T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POGZ GEN VARYANTLARININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖKBERK YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Jülide TOZKIR

EDİRNE-2019

Gökberk YILDIRIM'ın hazırladığı "POGZ GEN VARYANTLARININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında bir Yüksek lisans olarak kabul edilmiştir.

İmza

Doç. Dr. Çiğdem Kekik Çınar .....

Doç. Dr. Hakan Gürkan .....

Doç. Dr. Jülide Tozkır .....

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Jülide Tozkır
Tez Danışmanı .....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr. Murat Yurtcan
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

27/06/2019

Gökberk Yıldırım

İmza

Yüksek Lisans Tezi

POGZ GEN VARYANTLARININ OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ÖZET

Otizm spektrum bozukluğu günümüzde görülme sıklığı gittikçe artan yaygın bir hastalıktır. Otizm çocukluk çağında ortaya çıkan ve varlığı doğum öncesi tespit edilemeyen bir hastalıktır. Güncel genetik çalışmalar otizmin etiyolojisinin anlaşılmasına yöneliktir. Otizm ile ilgili yapılan çalışmalarda birçok genin otizmin oluşmasında neden olabileceğini düşünmektedir. Bu tez çalışması planlanırken ilişkili olduğu düşünülen ve özel olarak çalışılmamış bir gen olan POGZ geni hedef olarak belirlendi. POGZ geni çok sayıda genin incelendiği çalışmalarda otizm ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte tek başına ele alınarak çalışılmamıştır. POGZ geninde kodlanan proteinin kromatine bağlandığı ve nörogelişimsel genlerin çalışmasında düzenleyici etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

POGZ geninin 19 eksonu vardır. Bu eksonlar PCR ile çoğaltıldı ve yeni nesi dizi analizi yöntemi ile dizilendi. Çalışma grubu 2-18 yaş arası otizm tanısı almış bireylerden ve benzer yaşlarda sağlıklı bireylerden oluşturuldu.

POGZ genine ait varyasyonlar belirlendi. Elde edilen verilerin gruplar arasındaki dağılım farklılıkları χ^2 testi ile istatistiksel olarak incelendi. Gruplar POGZ genlerindeki varyasyonlar açısından karşılaştırıldığında Ekson 13'te rs3831142, Ekson 15'te rs112072925, Ekson 18'de rs2274535 ve Ekson 19'da rs142860188 no'lu varyasyonların bulunma sıklıkları istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi. Bu varyantların otizm etiyopatogenezi ile ilişkisi hakkındaki ileri tetkikler yapılacak çalışmalarda irdelenecektir.

Yıl: : 2019

Sayfa Sayısı : 50

Anahtar Kelimeler: Otizm, OSB, POGZ, NGS, Polimorfizm

Master's Thesis

THE INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN POGZ GENE VARIANTS AND AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotecnology and Genetic Department

ABSTRACT

Autism spectrum disorder is a common disease that the prevalence of disease increasingly day after day. Autism is a childhood disease without prenatal identification test. Current genetic studies are aimed at understanding the etiology of autism. The results of genetic studies reveal that there are large number of gene with associated to the disease.

In designing the study, we aimed to study a gene that is thought to be related to the disease but has not been studied before. Therefore POGZ gene selected. Although the POGZ gene has been associated with autism in many GWAS studies, it has not been studied specifically.

POGZ encodes a heterochromatin protein 1 a-binding protein containing a cluster of multiple C2H2-type zinc fingers. POGZ is expressed in the human fetal and adult brain and involved in mitosis. It is hypothesized to function as atranscriptional regulator in molecular networks crucial for neuronal function.

POGZ gene have 19 exons and the exons of the gene was sequenced with next generation sequencing method. The variations are determined in the study groups. The study groups were consist of 51 children with autism spectrum disorder and 50 healthy controls The comparison between study groups data were analyzed statistically with chi square test. The p value of less than 0.05 was considered significant.

rs3831142 in the Exon 13, rs112072925 in the Exon 15, rs2274535 in the Exon 18 and rs142860188 in the Exon 19 were determined as significant for ASD. The reletionships between these variants and the ASD will be investigated in the future studies.

Year : 2019

Number of Pages : 50

Keywords : ASD, Autism, POGZ, NGS, Polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, destek ve yardımlarını eksik etmeyen Tez Danışmanım sevgili Doç. Dr. Jülide TOZKIR hocama, ve Anabilim Dalımızda ders aldığım değerli hocalarıma, çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinin temin edilmesini sağlayan Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Işık GÖRKER'e, deneysel aşamaların gerçekleştirilmesinde her türlü desteği sağlayan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr Hakan GÜRKAN ve başta Dr. Öğr. Üyesi Selma DEMİR olmak üzere diğer öğretim üyeleri, öğretim elemanları ve ekip arkadaşlarıma, tezin maddi olarak desteğini gerçekleştiren TÜBAP'a (Proje No: 2016/251), yüksek lisans eğitimim boyunca desteği ile yanımda olan eşim Gonca YILDIRIM'a, bu günlere gelmemi sağlayan ve desteğini hiç bir zaman eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1: Giriş **1**

