cebd2. PubMed PMID: 19440165.
182. Liu X, Solehdin F, Cohen IL, Gonzalez MG, Jenkins EC, Lewis ME, et al. Population- and family-based studies associate the MTHFR gene with idiopathic autism in simplex families. *Journal of autism and developmental disorders*. 2011;41(7):938-44. Epub 2010/11/12. doi: 10.1007/s10803-010-1120-x. PubMed PMID: 21069446.
183. Wong C, Meaburn EL, Ronald A, Price T, Jeffries AR, Schalkwyk L, et al. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Molecular psychiatry*. 2014;19(4):495.
184. Nguyen A, Rauch TA, Pfeifer GP, Hu VW. Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain. *The FASEB Journal*. 2010;24(8):3036-51.

185. Sun W, Poschmann J, del Rosario RC-H, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, et al. Histone acetylome-wide association study of autism spectrum disorder. *Cell*. 2016;167(5):1385-97. e11.
186. Halgren C, Kjaergaard S, Bak M, Hansen C, El-Schich Z, Anderson CM, et al. Corpus callosum abnormalities, intellectual disability, speech impairment, and autism in patients with haploinsufficiency of ARID1B. *Clinical genetics*. 2012;82(3):248-55.
187. Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(16):5880-5. Epub 2004/04/14. doi: 10.1073/pnas.0308560101. PubMed PMID: 15079084; PubMed Central PMCID: PMC15079084.
188. Hvidtjorn D, Schieve L, Schendel D, Jacobsson B, Svaerke C, Thorsen P. Cerebral palsy, autism spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2009;163(1):72-83. Epub 2009/01/07. doi: 10.1001/archpediatrics.2008.507. PubMed PMID: 19124707.
189. Kawanai T, Ago Y, Watanabe R, Inoue A, Taruta A, Onaka Y, et al. Prenatal exposure to histone deacetylase inhibitors affects gene expression of autism-related molecules and delays neuronal maturation. *Neurochemical research*. 2016;41(10):2574-84.
190. Ha S, Sohn I-J, Kim N, Sim HJ, Cheon K-A. Characteristics of brains in autism spectrum disorder: structure, function and connectivity across the lifespan. *Experimental neurobiology*. 2015;24(4):273-84.
191. Courchesne E, Campbell K, Solso S. Brain growth across the life span in autism: age-specific changes in anatomical pathology. *Brain research*. 2011;1380:138-45.
192. Via E, Radua J, Cardoner N, Happé F, Mataix-Cols D. Meta-analysis of gray matter abnormalities in autism spectrum disorder: should Asperger disorder be subsumed under a broader umbrella of autistic spectrum disorder? *Archives of general psychiatry*. 2011;68(4):409-18.
193. Radua J, Via E, Catani M, Mataix-Cols D. Voxel-based meta-analysis of regional white-matter volume differences in autism spectrum disorder versus healthy controls. *Psychological medicine*. 2011;41(7):1539-50.
194. Frazier TW, Hardan AY. A meta-analysis of the corpus callosum in autism. *Biological psychiatry*. 2009;66(10):935-41.
195. Duerden EG, Mak-Fan KM, Taylor MJ, Roberts SW. Regional differences in grey and white matter in children and adults with autism spectrum disorders: an activation likelihood estimate (ALE) meta-analysis. *Autism Research*. 2012;5(1):49-66.
196. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Jama*. 2011;306(18):2001-10.
197. Casanova MF. Neuropathological and genetic findings in autism: the significance of a putative minicolumnopathy. *The Neuroscientist*. 2006;12(5):435-41.
198. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(3):383-92.
199. Braunschweig D, Van de Water J. Maternal autoantibodies in autism. *Archives of neurology*. 2012;69(6):693-9.

200. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & behavior*. 2015;138:179-87.
201. Gabriele S, Sacco R, Persico AM. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(6):919-29.
202. Chugani DC, Muzik O, Rothenmel R, Behen M, Chakraborty P, Mangner T, et al. Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys. *Annals of neurology*. 1997;42(4):666-9.
203. Rubenstein J, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*. 2003;2(5):255-67.
204. Mendez MA, Horder J, Myers J, Coghlan S, Stokes P, Erritzoe D, et al. The brain GABA-benzodiazepine receptor alpha-5 subtype in autism spectrum disorder: a pilot [11C] Ro15-4513 positron emission tomography study. *Neuropharmacology*. 2013;68:195-201.
205. Yamasue H, Yee JR, Hurlemann R, Rilling JK, Chen FS, Meyer-Lindenberg A, et al. Integrative approaches utilizing oxytocin to enhance prosocial behavior: from animal and human social behavior to autistic social dysfunction. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(41):14109-17a.
206. Pfaff DW, Rapin I, Goldman S. Male predominance in autism: neuroendocrine influences on arousal and social anxiety. *Autism Research*. 2011;4(3):163-76.
207. Vorstman J, Staal W, Van Daalen E, Van Engeland H, Hochstenbach P, Franke L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular psychiatry*. 2006;11(1):18.
208. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749-64.
209. Trakadis Y, Shevell M. Microarray as a first genetic test in global developmental delay: a cost-effectiveness analysis. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2011;53(11):994-9.
210. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in Medicine*. 2010;12(11):742.
211. Volkmar F, Siegel M, Woodbury-Smith M, King B, McCracken J, State M. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2014;53(2):237-57.
212. G. Bradley Schaefer, Nancy J. Mendelsohn, Practice ftP, Committee aG. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions2013; 2018(8th Feb). Available from: <https://www.acmg.net/docs/pp-g-ASD-schaffer-aop-gim201332a.pdf>.
213. Ungar WJ. Next Generation Sequencing and Health Technology Assessment in Autism Spectrum Disorder. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent*. 2015;24(2):123-7. Epub 2015/09/18. PubMed PMID: 26379724; PubMed Central PMCID: PMC4558983.
214. Wang Y, Wang P, Xu X, J G, McConkie A, Cheung SW, et al. Genetics of Autism Spectrum Disorders: The Opportunity and Challenge in the Genetics Clinic. In: Volkmar F, editor. *The Molecular Basis of Autism*. 1st ed. New York: Springer Science + Business Media; 2015. p. 33-65.

215. Bourgeron T. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *Comptes rendus biologies*. 2016;339(7-8):300-7. Epub 2016/06/13. doi: 10.1016/j.crv.2016.05.004. PubMed PMID: 27289453.
216. Moraes F, Góes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2016;44(3):215-23.
217. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8. PubMed PMID: 13054692.
218. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10. doi: 10.1038/35057062. PubMed PMID: 11237011.
219. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51. Epub 2001/02/22. doi: 10.1126/science.1058040. PubMed PMID: 11181995.
220. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project. *Science*. 2004;306(5696):636-40.
221. Carrasco-Ramiro F, Peiró-Pastor R, Aguado B. Human genomics projects and precision medicine. *Gene therapy*. 2017.
222. About IGSR and the 1000 Genomes Project 2016 [cited 2017 24th, Dec]. Available from: <http://www.internationalgenome.org/about>.
223. Consortium IH. Integrating ethics and science in the International HapMap Project. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(6):467.
224. About gnomAD [updated 3rd Oct, 2017; cited 2017 24th, Dec]. Available from: <http://gnomad.broadinstitute.org/>.
225. [cited 2018 2018, Feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
226. [cited 2018 8th, Feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>.
227. Variation [updated 9th, May 2017; cited 2018 8th Feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/dbSNP/dbVar/FAQ/>.
228. Basu SN, Kollu R, Banerjee-Basu S. AutDB: a gene reference resource for autism research. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database issue):D832-6. Epub 2008/11/19. doi: 10.1093/nar/gkn835. PubMed PMID: 19015121; PubMed Central PMCID: PMC2686502.
229. [updated Dec, 2017; cited 2018 8th Feb]. Available from: <http://autism.mindspec.org/autdb/Welcome.do>.
230. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7. PubMed PMID: PMC431765.
231. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(2):560-4. Epub 1977/02/01. PubMed PMID: 265521; PubMed Central PMCID: PMC2686502.

232. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, editors. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 1986: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
233. Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature biotechnology*. 2000;18(6):630-4. Epub 2000/06/03. doi: 10.1038/76469. PubMed PMID: 10835600.
234. Sener EF, Canatan H, Ozkul Y. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders: Applications of Whole Exome Sequencing Technology. *Psychiatry Investigation*. 2016;13(3):255-64. doi: 10.4306/pi.2016.13.3.255. PubMed PMID: PMC4878959.
235. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80. Epub 2005/08/02. doi: 10.1038/nature03959. PubMed PMID: 16056220; PubMed Central PMCID: PMC1464427.
236. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. 2005;309(5741):1728-32. Epub 2005/08/06. doi: 10.1126/science.1117389. PubMed PMID: 16081699.
237. Chaitankar V, Karakulah G, Ratnapriya R, Giuste FO, Brooks MJ, Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Progress in retinal and eye research*. 2016;55:1-31.
238. Cai G, Baxbaum JD. Next-Generation Sequencing For Gene and Pathway Discovery and Analysis in Autism Spectrum Disorders. In: Baxbaum JD, editor. *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*. 1st ed. Oxford, UK: Elsevier; 2013. p. 169-77.
239. Turner TN, Hormozdiari F, Duyzend MH, McClymont SA, Hook PW, Iossifov I, et al. Genome sequencing of autism-affected families reveals disruption of putative noncoding regulatory DNA. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;98(1):58-74.
240. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344-7.
241. Wetterstrand K. Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) [updated 31th Oct, 2017; cited 2017 24 Dec]. Available from: <https://www.genome.gov/sequencingcostsdata>.
242. Gupta S, Ellis SE, Ashar FN, Moes A, Bader JS, Zhan J, et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature communications*. 2014;5:5748.
243. Voineagu I. Gene expression studies in autism: moving from the genome to the transcriptome and beyond. *Neurobiology of disease*. 2012;45(1):69-75.
244. Luo R, Sanders SJ, Tian Y, Voineagu I, Huang N, Chu SH, et al. Genome-wide transcriptome profiling reveals the functional impact of rare de novo and recurrent CNVs in autism spectrum disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91(1):38-55.
245. Sucksmith E, Roth I, Hoekstra R. Autistic traits below the clinical threshold: re-examining the broader autism phenotype in the 21st century. *Neuropsychology review*. 2011;21(4):360-89.
246. Bailey A, Palferman S, Heavey L, Le Couteur A. Autism: the phenotype in relatives. *Journal of autism and developmental disorders*. 1998;28(5):369-92.

247. Bolton P, Macdonald H, Pickles A, Rios Pa, Goode S, Crowson M, et al. A case-control family history study of autism. *Journal of child Psychology and Psychiatry*. 1994;35(5):877-900.
248. Constantino JN, Lajonchere C, Lutz M, Gray T, Abbacchi A, McKenna K, et al. Autistic social impairment in the siblings of children with pervasive developmental disorders. *American Journal of Psychiatry*. 2006;163(2):294-6.
249. Virkud YV, Todd RD, Abbacchi AM, Zhang Y, Constantino JN. Familial aggregation of quantitative autistic traits in multiplex versus simplex autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2009;150(3):328-34.
250. Davidson J, Goin-Kochel RP, Green-Snyder LA, Hundley RJ, Warren Z, Peters SU. Expression of the broad autism phenotype in simplex autism families from the Simons Simplex Collection. *Journal of autism and developmental disorders*. 2014;44(10):2392-9.
251. Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, et al. Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children-present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 1997;36(7):980-8.
252. Gökler B, Ünal, F., Pehlivan Türk, B., Çengel-Kültür, E., Akdemir, D. ve Taner, Y. Okul Çağı Çocukları İçin Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi-Şimdi ve Yaşam Boyu Şekli-Türkçe uyarlamasının geçerlik ve güvenirliği. *Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi*. 2004;11(3):109-16.
253. Sucuoğlu B, Öktem, F., Akkök, F., Gökler, B. Otistik çocukların değerlendirilm esinde kullanılan ölçeklere ilişkin bir çalışma. *Psikiyatri Psikoloji Psikofarmakoloji (3P) Dergisi*. 1996;4(2):116-21.
254. İncekaş S. Çocukluk otizmini derecelendirme ölçeği Türkçe formu geçerlik ve güvenirlik çalışması, Uzmanlık tezi: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2009.
255. Krug DA, Arick J, Almond P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1980;21(3):221-9.
256. Irmak TY, Sütçü, S. T., Aydın, A., Sorias, O. Otizm Davranış Kontrol Listesinin (ABC) Geçerlilik ve Güvenilirliğinin İncelenmesi. . *Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi*. 2007;14(1):13-23.
257. First MB, Spitzer, R., Gibbon, M., Williams, J. B. W. Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition. (SCID-I/P). New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute; 2002.
258. Çorapçıoğlu A, Aydemir, Ö., Yıldız, M., Köroğlu, E. "DSM-IV Eksen I Bozuklukları (SCID-I) için Yapılandırılmış Klinik Görüşme". Klinik Versiyon. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 1999.
259. Baron-Cohen S, Wheelwright S, Skinner R, Martin J, Clubley E. The autism-spectrum quotient (AQ): Evidence from asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *Journal of autism and developmental disorders*. 2001;31(1):5-17.
260. Köse S, Bora, E., Erermiş, S., Aydın, C. Otizm Spektrum Anketi Türkçe formunun psikometrik özellikleri. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*. 2010;11(3):253-60.
261. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
262. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.

263. Paila U, Chapman BA, Kirchner R, Quinlan AR. GEMINI: integrative exploration of genetic variation and genome annotations. *PLoS computational biology*. 2013;9(7):e1003153.
264. [cited 2018 8th, March]. Available from: <https://varsome.com/>.
265. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405.
266. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2014;31(5):761-3.
267. About the Gene Scoring Module 2018 [cited 2018 8th, Mar]. Available from: <https://gene.sfari.org/about-gene-scoring/>.
268. Shi L, Zhang X, Golhar R, Otieno FG, He M, Hou C, et al. Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Molecular autism*. 2013;4(1):8.
269. Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D, Noreau A, Yang Y, Pellerin S, et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(6):599-605.
270. Jeyabalan N, Clement JP. SYNGAP1: mind the gap. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:32.
271. Stessman HA, Xiong B, Coe BP, Wang T, Hoekzema K, Fenckova M, et al. Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nature genetics*. 2017;49(4):515.
272. Wang Z, Hong Y, Zou L, Zhong R, Zhu B, Shen N, et al. Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: An integrated meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2014;165(2):192-200.
273. ASXL3 additional sex combs like 3, transcriptional regulator [Homo sapiens (human)] [updated 4th, Mar, 2018; cited 2018 12th, Mar]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80816>.
274. KDM5B lysine demethylase 5B [Homo sapiens (human)] [updated 4th, Mar, 2018; cited 2018 12th, Mar]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10765>.
275. Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. 2014;515(7526):216-21. Epub 2014/11/05. doi: 10.1038/nature13908. PubMed PMID: 25363768; PubMed Central PMCID: PMC4313871.
276. Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, et al. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(45):16834-9.
277. [updated 6th, Mar, 2018; cited 2018 12th, Mar]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GRIP1>.
278. Mejias R, Adamczyk A, Anggono V, Niranjana T, Thomas GM, Sharma K, et al. Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):4920-5.
279. Kenny E, Cormican P, Furlong S, Heron E, Kenny G, Fahey C, et al. Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Molecular psychiatry*. 2014;19(8):872.

280. Miller FA, Hayeems RZ, Bytautas JP. What is a meaningful result? Disclosing the results of genomic research in autism to research participants. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(8):867-71.
281. Reiff M, Giarelli E, Bernhardt BA, Easley E, Spinner NB, Sankar PL, et al. Parents' perceptions of the usefulness of chromosomal microarray analysis for children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*. 2015;45(10):3262-75.
282. Rossignol D, Frye R. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2012;17(3):290.
283. Werling DM, Brand H, An J-Y, Stone MR, Glessner JT, Zhu L, et al. Limited contribution of rare, noncoding variation to autism spectrum disorder from sequencing of 2,076 genomes in quartet families. *bioRxiv*. 2017:127043.



10. EKLER

EK 1. Aday varyantların patojenitesinin detaylı incelemesi

EK 2. Gönüllü bilgilendirilmiş olur formu- Anne için

EK 3. Gönüllü bilgilendirilmiş olur formu- Baba için

EK 4. Gönüllü bilgilendirilmiş olur formu- 12 yaşından küçük çocuk için

EK 5. Gönüllü bilgilendirilmiş olur genetik formu- Anne için

EK 6. Gönüllü bilgilendirilmiş olur genetik formu- Baba için

EK 7. Gönüllü bilgilendirilmiş olur genetik formu- 12 yaşından küçük çocuk için

EK 8. Sosyodemografik veri formu

EK 9. Çocukluk Otizmini Değerlendirme Ölçeği (ÇODÖ)

EK 10. Otizm Davranış Kontrol Listesi (ODKL)

EK 11. Otizm Spektrum Anketi (OSA)

EK 12. Etik kurul onay belgesi

EK 1. Aday varyantların patojenitesinin detaylı incelemesi

							Popülasyondaki sıklığı						
	Gen intoleransı						gnomAD <i>exomes</i> (ExAC)		gnomAD <i>genomes</i>		Gen		
	RVIS	%ExAC v2 RVIS	ACMG	GERP NR	GERP RS	DANN skoru	Avrupa (NF)	Toplam	Avrupa (NF)	Toplam	pLi	pRec	pNull
Kategori 1													
POGZ													
ASH1L	-1.8 (2.22%)	-4.6594 (0.2248%)	US	5.4	5.4	0.9995	0.001658	0.002263	0.0007999	0.0008072	1	1.6622e-13	1.3226e-34
ASH1L													
MYT1L													
MYT1L													
TRIP12													
SETD5	-0.79 (12.6%)	-1.3309 (7.9570%)	B										
ANK2	-3.33 (0.41%)	-3.3054 (0.7918%)	US	6.17	3.46	0.981	0.000008978	0.000004068	X	X	1	1.9214e-13	3.1558e-37
NAA15	-0.89 (10.3%)	-0.8362 (17.2043%)	US	5	-2.44	0.4835	0.000008977	0.00000407	X	X	0.9986	0.001423	2.0719e-10
SYNGAP1	-1.15 (6.23%)	-2.0985 (2.7761%)	US	2.97	1.86	X	0.005534	0.008766	0.0007528	0.003209	0.9999	0.00000155	3.0642e-16
SYNGAP1			LB										
ARID1B			B										
ARID1B													
ARID1B													
RELN	-2.15 (1.46%)	-1.6218 (5.1711%)	US	5.8899	3.5299	0.8064	0.0003322	0.0005288	0.0003331	0.0002905	1	2.4371e-15	3.0986e-43
RELN			B										
RELN			US	6.0199	5.15	0.9991	0.006923	0.006577	0.006263	0.004585	1	2.4371e-15	3.0986e-43
RELN			US	6.0799	6.0799	0.9922	X	X	X	X	1	2.4371e-15	3.0986e-43
CHD8	-2.34 (1.18%)	-3.0921 (0.9580%)	US	5.3899	4.5	0.9416	0.0001343	0.0003615	0.0001999	0.0001614	1	1.9055e-12	5.0327e-32