BÖLÜM 2: Genel Bilgiler **2**

2.1. Tanım **2**

2.2. Tarihçe **2**

2.3. Otizmin Nedenleri **3**

2.4. Görülme Sıklığı **5**

2.5. Özellikler **6**

2.6. Tedavi **7**

2.7. Genetik Polimorfizmler **8**

2.7.1. Genetik Polimorfizm Tipleri **8**

2.7.1.1. Ardışık tekrar dizi (Tandem repeat polimorphism) **9**

2.7.1.2. Kopya sayısı varyasyonları (Copy number variation) **9**

2.7.1.3. Tek nükleotid polimorfizm (Single nucleotide polymorphism - SNP) **10**

2.8. DNA Dizileme Yöntemleri **10**

3. Otizm ve Genetik Parametreler **12**

4. POGZ **13**

BÖLÜM 3 : MATERYAL VE METOD **16**

BÖLÜM 4 : Sonuçlar **21**

BÖLÜM 5 : Tartışma **24**

KAYNAKLAR **25**

KISALTMALAR DİZİNİ

ASD:	Autism Spectrum Disorder
OSB:	Otizm Spektrum Bozukluğu
YND:	Yeni Nesil Dizileme
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
CNV:	Copy Number Variation
PCR:	Polymerase Chain Reaction
DNA:	Deoksiribo Nükleik asit
RNA:	Ribo Nükleik asit
POGZ:	Pogo transposable element derived with ZNF domain
NIMH:	National Institute of Menthal Health
NAC:	National Autism Center
IGV:	Integrative Genomics Viewer
TBE:	Tris Barote Edta
ACMG:	American College of Medical Genetics

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan beyin görseli **4**
Şekil 2.2. Literatüre dayalı, çocuklarda yıllara göre değişen otizm görülme sıklığı **6**
Şekil 2.3. POGZ gen lokasyonu **14**
Şekil 2.4. POGZ protein yapısı **15**
Şekil 3.1. AB Applied Biosystems PCR cihazı **19**
Şekil 3.2. Jel elektroforez örneği **19**
Şekil 3.3. Varsome arama ekranı **20**
Şekil 3.4. Varsome örnek ekranı **21**
Şekil 3.5. IGV ekranı POGZ geni. **21**
Şekil 5.1. NSBI(ClinVar) tarama sonucu. rs14286018 **27**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Eksonlar, primerler ve uygun yapışma sıcaklıkları **18**

Çizelge 2. Eksonlarda bulunan varyantlar ve istatistiksel verileri **24**

Çizelge 3. Genotip frekans karşılaştırması **28**

Çizelge 4: Çalışma grupları cinsiyet dağılımları **29**

BÖLÜM 1

GİRİŞ

National Institute of Menthal Health (NIMH, 2018) otizmin tanımını "Otizm spektrum bozukluğu sosyal etkileşimde bozulma, iletişimde anormallik, ilgi ve etkinlikte yetersizlik, sınırlı ve tekrar edici davranışlarla karakterize olmuş nöro-gelişimsel bir hastalıktır. Otizm bu belirtilerin dışında beraberinde birçok hastalık ile beraber varlık göstermektedir" şeklinde ifade etmiştir.

Otizm, yaygın ve güncel bir sorun olduğu için tüm dünyada araştırma açısından önemli bir yer tutar. Oluşum nedeni henüz tam aydınlatılamadığından tıbbın birçok alanında otizm çalışmaları yapılmaktadır. Günümüze kadar gelen çalışmalarda otizmin temelinde çevresel faktörler dışında genetik nedenlerin de etkili olduğu fark edilmiş ve son yıllarda genetik çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Özellikle Deoksiribo Nükleik asit (DNA) dizileme yöntemlerinin gelişmesi ve maliyetinin düşmesi, bu yöntemin yaygın biçimde kullanılmasının önünü açmıştır. Dizileme tekniklerinden elde edilen veriler ışığında bir çok hastalıkta olduğu gibi, otizmde de değerli bilgilere ulaşılmıştır. Belirli genler ve bu genlerde olabilecek varyantlar, otizm ve benzeri hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu gelişmelerin ardından belirli genler özel olarak incelenmeye başlanmıştır. Bu çalışmamızda otizmin genetik temelini aydınlatmak için önceki çalışmalarda otizm ile ilişkilendirilen POGZ geni incelendi. POGZ geninde önceden bulunan varyantlar ve bizim tespit ettiğimiz varyantlar ilişkilendirildi. Sağlıklı kontrol grupları ile istatistiksel açıdan karşılaştırıldı. Önceden bildirilen ve bizim anlamlandırdığımız varyantlar yorumlandı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Otizm, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda adı sık duyulan yaşam boyu süren, genetik temelleri ve anormal beyin gelişi olan nörogelişimsel bozukluk ve özel eğitim kategorisidir.