ASXL3	-0.67 (15.87%)	-1.0657 (11.7986%)	US	4.7389	2.1333	X	0.002115	0.002115	0.002207	0.002642	0.9999	0.00002295	8.9008e-15
DSCAM	-3.29 (0.43%)	-3.5684 (0.5865%)	US	4.4699	3.5799	0.6955	0.000008989	0.00000407	X	X	1	1.6154e-10	1.2377e-26
DYRK1A	-0.42 (25.64%)	-1.1473 (10.4399%)	B										
SHANK3			US	5.32	3.1099	0.9925	X	X	0.01137	0.01996	0.9998	0.0001604	2.4774e-11
SHANK3			US	4.0599	4.0599	0.9957	0.0325	0.03396	0.04132	0.02869			
Kategori 2													
ILF2	-0.03 (51.04%)	-0.6572 (22.1994%)	US	4.94	-0.273	0.8065	0.005265	0.004232	0.004463	0.002744	0.9971	0.002948	2.989e-8
KDM5B	-1.72 (2.48%)	-2.3443 (2.1505%)	US	5.73	4.8299	0.9991	0.001826	0.004757	0.002004	0.002587	0.00005094	0.9999	1.6954e-10
BAZ2B	-1.42 (4.06%)	-1.0079 (13.0890%)	US										
BAZ2B			B										
SCN9A	0.33 (73.63%)	0.2521 (61.3783%)	US	5.6399	2.5599	0.8912	0	0.000004065	X	0.00003228	9.3019e-13	0.9985	0.001498
SCN9A													
GIGYF2	-1.15 (6.33%)	-0.6087 (23.7537%)	US	3.2599	-6.51	X	X	X	X	X	1	2.065e-11	4.0783e-28
GIGYF2													
GIGYF2													
CNTN4													
FOXP1	-0.38 (28.01%)	-1.5580 (5.6403%)	US	0.456	0.2443	X	X	X	0	0.006662			
FOXP1			US	1.7	-3.0699		0.008857	0.03988	X	X	0.9998	0.0002493	1.4677e-11
TBL1XR1	-0.16 (41.25%)	-0.5332 (26.3441%)	B										
KMT2C	-2.52 (0.91%)	-3.2660 (0.8113%)	P	4.67	2.8299	0.9961	X	X	X	X	1	2.5331e-15	2.3364e-47
KMT2C			P	5.53	2.44	0.9956	0.001375	0.002165	0.02214	0.04133			
CNTNAP2	-2.25 (1.3%)	-0.0663 (46.2659%)	B	3.3699	2.23	X	X	X	' 0.2931	' 0.2994	0.00003829	0.9999	0.000003722

MET													
MET	-0.46 (23.73%)	-0.5725 (24.9658%)	US	6.0199	6.0199	0.9991	0.00001795	0.000008132	X	X	0.9964	0.003587	3.3119e-12
CNTNAP2	-2.25 (1.3%)	-0.0663 (46.2659%)	US	5.57	1.8899	X	0.01842	0.02193	0.0008495	0.001652	0.00003829	0.9999	0.000003722
KMT2C	-2.52 (0.91%)	-3.2660 (0.8113%)	US										
KMT2C			LB	5.51	1.72	0.3547	0.04005	0.04755	0.04506	0.03846	1	2.5331e-15	2.3364e-47
KMT2C			US	5.51	4.4099	0.9929	0.00002686	0.002429	0	0.0009369	1	2.5331e-15	2.3364e-47
KMT2C			US	4.67	4.67	0.9572	0.04601	0.03087	0.001193	0.0009025			
KMT2C			US	4.67	2.0999	0.9953	X	X	X	X			
KMT2C			B										
KMT2C			US										
KMT2C			B										
KMT2C			US										
KMT2C			US										
KMT2C			US										
KMT2C			US	5.6799	4.53	0.9948	0.001772	0.003204	0.006593	0.01899			
KMT2C			LB										
KMT2C			US	4.8699	4.8699	0.9908	0.00002179	0.0001054	0	0			
KMT2C			B										
WAC			B										
SHANK2			B										
SHANK2			LB										
SHANK2			B										
SMARCC2	-1.66 (2.71%)	-1.2822 (8.5142%)	US	3.6767	0.4653	X	X	X	0.0001601	0.0002506	0.2566	0.7159	0.02743
SMARCC2			B										
USP15	-0.98 (8.75%)	-0.8807 (16.2072%)	B										
GRIP1	-0.53 (20.86%)	-0.5475 (25.8162%)	LB	4.8299	-2.0799	0.3778	0.00251	0.001629	0.003664	0.002259	0.9169	0.08311	1.5946e-9

GRIP1			US	5.36	5.36	0.9973	0.001184	0.001232	0.0004665	0.0004843			
INTS6	-0.87 (10.73%)	-1.0617 (11.8671%)	US	5.5199	4.32	0.8359	0.0102	0.01776	0.008616	0.009864	0.9999	0.000003465	1.0743e-14
IRF2BPL	9.26%	-1.3469 (7.6637%)	US	3.6493	2.7116	X	X	X	X	X	0.9689	0.03102	0.00004752
IRF2BPL			US	2.24	-3.13	X	0.0001671	0.00005919	0.002122	0.001171			
MAGEL2	NA (NA)	0.6602 (77.3607%)	LB										
MAGEL2			LB										
GABRB3	-0.49 (22.36%)	-0.5606 (25.3568%)	US	4.88	0.5979	0.6934	X	X	0.02685	0.03671	0.9971	0.002926	1.4504e-7
GABRB3			US	0.3589	0.3589	0.314	X	X	X	X			
GABRB3			US	5.1399	2.91	0.9905	0.001689	0.001194	0.001999	0.001066			
CHD2			US	4.82	4.82	0.9932			X	X	1	1.1546e-9	1.2344e-26
CHD2			LB				0.000008957	0.000004062					
CACNA1H	-2.06 (1.63%)	-0.0254 (48.1818%)	B										
SRCAP	-4.14 (0.15%)	-4.2633 (0.3324%)	LB										
BCKDK													
ANKRD11			B										
CIC													
MBOAT7	-0.53 (20.7%)	0.0544 (52.1017%)	LB										
TNRCB6													
TCF20	-2.55 (0.85%)	-3.3096 (0.7820%)	US	5.5199	5.5199	0.9437	0.01315	0.01683	0.01153	0.008432	0.9999	0.00002207	3.9967e-14
DDX3X	-0.12 (44.54%)	-0.8866 (14.1066%)	B										
Kategori 3													
AMPD1	0.07 (59.17%)	0.1682 (57.6344%)	US	5.3899	4.48	X	0.00003581	0.001153	0	0.00006515	3.7798e-12	0.4887	0.5113

HIVEP3	-0.51 (21.21%)	0.8324 (82.5904%)	US	3.8099	3.8099	0.9989	X	X	X	X	0.03081	0.9692	1.3847e-7
HIVEP3			US	4.8899	-5.11	0.1727	0.03567	0.04642	0.04528	0.04473			
HIVEP3			B										
PYHIN1	7.61E-05 (53.98%)	0.8518 (83.0205%)	US	2.2699	1.2699	0.9939	0.01441	0.01016	0.01453	0.009434	0.0009171	0.9402	0.05892
PYHIN1			US	X	X	X	X	X	0.02443	0.02732			
DISC1	0.2 (67.46%)	1.0960 (87.9863%)	US	2.71	-0.33	0.8948	0.02271	0.01839	0.01765	0.0123	X	X	X
DISC1			US	3.3499	-4.9	0.6224	X	X	0.004596	0.002711	X	X	X
DISC1			US	4.7199	3.8099	0.9903	0.01459	0.01025	0.01739	0.01131	X	X	X
DNMT3A													
ADCY3	-2.17 (1.42%)	-1.8177 (3.9198%)	US	5.48	0.92	0.6087	0.00004654	0.0000465	0.0001336	0.00006471	0.001379	0.9986	0.00001288
DPP10	0.38 (75.65%)	0.1674 (57.5758%)	B										
CLASP1	NA (NA)	NA (NA)	US	5.55	5.55	0.9952	0	0.000008427	X	X	1	1.1129e-8	7.5199e-23
CLASP1			US	5.1599	1.1	0.9794	0.0002588	0.001654	0.0001999	0.001098			
MBD5	-2.12 (1.52%)	-2.4740 (1.8084%)	US	6.01	6.01	0.997	0.000008969	0.00006099	0.00006664	0.00006459	0.9999	0.0001477	2.0259e-11
ZNF804A			US	5.57	4.5799	0.9806	X	X	X	X	0.8274	0.1726	0.000006534
ZNF804A	1.3 (93.91%)	0.1557 (57.0479%)	US	4.6399	4.6399	0.9983	0.03695	0.02459	0.03343	0.02153	0.8274	0.1726	0.000006534
HECW2	-2.47 (0.98%)	-0.7322 (20.0587%)	B										
PARD3B													
VIL1	0.21 (67.54%)	0.1096 (54.7703%)	LB	4.8	0.679	0.3403	0.008007	0.007219	0.008006	0.005753	0.00001213	0.9995	0.0004732
VIL1			US	4.3899	-1.7599	0.5221	0	0.00001224	0.00006669	0.0000323			
PER2	-1.18 (5.92%)	0.3714 (66.5494%)	US	4.55	2.3499	0.9492	0.003586	0.001833	0.002599	0.001421	0.933	0.06699	4.5471e-9
ROBO2	-1.5 (3.6%)	-1.5275 (5.8260%)	LP	4.5	4.5	0.9904	0.02735	0.01946	0.01257	0.007643	0.9999	0.000003869	4.7687e-18

SETD2	-0.94 (9.42%)	-1.9037 (3.4800%)	US	5.1799	3.99	0.9977	0	0.001739	0.00006663	0.00009688	0.9999	0.000007056	6.9869e-21
PLXNB1	-2.51 (0.93%)	0.3198 (64.3011%)	US	4.5599	3.3699	0.9886	0.0001091	0.0001104	0.0002008	0.00009717	0.8502	0.1498	1.2515e-11
AMT	-0.38 (28.01%)	-0.3704 (32.7273%)	US	5.4299	3.64	0.9953	0.01138	0.01057	0.01028	0.008017	0.0005695	0.8957	0.1038
ZBTB20	0.35 (74.49%)	-0.9260 (14.9267%)	US	5.1599	3.98	X	X	X	X	X	0.9826	0.01743	0.00001144
ZBTB20			B										
ZBTB20			B										
CEP135	0.43 (77.35%)	0.0891 (53.8416%)	LB	5.5399	-1.83	0.8718	X	X	X	X	4.8541e-17	0.9725	0.02748
TET2	1.97 (97.56%)	-0.6319 (22.9423%)	US	5.4	4.5599	0.9988	0.01907	0.01567	0.01746	0.01314	7.0537e-26	0.000003669	0.9999
TET2			LB										
TET2			B										
TET2													
SLC6A3													
SEMA5A													
SEMA5A	-0.45 (23.73%)	0.2557 (61.5054%)	US	1.7699	0.8859	0.8562	0.04835	0.04167	0.04913	0.04271	0.0009796	0.999	0.000004265
RBM27	-0.84 (11.36%)	-1.2906 (8.3969%)	US	1.11	1.11	X	0	0	0.001388	0.006054	1	5.7948e-8	1.0221e-19
RBM27			LB										
CUL7													
PTK7													
KIAA1586	0.58 (82.3%)	-0.1004 (44.7019%)	US	3.8199	1.8999	0.9917	0	0.000004762	X	X	0.000001778	0.6657	0.3343
PHIP	-1.24 (5.49%)	-2.6798 (1.4467%)	US	5.8899	1.94	0.8904	0.00002711	0.00002466	0.00006672	0.00003232	1	5.2298e-8	1.1057e-24
GRIK2	-1.13 (6.48%)	-1.3401 (7.7810%)	B										
GRIK2			B										
GRIK2			LB										

GIGYF1	-1.66 (2.75%)	-2.0342 (3.0205%)	US	4.42	4.42	0.9973	X	X	X	X	0.9787	0.02129	5.2667e-11
KMT2E	-1.45 (3.9%)	-3.2352 (0.8504%)	US	2.985	1.2875	X	0.01538	0.02042	0.02335	0.02589	0.9975	0.002496	0.002496
AKAP9	0.22 (68.45%)	-0.7706 (18.9052%)	US	4.38	1.71	0.4279	0.01817	0.02159	0.02201	0.01664	0.00002294	0.9999	4.2109e-21
AKAP9			B										
AKAP9			LB										
GIGYF1			US	5.1399	-4.5199	0.8759	0.03861	0.02751	0.03277	0.02179	0.9787	0.02129	5.2667e-11
GIGYF1			US	4.2267	3.2067	X	0.001043	0.0009706	0	0			
ACHE	-0.6 (18.14%)	-0.4616 (29.0225%)	LB										
ACHE			US	5.0199	1.95	0.6721	0.00001072	0.000004915	X	X			
KMT2E			US	3.5899	1.1299	X	X	X	0.001821	0.004137			
FOXP2													
LAMB1	-0.99 (8.55%)	-1.1635 (10.2053%)	US	5.42	5.42	0.9892	X	X	X	X	0.000001794	0.9999	1.7143e-10
LAMB1			US	0.3044	-0.2378	X	X	X	X	X			
LAMB1			US	5.55	3.73	0.9768	0.0001075	0.000264	0.0001999	0.0001291			
LAMB1			US	5.3099	5.3099	0.9993	0	0.00001627	X	X			
PLXNA4	-0.19 (39.21%)	-1.3662 (7.4682%)	US	1.7799	-0.126	0.3915	0.01241	0.01008	0.009804	0.005911	1	2.9789e-7	4.5679e-20
UBE3C													
TBC1D31	0.1 (60.76%)	0.1237 (55.5034%)	US	5.6999	-2.69	0.9365	0.002993	0.002508	0.002864	0.002485	1.3437e-9	0.9994	0.0006353
TRAPPC9	-1.65 (2.77%)	0.3649 (66.2463%)	B	2.3599	-1.6699	0.4799	X	X	0.5474	0.3889	0.00000576	0.9999	0.00005648
TRAPPC9													
DOCK8	-1.94 (1.9%)	-0.6389 (22.7664%)	US	5.69	5.69	0.9968	0.00009867	0.00005285	X	X	0.0001354	0.9999	4.1634e-11
DOCK8			B										
DOCK8			LB	3.4	-6.34	0.7894	0.000009019	0.0000734	X	X			
DOCK8													

PAX5	0 (53.73%)	0.2627 (61.8182%)	US	5.5199	-0.4059	0.944	0.03616	0.02422	0.03242	0.02148	0.9842	0.01575	0.000008913
PHF2	-1.03 (7.86%)	-0.6536 (22.3167%)	US	4.9899	4.9899	0.9978	X	X	X	X	0.9941	0.005868	1.3299e-9
PHF2			B	3.7999	-1.7699	X	X	X	0.6626	0.6619			
EHMT1	-1.58 (3.13%)	-2.2762 (2.2776%)	US	5.42	5.42	0.999	0.00007171	0.00004473	0.00006665	0.00003229	1	9.5988e-8	3.4945e-19
CACNB2													
CACNB2	-0.71 (14.78%)	0.0986 (54.2522%)	B										
CACNB2													
ANK3	-3.5 (0.34%)	-4.7943 (0.1857%)	US	5.4099	4.3099	X	0	0.00000408	X	X	1	7.9161e-14	8.8895e-37
ANK3													
TCF7L2	-0.22 (37.54%)	-0.9138 (15.2688%)	B										
TCF7L2			B										
TCF7L2			US	5.36	5.36	0.9924	0.0003261	0.003624	0.0005349	0.002072	0.9896	0.01039	2.6639e-8
NAV2	-1.56 (3.22%)	-2.0973 (2.7859%)	US	1.58	0.3379	X	0.0006036	0.03499	0.0005346	0.01984	0.9975	0.002483	4.5773e-16
PHRF1	-1.58 (3.13%)	-0.3282 (34.4770%)	US	4.46	0.2939	0.9954	0.03635	0.03719	0.03922	0.02891	0.9489	0.05108	4.6385e-10
TRPC6	-1.29 (5.08%)	-1.4226 (6.7351%)	US	5.6399	3.75	0.9258	0.000008966	0.000004064	X	X	0.004564	0.9952	0.0002766
PRICKLE1			B										
PAH	-0.71 (14.67%)	0.5582 (73.8905%)	P	5.34	5.34	0.9984	0.0001971	0.0001097	0.00006671	0.00003233	1.1952e-10	0.3074	0.6926
HECTD4													
HECTD4	NA (NA)	NA (NA)	US	1.11	-1.7599	X	0.01352	0.02435	X	X	X	X	X
HECTD4													
HECTD4			US	5.8499	-11.6999	0.7715	0.005447	0.006933	0.005927	0.004389	1	4.0137e-14	5.7657e-41
EP400													
EP400	-3.86 (0.22%)	-1.3748 (7.3216%)	US	2.72	-5.4299	0.7971	0.04868	0.03233	0.04389	0.02988	1	1.1679e-10	1.5787e-32

EP400			US	0.1309	-0.261	X	X	X	X	X			
EP400			US	2.5599	-4.65	X	0.00006484	0.00002905	0.0002675	0.0001297			
GPHN	0.06 (58.74%)	-1.2610 (8.8074%)	B										
NRXN3	-1.55 (3.27%)	-2.7556 (1.2610%)	US	6.1599	5.28	0.9716	0.007414	0.004683	0.006067	0.003875	0.9999	0.0001445	1.9217e-11
UNC79	-1.11 (6.63%)	-2.7531 (1.2708%)	US	5.94	5.94	0.9982	0.0001524	0.00006914	0.0002664	0.0001291	1	2.6091e-11	1.2086e-30
ATP10A	1.29 (93.86%)	0.1726 (57.8201%)	US	3.7699	-0.765	X	X	X	X	X	0.611	0.3889	5.0196e-9
CYFIP1	-1.3 (4.99%)	-1.8425 (3.7830%)	B										
ATP10A			US	4.6799	4.6799	0.9992	0.03487	0.04572	0.04061	0.04866	0.611	0.3889	5.0196e-9
ATP10A													
ATP10A			B										
TRPM1	1.75 (96.69%)	0.3525 (65.7087%)	US	1.1399	1.1399	X	X	X	0.0001515	0.0001607	1.1683e-31	0.0003712	0.9996
TRPM1			LB										
TRPM1			LB										
TRPM1			US	5.5999	4.6799	0.9974	X	X	X	X			
FBN1	-2.81 (0.64%)	-4.1007 (0.3812%)	US	5.5999	5.5999	0.9991	X	X	X	X	1	1.0467e-17	7.7415e-45
MYO5A	-1.41 (4.15%)	-1.9870 (3.1867%)	US	5.78	-0.702	0.6264	0.02757	0.01872	0.02804	0.02179	0.9921	0.00787	1.2847e-17
CGNL1	0.33 (73.43%)	0.0672 (52.7175%)	B										
CGNL1			B										
CGNL1													
RBFOX1													
RBFOX1	-0.47 (23.51%)	-0.7723 (18.8368%)	US	0.6919	0.6919	X	X	X	0.01472	0.02845	0.9359	0.06404	0.000002419
RBFOX1			LB	5.65	3.64	0.9454	0.002657	0.001849	0.002332	0.001647			
CNTNAP4			B										
WWOX	1.1 (91.92%)	2.0435 (97.1163%)	LB										

WVOX			US	4.46	-4.28	0.7329	0.00001908	0.007839	0.0001333	0.001453			
CHMP1A	0.15 (64.51%)	0.3813 (66.9501%)	B										
SLC38A10	1.13 (92.24%)	1.0027 (86.4321%)	B										
KDM6B	-1.32 (4.79%)	-0.5557 (25.5327%)	B										
KDM6B			B										
SLC35B1	-0.16 (41.91%)	0.3722 (66.5885%)	US	4.48	4.48	0.9976	0		X	X	0.01329	0.9546	0.03215
SLC35B1			US	1.2899	-2.5799	0.3048	X	0.000004061	X	0.009939	0.006333		
SLC35B1			B										
SLC35B1			US	5.09	5.09	0.9994	0.00002843	0.0001098	X	X			
CELF4													
TCF4	-0.56 (19.54%)	-0.5313 (26.4125%)	US	5.65	-7.9299	0.8443	X	X	0.03124	0.02482	0.9999	0.0001335	1.5833e-11
MYO9B													
MYO9B													
MYO9B													
ZC3H4	-1.32 (4.78%)	-0.3238 (34.6921%)	B										
ZC3H4			US	5.2399	4.19	0.9881	0.0259	0.01568	0.02318	0.01528			
ZC3H4													
ZC3H4			US	3.17	2.0999	0.9925	0.04182	0.03512	0.04819	0.03436	1	2.2757e-7	1.4142e-17
CNOT3	-0.6 (18.14%)	-0.0487 (47.1163%)	US	4.96	2.5399	0.9853	0.0235	0.01449	0.02579	0.01598	0.9999	0.00003278	2.5594e-12
PLCB1	-0.84 (11.48%)	-1.3180 (8.0645%)	US	5.9499	-1.82	0.694	0.005779	0.003533	0.005129	0.003131	0.979	0.02096	1.0242e-11
PLCB1			B										
PLCB1			B										
PLCB1			US	5.98	5.03	0.9993		0.00007389	0				
SLC12A5			B				0.000009095			0.00003229			

MACROD2	0.46 (78.59%)	0.4418 (69.4233%)	B										
MACROD2			US	5.86	1.0099	0.8601	0.001484	0.03533	0.001599	0.01583	0.01136	0.9869	0.001788
NINL	1.42 (94.94%)	2.1357 (97.5171%)	US	2.4	0.14	0.9603	0.00007207	0.00004148	X	X	3.9683e-33	0.00001361	0.9999
NINL			US	3.44	2.45	0.9888	0.0003674	0.0002349	0.0003344	0.0001619			
DIP2A	-2.78 (0.68%)	-1.2700 (8.6804%)	US	5.34	5.34	0.8226	0.0001433	0.0002763	0.0001332	0.0001936	0.7261	0.2739	1.6672e-9
PRODH	1.74 (96.63%)	1.7266 (95.3763%)	B										
PRODH			US	4.21	0.8579	0.9549	0.05593	0.04935	0.05317	0.04619	0.000004754	0.8516	0.1484
PRODH			US	4.63	4.63	0.1463	0.005613	0.003568	0.007236	0.00464			
PRODH													
PRODH			US	2.4	-1.12	0.9532	0.00009411	0.0001152	0.00006719	0.00003283			
NLGN4X	-0.84 (11.18%)	-1.7294 (3.2915%)	B										
CNKS2	-0.47 (23.25%)	-1.4550 (5.3292%)	US	5.28	3.66	X	0.001298	0.001981	0.00009693	0.0000476	0.9997	0.0002519	1.5065e-11
KDM5C	-1.51 (3.5%)	-2.3195 (1.5674%)	B										
KDM5C													
KIAA2022	-0.77 (13.1%)	-2.5340 (1.0972%)	LB										

RVIS (Residual Variation Intolerance Score)

American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Sınıflaması: **B:** Benign **LB:** Likely benign **US:** Uncertain significance **LP:** Likely pathogenic **P:** Pathogenic

GERP: Genomik evrim oranı profillemesi (*Genomic evolutionary rate profiling*)

Avrupa (NF): Finli olmayan Avrupa popülasyonu

SOSYODEMOGRAFİK VERİ FORMU

Adı soyadı:

Doğum tarihi:

Cinsiyet: E: ☐ K: ☐

Ulaşılabacak telefon numaraları: 1) 2)

Öğrenim durumu: 1) İlköğretim ☐ 2) Lise ☐ 3) Devamsız ☐

Kaynaştırma durumu: 1) Kaynaştırma almıyor ☐ 2) Kaynaştırma alıyor ☐ 3) OÇEM ☐

Okul başarısı: 1-Pekiye ☐ 2) İyi ☐ 3) Orta ☐ 4) Kötü ☐ 5) Devamsız ☐

Özel Eğitim Durumu: 1. Devam ediyor ☐ (Ne kadar süredir belirtiniz:)
2. Devam etmiyor ☐ (Ne kadar süre gitti belirtiniz:)
3. Hiç gitmedi ☐

Anne: Sağ / Yok / Üvey Baba: Sağ / Yok / Üvey

Akraba evliliği: 1) Var (.....) 2) Yok

Kardeş sayısı: 1-2-3-4-5 ve üstü

Ailenin kaçınıcı çocuğu: 1-2-3-4-5 ve üstü

İnfertilite: 1) Var ☐ (Yardımcı üreme teknikleri belirtiniz) 2) Yok ☐

Gebelik sıralaması: (kardeşler isim-doğum tarihi-eğitim durumu-sağlık durumu)
(düşük, ölü doğum, küretaj varsa sıralamada belirtiniz)

1) - - -
2) - - -
3) - - -
4) - - -
5) - - -
6) - - -

Annenin doğum tarihi:

Babanın doğum tarihi:

Anne-babanın evlilik yılı:

Anne babanın birliktelik durumu:

1) Birlikte ☐ 2) Boşanmış ☐ 3) Boşanmamış, ayrı yaşıyor ☐ 4)Diğer ☐ (.....)

Annenin Eğitim durumu

1) Okuma yazma yok ☐ 2) İlköğretim ☐ 3) Lise ☐ 4) Üniversite-Yüksekokul ☐

Annenin işi: 1) Çalışıyor ☐ (Belirtiniz:) 2: Ev Hanımı ☐

Babanın eğitim durumu:

1) Okuma yazma yok ☐ 2) İlköğretim ☐ 3) Lise ☐ 4) Üniversite-Yüksekokul ☐

Babanın işi: 1) Çalışıyor ☐ (Belirtiniz:) 2) Çalışmıyor ☐ 3) Emekli ☐

Ailenin gelir durumu: 1) Alt ☐ 2) Orta ☐ 3) Üst ☐

Ailede fiziksel hastalığı olan var mı?

1) Var ☐ (Kim ve hastalık tanısı:) 2) Hayır ☐

Ailede ruhsal hastalığı olan var mı?

1)Var ☐ (Kim ve hastalık tanısı:) 2) Hayır ☐

Ailede Otizm Spektrum Bozukluğu tanısı olan var mı?

1) Var ☐ (Kim ve hastalık tanısı:) 2) Hayır ☐

Akran ilişkisi: 1- İyi , yeterli sayıda arkadaş
2- Yetersiz sayıda arkadaş
3- Sorunlar var
4- İlişki kuramıyor

PRENATAL:

Düşük tehdidi :bb 1- Var ☐ 2-Yok ☐

Sigara kullanımı : 1- Var ☐ 2-Yok ☐

Alkol kullanımı : 1- Var ☐ 2-Yok ☐

Madde kullanımı : 1- Var ☐ 2-Yok ☐

X-Ray : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Travma : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Operasyon : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

İlaç kullanımı : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

**Enfeksiyon
öyküsü :** 1- Var ☐ 2- Yok ☐

DOĞUM :

- 1- NSVY
- 2- Sezaryen
- 3- Forseps yardımı ile
- 4- Vakum yardımı ile

- 1- Term
- 2- prematurite
- 3- Postmaturite

Doğum ağırlığı:

Doğumdan hemen sonra ağlamama : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Mor doğum : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Mekanyum aspirasyonu : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Kordon dolanması : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Küvöz bakımı : 1- Var ☐ 2- Yok ☐ (Süresi:.....)

Mekanik ventilatör : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Kan uyuşmazlığı : 1 - Var ☐ 2- Yok ☐

Doğum sonrasında Sarılık : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Kan Transfüzyonu : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Havale Öyküsü : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Operasyon : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Travma : 1- Var ☐ 2- Yok ☐

Aşılar : 1- Tam ☐ 2- Tam değil ☐

Geçirilmiş tıbbi hastalık öyküsü : 1-Var ☐ 2- Yok ☐

Anne sütü: 1- Var 2- Yok

GELİŞİM :

Başını dik tutma :

Destekli oturma :

Desteksiz oturma :

Yürüme :

Konuşma :

- **Tek kelime:**
- **Basit cümle:**

Tuvalet eğitimi :

Regresyon:

El dominansı: Sağ : ☐ Sol : ☐ Her iki el : ☐

TIBBİ DURUM:

Boy: **Kilo:**

Tanı aldığı yaş:

Kullanmakta olduğu ilaçlar:

Zeka Puanı:

Psikiyatrik ek tanılar:

Tıbbi ek tanılar:

EEG: 1- Normal ☐ 2- Patolojik ☐

Epilepsi tanısı: 1- Var ☐ (En son nöbet geçirdiği tarih) 2- Yok ☐

MR: 1- Normal ☐ 2- Patolojik ☐

EK 9. Çocukluk Otizmini Değerlendirme Ölçeği

C A R S Değerlendirme Formu

erge: Herbir kategori için, herbir ölçeğin altında bırakılan yeri kullanınız. Çocuğu gözlemlemeyi bitirdikten sonra, ölçeğin deleriyle ilgili davranışları değerlendiriniz. Her madde için çocuğu en iyi biçimde tanımlayan ifadenin numarasını daire içine alınız. ifade arasında değerlendirmeniz gerekiyorsa 1.5, 2.5 ya da 3.5 değerlerinden birini kullanabilirsiniz. Her ölçek için kısaltılmış erlendirme ölçütü gösterilmiştir. Ayrıntılı dereceleme için El Kitabı'nın ikinci bölümüne bakınız.

- I. İNSANLARLA İLİŞKİ**
- 1 İnsanlarla ilişki kurmada bir anormallik ya da zorluk belirtisi yok • Çocuğun davranışı yaşına uygun. Bir şey yapması istendiğinde utangaçlık, mızızlık ya da rahatsızlık belirtileri gözlenebilir, ancak bunlar atipik derecede değildir.
- 1.5 Hafif derecede anormal ilişki • Çocuk yetişkinin gözüne bakmaktan kaçınabilir, yetişkinden kaçınabilir ya da etkileşime zorlandığı zaman huysuzlanabilir, çok utangaç olabilir, yetişkine tipik tepkiler vermeyebilir ya da yaşlılarından biraz daha fazla anne-babaya yapışabilir.
- 2 Orta derecede anormal ilişki • Çocuk zaman zaman çevreden kopmuş (yetişkinin farkında değilmiş) gibi görünür. Çocuğun dikkatini çekmek için zaman zaman ısrarlı ve zorlayıcı girişimler gerekir. Çok az ilişki çocuk tarafından başlatılır.
- 2.5 Ağır derecede anormal ilişki • Çocuk sürekli bir şekilde çevreden kopuktur ya da yetişkinin ne yaptığının farkında değildir. Hemen hemen hiç bir zaman yetişkine tepki vermez ya da yetişkinle ilişki başlatmaz. Çocuğun dikkatini çekmek için ancak çok ısrarlı girişimlerin bir etkisi olabilir.
- 3,5
- 4

Gözlemler:

- III. DUYGUSAL TEPKİLER**
- 1 Yaş ve duruma uygun duygusal tepkiler • Çocuk, duygusal tepkilerini, uygun tarz ve derecede, yüz ifadesi duruş ve davranış değişikliği ile gösterir.
- 1.5 Hafif derecede anormal duygusal tepkiler • Arasında çocuk, kısmen uygun olmayan tarz ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler bazen, tepkileri çevreleyen nesneler ve olaylarla ilişkili değildir.
- 2 Orta derecede anormal duygusal tepkiler • Çocuk belirgin olarak uygun olmayan tarz ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler azalmış ya da abartılı ya da durumla bağintisiz olabilir; duygu uyandıran belirgin olaylar ve nesneler olmasa bile "grimace", gülme, ya da kaskatı kesilme görülebilir.
- 2.5
- 3
- 3.5
- 4 Ağır derecede anormal duygusal tepkiler • Tepkiler nadiren duruma uygundur; çocuk belirli bir duygu durumunda iken bu durumu değiştirmek çok zordur. Buna karşın, hiçbir şey değişmediği halde aşırı duygu değişiklikleri gösterebilir.

Gözlemler:

- II. TAKLİT**
- 1 Uygun taklit • Çocuk, beceri düzeyine uygun ses, kelime ve hareketleri taklit edebilir.
- 1.5 Hafif derecede anormal taklit • Çocuk çoğu zaman el çırpma, tek ses çıkartma gibi basit davranışları taklit eder; bazen sadece zorlandıktan sonra ya da gecikmeli olarak taklit eder.
- 2 Orta derecede anormal taklit • Çocuk ancak arada taklit eder ve bu, yetişkinin yoğun yardım ve ısrarını gerektirir; taklit çoğunlukla gecikmeli olarak ortaya çıkar.
- 2.5
- 3
- 3.5
- 4 Ağır derecede anormal taklit • Çocuk, yetişkinin ısrar ve yardımına rağmen sesleri, kelimeleri, hareketleri çok seyrek taklit eder ya da hiç etmez.

Gözlemler:

- IV. BEDENİN KULLANIMI**
- 1 Bedenin yaşa uygun kullanımı • Çocuk normal yaşlıları ile aynı rahatlık, çeviklik ve koordinasyonla hareket eder.
- 1.5 Bedenin hafif derecede anormal kullanımı • Hantallık, yineleyici hareketler, koordinasyon zayıflığı gibi küçük, kendine özgü tuhaflıklar olabilir ya da seyrek olarak alışılmadık beden hareketlerine rastlanabilir.
- 2
- 2.5 Bedenin orta derecede anormal kullanımı • Bu yaştaki bir çocuk için alışılmadık ya da belirgin derecede garip olan parmak hareketleri, tuhaf parmak ve vücut duruşu, beden bir parçasına takılıp kalma ya da cıvıkleme, kendine yönelik saldırganlık, sallanma, dönme, parmak oynatma, ayak uçlarında yürüme gibi davranışlar görülebilir.
- 3
- 3.5 Bedenin ağır derecede anormal kullanımı • Yukarıda sıralanan hareketlerin sık ya da yoğun görülmesi, bedenin ağır derecede anormal kullanımının belirtileridir. Bu davranışlar, bunları engelleme ya da çocuğu başka etkinlikler içine sokma girişimlerine karşın ısrarlı bir devamlılık gösterebilir.
- 4

Gözlemler:

V. NESNE KULLANIMI

- 1 Oyuncak ve diğer nesnelere uygun ilgi ve kullanım • Çocuk, kendi beceri düzeyine uygun oyuncaklar ve diğer nesnelere normal ilgi gösterir. Bve bu oyuncakları normal şekilde kullanır.
- 1.5 Oyuncak ve diğer nesnelere hafif derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım • Çocuk bir oyuncaka atıptık bir ilgi gösterebilir ya da onunla uygun olmayan bebeksi biçimde oynar (oyuncağa vurma, emme gibi).
- 2.5 Oyuncak ve nesnelere orta derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım • Çocuk oyuncaklara ve diğer nesnelere çok az ilgi gösterebilir ya da bir oyuncak ya da nesneyi tuhaf bir şekilde kullanmaya kendini kaptırması olabilir. Oyuncanın önemsiz bir parçasına odaklanabilir, nesnenin yansıttığı ışıktan çok hoşlanabilir. Yineleyici bir biçimde oyuncanın bazı kısımlarını hareket ettirebilir ya da yalnızca bir nesne ile yoğun bir şekilde oynar.
- 3.5 Oyuncak ve nesnelere ağır derecede uygun olmayan ilgi ve kullanım • Çocuk yukarıdaki davranışları daha sık ve yoğun olarak gösterebilir. Bu uygun olmayan etkinliklere kendini kaptırdığında, çocuğun dikkatini bir başka tarafa çekmek zordur.

Gözlemler:

VIII. DİNLEME TEPKİSİ

- 1 Yaşa uygun dinleme tepkisi • Çocuğun dinleme davranışı normal ve yaşına uygundur. Dinleme diğer duyularla birlikte kullanılır.
- 1.5 Hafif derecede anormal dinleme tepkisi • Belirli seslere karşı hafif tepkisizlik gösterebilir ya da hafif derecede fazla tepki verebilir. Seslere tepkiler gecikebilir, çocuğun dikkatini çekebilmek için sesin tekrar edilmesi gerekebilir. Çocuğun dikkati yabancı (dıştan gelen) seslerle dağılabilir.
- 2.5 Orta derecede anormal dinleme tepkisi • Çocuğun seslere tepkileri değişkenlik gösterir, ilk birkaç defada sesi duymazlıktan gelebilir, bazı günlük sesleri işittiği zaman ürkebilir ya da kulaklarını kapatabilir.
- 3.5 Ağır derecede anormal dinleme tepkisi • Çocuk, sesin türünden bağımsız olarak, seslere karşı aşırı derecede tepkisel ya da tepkisiz davranabilir.

Gözlemler:

VI. DEĞİŞİKLİĞE UYUM

- 1 Değişikliğe yaşa uygun uyum • Çocuk, alıştığı düzendeki değişiklikleri fark edebilir ya da bunları (sözel olarak) belirtebilir ise de yersiz rahatsızlık göstermeden bu değişiklikleri kabul eder.
- 1.5 Değişikliğe hafif derecede anormal uyum • Yetişkin yapılan etkinliği değiştirmeye kalktığı zaman çocuk aynı etkinliğe ya da aynı araç-gereci kullanmaya devam eder.
- 2.5 Değişikliğe orta derecede anormal uyum • Çocuk alıştığı düzendeki değişikliklere etkin olarak direnir, eski etkinliğe devam etmeye çalışır, dikkatini başka tarafa çekmek çok zordur. Düzen değiştirildiği zaman mutsuz ve öfkeli olabilir.
- 3.5 Değişikliklere ağır dercede anormal uyum • Çocuk değişikliğe ağır tepkiler verir. Eğer değişikliğe zorlanırsa çok fazla kızabilir ya da işbirliği yapmaz ve öfke nöbetleriyle tepki verebilir.

Gözlemler:

IX. TATMA, KOKLAMA, DOKUNMA TEPKİSİ VE KULLANIMI

- 1 Tatma, koklama ve dokunmaya normal tepki ve kullanım • Çocuk yeni nesneleri yaşına uygun şekilde, genellikle bakarak ve hissederek keşfeder. Tatma ve koklama duyularını gerektiğinde kullanabilir. Küçük, gündelik acı veren durumlar karşısında çocuk rahatsızlığını belirtir, ancak aşırı tepki göstermez.
- 1.5 Tatma, koklama ve dokunmaya hafif derecede anormal tepki ve kullanım • Çocuk nesneleri ısrarlı bir şekilde ağzına koyabilir, yemeyen nesneleri koklayabilir, tadabilir, normal çocukların rahatsızlık ifade ettikleri orta şiddetli ağrıları fark etmiyor gibi davranabilir ya da aşırı tepki verebilir.
- 2.5 Tatma, koklama ve dokunmaya orta derecede anormal tepki ve kullanım • Çocuk insanlara ya da nesnelere dokunma, koklama ve tatmaya yönelik orta derecede bir eğilim gösterebilir, çok az ya da çok fazla tepki erebilir.
- 3.5 Tatma, koklama ve dokunmaya ağır derecede anormal tepki ve kullanım • Çocuk normal kullanım ve keşfetme yerine, sadece duyumsama amacıyla nesneleri koklar, tadar ya da onlara dokunur. Çocuk ağrıyı (acıyı) ümüyle algılamaz görünür ya da hafif derecede rahatsızlık veren durumlarda çok aşırı tepki verir.

Gözlemler:

VII. GÖRSEL TEPKİ

- 1 Yaşa uygun görsel tepki • Çocuğun görsel davranışları normaldir ve yaşına uygundur. Görmek, yeni bir nesneyi keşfetmek için diğer duyularla birlikte kullanılır.
- 1.5 Hafif derecede anormal görsel tepki • Çocuğa zaman zaman nesnelere bakması hatırlatılmalıdır. Arkadaşları yerine ışığa ya da aynaya bakmakla daha çok ilgilenebilir, arasıra boşluğa gözünü dikip bakabilir ya da insanların gözlerine bakmaktan kaçınabilir.
- 2.5 Orta derecede anormal görsel tepki • Çocuğa sık sık yaptığına bakması hatırlatılmalıdır. Boşluğa gözünü dikip bakabilir, insanların gözüne bakmaktan kaçınabilir, nesnelere alışılmadık bir açıdan bakabilir, nesneleri gözlerine çok yakın tutabilir.
- 3.5 Ağır derecede anormal görsel tepki • Çocuk ısrarlı bir şekilde insanlara ya da belirli nesnelere bakmaktan kaçınır ve yukarıda tanımlanan diğer görsel tepkilerin aşırı biçimlerini sergiler.

Gözlemler:

X. KORKU YA DA SINIRLILIK

- 1 Normal korku ya da sınırlılık • Çocuğun davranışları hem yaşına hem de durumuna uygundur.
- 1.5 Hafif derecede anormal korku ya da sınırlılık • Çocuk, aynı yaş ve benzer durumdaki çocuğun tepkileriyle karşılaştırıldığında, arasıra çok az ya da çok fazla korku ve sınırlılık gösterir.
- 2.5 Orta derecede anormal korku ya da sınırlılık • Çocuk, benzer durumdaki daha küçük bir çocuk için bile tipik olandan biraz daha az ya da biraz daha fazla korku gösterir.
- 3.5 Ağır derecede anormal korku ya da sınırlılık • Zararsız olaylar ve nesnelere ilişkin yineleyici deneylerden sonra bile korku sürer. Çocuğu sakinleştirmek ya da rahatlatmak çok zordur. Buna karşın, çocuk aynı yaşta diğer çocukların kaçındığı tehlikelere karşı uygun davranışı göstermekte başarısızdır.

Gözlemler:

XI. SÖZEL İLETİŞİM 1 Yaşa ve duruma uygun normal sözel iletişim. 1.5 Hafif derecede anormal sözel iletişim ■ Konuşma genel olarak gerilik gösterir. Konuşmanın çoğu anlamlıdır; ancak ekolali ve kişi zamirlerinin ters kullanımı görülebilir. Bazı özel sözcükler ve jargon kullanılabilir. 2.5 Orta derecede anormal sözel iletişim ■ Konuşma olmayabilir. Konuşma olsa da sözel iletişim, 'anlamlı konuşma' ile 'jargon, ekolali, zamir değiştirme gibi kendine özgü konuşma' karışımından oluşabilir. Anlamlı konuşmada yoğun soru sorma ve belirli konular üzerinde ısrarla durma gibi özellikler görülebilir. 3.5 Ağır derecede anormal sözel iletişim ■ Anlamlı konuşma kullanılmaz. Çocuk bebekses sesler, tuhaf ya da hayvan seslerine benzer sesler, konuşmaya yakın karmaşık sesler çıkarabilir ya da tanıdık kelimeler ve cümlelerin tuhaf kullanımı görülebilir. Gözlemler:	XIII. ETKİNLİK DÜZEYİ 1 Yaşa ve koşullara uygun normal etkinlik düzeyi ■ Çocuk benzer koşuldaki normal bir yaşıtımdan ne daha fazla ne de daha az hareketlidir. 1.5 Hafif derecede anormal etkinlik düzeyi ■ Çocuk hafif derecede huzursuzdur ya da biraz "tembelce" ve yavaş hareket edebilir. Çocuğun etkinlik düzeyi performansını hafifçe etkiler. 2.5 Orta derecede anormal etkinlik düzeyi ■ Çocuk oldukça aktiftir ve onu zaptetmek zordur. Sınırsız enerjisi olabilir ve uykuya dalmakta güçlük çeker. Buna karşın, çocuk oldukça hareketsiz olabilir ve harekete geçirebilmek için oldukça fazla çaba gerekebilir. 3.5 Ağır derecede anormal etkinlik düzeyi ■ Çocuk hareketlilik ya da hareketsizliğin en uç noktalarındadır ve bir aşırı uçtan diğerine geçebilir. Gözlemler:
XII. SÖZEL OLMAYAN İLETİŞİM 1 Sözel olmayan iletişimin yaşa ve duruma uygun normal kullanımı. 1.5 Sözel olmayan iletişimin hafif derecede anormal kullanımı ■ Sözel olmayan iletişimin olgunlaşmamış kullanımı; yaşlılarının istediklerini daha belirgin işaret ettikleri ya da gösterdikleri durumlarda çocuk belirsizce işaret edebilir ya da istediğine uzanabilir. 2.5 Sözel olmayan iletişimin orta derecede anormal kullanımı ■ Çocuk genellikle isteklerini ya da gereksinimlerini sözel olmayan şekilde ifade edemez ve diğerlerinin sözel olmayan iletişimini anlayamaz. 3.5 Sözel olmayan iletişimin ağır derecede anormal kullanımı ■ Çocuk sadece belirgin bir anlamı olmayan garip ya da özel jestler kullanır ve diğerlerinin yüz ifadelerinin ya da jestlerinin farkında değildir. Gözlemler:	XIV. ZİHNSEL TEPKİLERİN DÜZEYİ VE TUTARLILIĞI 1 Normal ve pek çok alanda uygun tutarlılık gösteren zeka ■ Çocuk aynı yaştaki tipik çocuklar kadar zekidir ve olağandışı zihinsel becerileri ya da problemleri yoktur. 1.5 Hafif derecede anormal zihinsel işlevsellik ■ Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, yaklaşık tüm alanlarda beceriler aynı düzeyde gerilik gösterir. 2.5 Orta derecede anormal zihinsel işlevsellik ■ Çocuk genel olarak aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir ancak bir ya da daha fazla alanda normale yakın işlevsellik gösterebilir. 3.5 Ağır derecede anormal zihinsel işlevsellik ■ Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değilken, zihinsel gelişimin bir ya da daha fazla alanında normal bir çocuktan bile daha iyi işlev gösterebilir. Gözlemler:
XV. GENEL İZLENİMLER 1 Otizm yok ■ Çocuk otizme özgü belirtilerin hiçbirini göstermez. 1.5 Hafif otizm ■ Çocuk yalnızca az sayıda ya da yalnızca hafif derecede otizm belirtileri gösterir. 2.5 Orta derece otizm ■ Çocuk belirli sayıda ya da orta derecede otizm belirtileri gösterir. 3.5 Ağır otizm ■ Çocuk otizm belirtilerinden çoğunu ya da ağır derecede otizm gösterir. Gözlemler:	

C . A . R . S

ÇOCUKLUK OTİZMİNİ DEĞERLENDİRME ÖLÇEĞİ

Adı, Soyadı :	_____	Cinsiyet:	_____		
Test Tarihi : Yıl:	_____	Ay:	_____	Gün:	_____
Doğum Tarihi : Yıl:	_____	Ay:	_____	Gün:	_____
Takvim Yaşı : Yıl:	_____	Ay:	_____	Gün:	_____
Değerlendiren:	_____				

Kategorileri Dereceleme Puanları

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Toplam Puan	

Toplam Puan

15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Otistik Değil

Hafif Otistik

Ağır Derecede Otistik

Copyright (c) 1988 by Western Psychological Services. Translated and reprinted by under supervision of Fusun Akkök for research use by permission of the publisher, Western Psychological Services, 12031 Wilshire Boulevard, Los Angeles, California 90025, USA

Telif hakkı (c) Bu ölçeğin araştırma amacıyla tercüme ve kullanım hakkı, yayıncı Western Psychological Services tarafından Fusun Akkök'e verilmiştir.

Ek 10. Otizm Davranış Kontrol Listesi (ODKL)

OTİZM DAVRANIŞ KONTROL LİSTESİ

Adı Soyadı:
Dolduran Kişi:

Doğum Tarihi:
Doldurulma Tarihi:

YÖNERGE: Çocuğu en iyi tanımlayan maddenin karşısındaki sayıyı daire içine alınız.
Eğer ifade çocuğu tanımlamıyorsa boş bırakınız.

	Duyusal	İlişki Kurma	Beden ve nesne kullanımı	Dil Becerileri	Sosyal ve İlişkiler
1- Kendi etrafında uzun süre döner.			4		
2- Basit bir işi öğrenir, fakat çabucak unuttur.					2
3- Sosyal/çevresel uyaranlara çoğu zaman dikkat etmez.		4			
4- Basit emirleri bir kere söylendiğinde yerine getirmez (örn. otur, buraya gel, ayağa kalk).				1	
5- Oyuncakları uygun şekilde kullanmaz (örn. tekerlekleri döndürür).			2		
6- Öğrenme sırasında görsel ayırt etmesi zayıftır (büyüklük, renk ya da pozisyon gibi bir özelliğe takılır kalır).	2				
7- Sosyal gülümsemesi yoktur.		2			
8- Zamirleri ters kullanır (ben yerine sen).				3	
9- Belirli nesneleri bırakmamak için ısrar eder.			3		
10-İşitmiyor gibi görünür, bu nedenle bir işitme kaybı olduğu kuşkusu uyandırır.	3				
11-Konuşması detone ve aritmiktir.				4	
12-Kendi kendine uzun süre sallanır.			4		
13-Kendisine uzanıldığında kollarını uzatmaz (ya da bebekken uzatmazdı).		2			
14-Günlük programındaki/çevredeki değişikliklere aşırı tepkiler verir.					3
15-Başka insanların arasındayken çağrıldığında kendi ismine tepki vermez (Ayşe, Can, Zeynep).				2	
16-Kendi etrafında dönme, parmak ucunda yürüme, el çırpma gibi davranışları keserek birden bağırır ve ani hareketler yapar.			4		
17-Başka insanların yüz ifadelerine ve duygularına tepkisizdir.		3			
18-"Evet" veya "ben" sözcüklerini nadiren kullanır.				2	
19-Gelişimin bir alanındaki özel yetenekleri zekâ geriliği kuşkusu dışlar niteliktedir.					4
20-Yer bildiren sözcükleri içeren basit emirleri yerine getirmez (örn. "topu kutunun üstüne koy" ya da "topu kutunun içine koy").				1	
21-Bâzen yüksek bir sese sağır olduğunu düşündürmesine "irkilme" tepkisi göstermez.	3				
22-Ellerini amaçsızca sallar.			4		
23-Büyük öfke nöbetleri ya da sık sık küçük öfke nöbetleri geçirir.					3
24-Göz temasından aktif bir şekilde kaçınır.		4			

25-Dokunulmaya ya da tutulmaya karşı koyar.		4			
26-Bazen çürükler, kesikler ve iğne yapılma gibi acı verici uyaranlara hiç tepki vermez.	3				
27-Gergin ve kucaklanılması güçtür (şimdi ya da bebekken).		3			
28-Kucaklandığında pelte gibidir (sarılmaz, tutunmaz).		2			
29-İsteddiği şeyleri göstererek elde eder.				2	
30-Parmak uçlarında yürür.			2		
31-Başkalarını ısırarak, vurarak, tekmeleyerek incitir.					2
32-Cümleleri defalarca tekrarlar.				3	
33-Oyun oynarken başka çocukları taklit etmez.		3			
34-Gözlerine parlak bir ışık tutulduğunda genellikle gözlerini kırpmaz.	1				
35-Başını vurarak, ellerini ısırarak kendine zarar verir.			3		
36-İhtiyaçlarının hemen yerine getirilmesini ister, bekleyemez.					2
37-İsmi söylenen beş nesneden daha fazlasını işaret ederek gösteremez.				1	
38-Hiç arkadaşlık ilişkisi geliştiremez.		4			
39-Birçok sese kulaklarını kapatır.	4				
40-Sık sık nesneleri döndürür, çevirir ve çarpar.			4		
41-Tuvalet eğitimine ilişkin sorunları vardır.					1
42-İsteklerini ve ihtiyaçlarını belirtmek için ya hiç konuşmaz ya da bir günde kendiliğinden kullandığı sözcük sayısı beşi geçmez.				2	
43-Çoğunlukla korkar ya da çok kaygılanır.		3			
44-Gün ışığı karşısında gözlerini kısar, kaşlarını çatır ya da gözlerini kapatır.	3				
45-Yardımsız kendisi giyinemez.					1
46-Sesleri ya da sözcükleri sürekli tekrar eder.				3	
47-Bakışları insanları "delip geçer".		4			
48-Başkalarının cümlelerini ya da ve sorularını tekrarlar.				4	
49-Çoğunlukla çevresindekilerin ve tehlikeli durumların farkında değildir.					2
50-Cansız şeylerle oynamayı ve zaman geçirmeyi tercih eder.					4
51-Çevresindeki nesnelere dokunur, koklar ve/veya tadar.			3		
52-Yeni bir kişiyle karşılaştığında sıklıkla hiç bir görsel tepki vermez.	3				
53-Nesneleri sıralama gibi karmaşık ritüeller içine girer.			4		
54-Çok zarar vericidir, oyuncaklarını ve ev eşyalarını kısa zamanda kırar.			2		
55-Gelişimsel gecikme belirtileri 30. ayda ya da daha önce ortaya çıkmıştır.					1
56-Gün içinde kendiliğinden, iletişimi başlatmak için kullandığı ifadelerin sayısı otuzu geçmez.				3	
57-Uzun süreler boşluğa bakar.	4				
TOPLAM:					

GENEL TOPLAM:

EK 11. Otizm Spektrum Anketi (OSA)**Otizm Spektrum Anketi (OSA)**

	Kesinlikle Katılıyorum	Kısmen Katılıyorum	Kısmen Katılmıyorum	Kesinlikle Katılmıyorum
1. Bir işi yalnız başına yapmaktansa başkalarıyla beraber yapmayı tercih ederim.				
2. Bir işi sürekli aynı şekilde yapmayı tercih ederim.				
3. Bir şeyi hayal etmeye çalışırsam, onu zihnimde canlandırmak kolay olur.				
4. Kendimi sıklıkla bir şeye öyle güçlü kaptırırm ki gözüm başka şeyleri görmez olur.				
5. Sıklıkla başkalarının fark etmediği hafif sesleri fark ederim.				
6. Araba plakası ya da ona benzer tabelaları genellikle fark ederim.				
7. Ben söylediğim şeylerin nezaket kurallarına uygun olduğunu düşünsem de başkaları uygun olmadığını söylüyorlar.				
8. Bir hikaye okurken, hikayedeki karakterlerin neye benzediklerini kolaylıkla hayal edebilirim.				
9. Olayların tarihlerinden büyülenirim.				
10. Bir grubun içindeyken, farklı birçok insanın konuşmalarını kolaylıkla takip edebilirim.				
11. Sosyal ortamlarda rahat ederim.				
12. Başkalarının fark etmedikleri ayrıntıları fark etme eğilimim vardır.				
13. Partiye gitmek yerine kütüphaneye gitmeyi tercih ederim.				
14. Hikâyeler uydurmak bana kolay gelir.				
15. Eşyalardan çok insanlar daha çok tercih ilgimi çeker.				
16. Sürdüremediğimde üzüldüğüm çok güçlü ilgilere eğilimlidir.				
17. Sosyal ortamlarda çene çalmaktan keyif alırım.				

	Kesinlikle Katılıyorum	Kısmen Katılıyorum	Kısmen Katılmıyorum	Kesinlikle Katılıyorum
18. Ben konuşurken, diğerlerinin araya (söze) girmesi her zaman kolay olmaz.				
19. Sayılar beni büyüler.				
20. Bir hikaye okurken, hikayedeki karakterlerin niyetlerini anlamakta zorlanırım.				
21. Kurgu romanı okumaktan özellikle zevk almam				
22. Yeni arkadaşlar edinmekte zorlanırım.				
23. Nesnelerdeki desenleri her zaman fark ederim.				
24. Müzeye gitmek yerine tiyatroya gitmeyi tercih ederim.				
25. Günlük düzenimin bozulması beni üzmez.				
26. Bir konuşmayı nasıl sürdüreceğimi bilmediğimi sıklıkla fark ederim.				
27. Biri benimle konuşurken kolayca “satır aralarını” okurum.				
28. Genellikle küçük ayrıntılardan çok resmin tümüne odaklanırım.				
29. Telefon numaralarını hatırlama konusunda çok iyi değilimdir.				
30. Genellikle bir durumdaki ya da bir kişinin görünüşündeki küçük değişiklikleri fark etmem.				
31. Birinin beni dinlerken sıkılıp sıkılmadığını nasıl söyleyeceğimi bilirim.				
32. Birden çok işi aynı anda yapmayı kolayca başarırım.				
33. Telefonda konuşurken konuşma sırasının bana geldiğinden emin olamıyorum.				
34. Rastgele (spontan) olarak bir şeyler yapmaktan keyif alırım				
35. Bir şakadaki espriyi anlayan son kişi genellikle ben olurum.				

	Kesinlikle Katılıyorum	Kısmen Katılıyorum	Kısmen Katılmıyorum	Kesinlikle Katılıyorum
36. Yalnızca yüzüne bakarak bir kişinin ne düşündüğünü ya da hissettiğini çözmek benim için kolaydır.				
37. Bir şey araya girse de yapmakta olduğum işe hızla geri dönebilirim.				
38. Sosyal ortamlarda çene çalmak konusunda iyiyimdir.				
39. İnsanlar sıklıkla aynı şeyi tekrar tekrar konuştuğumu söyler.				
40. Gençken diğer çocuklarla birlikte taklit oyunları oynamaktan zevk alırdım.				
41. Araba, kuş, tren, bitki vs. türler gibi nesnelerle ilgili bilgi toplamaktan hoşlanırım.				
42. Başka birinin yerinde olmanın nasıl bir şey olabileceğini hayal etmekte zorlanırım.				
43. Katıldığım her etkinliği dikkatlice planlamayı severim.				
44. Sosyal etkinliklerden (misafirlik, parti vs.) keyif alırım.				
45. İnsanların niyetlerini anlamakta zorlanırım.				
46. Yeni durumlar beni kaygılandırır.				
47. Yeni insanlarla tanışmaktan keyif alırım.				
48. İyi bir diplomatımdır (ikili ilişkilerde mesafe kurmakta iyiyimdir).				
49. İnsanların doğum tarihlerini hatırlamak konusunda çok iyi değilimdir.				
50. Çocuklarla taklit oyunları oynamakta zorlanmam.				

EK 12. Etik kurul onay belgesi

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sendromik Olmayan Otizm Spektrum Bozukluğu Tanılı İkisi de Etkilenmiş İkiz Çocuk ve Ergenlerin ve Anne Babalarının Genomlarının Tüm Genom Dizileme Yöntemi ile Analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	310-SBKA EK

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Dekanlık Binası Kat:2 İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
	TELEFON	0 232 4122254 - 0 232 4122258
	FAKS	0232 4122243
	E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Süha MİRAL				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı A.D				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1		☐		
		FAZ 2		☐		
		FAZ 3		☐		
		FAZ 4		☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması			☐			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları			☐			
İlaç dışı klinik araştırma			☒			
	Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐		

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐				
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
	DİĞER:	☐				

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşegül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sendromik Olmayan Otizm Spektrum Bozukluğu Tanılı İkisi de Etkilenmiş İkiz Çocuk ve Ergenlerin ve Anne Babalarının Genomlarının Tüm Genom Dizileme Yöntemi ile Analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	310-SBKA EK

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/06-01	Tarih:24.03.2016
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Ayşegül Yıldız

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevaltif Onkoloji A.D.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Hale ÖREN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Hematoloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç.Dr.Uğur Önsel TÜRK	Kardiyoloji	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç.Dr.Yasemin BASKIN	Temel Onkoloji	DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Yard.Doç.Dr.Yasemin ERAÇ	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Av.Semra MARMARA	Hukuk	DEU Rektörlüğü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Av.Nazan PEDÜKCOŞKUN	Hukuk	Alsancak Nevvar Salih İşgören Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Hayat ALBAYRAK	Emekli	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşegül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.