Ülkemizde Özel Eğitim Hizmetleri Yönetmeliği (2006)'nde (M.E.B., 2006) otistik birey; sosyal etkileşim, sözel ve sözel olmayan iletişim, ilgi ve etkinliklerdeki sınırlılığı erken çocukluk döneminde ortaya çıkan ve bu özellikleri nedeniyle özel eğitim ile destek eğitim hizmetine ihtiyacı olan birey olarak tanımlanmaktadır.

2.2. Tarihçe

Otizm terimi tarihte İsviçreli psikiyatr Eugen Bleuler tarafından, 1910'larda dış dünyadan bütün olarak soyutlanmış kişi için kullanılmıştır. Otizm (*autism*) kelimesi, öz ve kendi anlamlarına gelen Yunanca 'AUTOS' ve bir sürecin veya görüşün genelini işaret eden Latince 'İSMUS' kelimelerinden türemiştir (docplayer.biz.tr/757227, 2015).

Otizm ile ilişkili ilk bilimsel makale çocuk psikiyatrı Leo Kanner tarafından 1943 yılında yayınlanmıştır. Kanner, hastası olan 11 çocuğun 'aşırı otistik yalnızlık' gösterdiklerinden ancak hiç birinin fiziksel olarak sağlıklı yaşıtlarından farklı olmadığından bahsetmiştir. Sadece davranışlarının farklı olduğundan bahsetmiştir.

Kanner çocukların aileleri ile ilişkilerini incelediğinde annelerin ilgisiz, soğuk ve entelektüel olduğunu düşünerek otizmin annelerden kaynaklandığını düşünmüş, böyle anneleri 'Buzdolabı Anne' olarak tanımlamıştır. Viyanalı psikanalist Bruno Bettelheim otistik davranışların 'Patolojik Annelerden' kaynaklandığını ileri sürmüştür (Kırcaali ve İftar, 2014). Ancak 1990'lı yıllardan sonra teknolojinin de gelişmesi ile otizmin kaynağı olabilecek birçok etmen bulunmuştur.

2.3. Otizmin Nedenleri

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik ve genetik çalışmalarda otizmin kalıtımsallık oranı yaklaşık olarak %50 bulunmuştur (Gaugler, 2014; Sandin, 2014). Otizmin çok sayıda birbiri ile etkileşen gen nedeni ile varlık gösterdiği, genetik temeli olan karmaşık bir hastalık olduğu bilinmektedir (Yosunkaya, 2013).

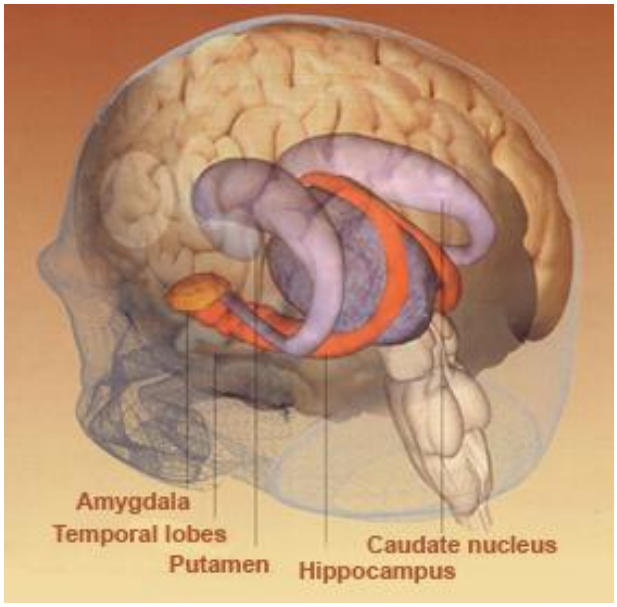
Otistik çocukların anne ve babalarının davranışsal sorunlar gösterdiği ileri sürülmüştür. Bu anne ve babaların yaygın olarak kültür ve sosyoekonomik düzeyleri yüksek, duygusal bağ oluşumu konusunda sorunlar yaşayan donuk karaktere sahip özellikte, şizoidi kişilik sahibi oldukları gözlemlenmiştir (Özbaran, 2009). De novo mutasyonlar, epigenetik ve çevresel faktörler içeren Otizm Spektrum Bozukluğu'nun (OSB) tahmini kalıtım derecesi, karmaşık bir risk mimarisine yol açar (Xiu-juan, 2018). Bazı durumlarda otizm ile daha sık karşılaşılmaktadır. Otizm kardeşlerden birinde görünüyorsa diğerinde de olma olasılığı %2-7 arasındadır. Ayrıca tek yumurta ikizlerinin her ikisinde otizm rastlanma oranı çift yumurta ikizlerinden daha fazladır. Tek yumurta ikizlerinden biri otistik ise diğerinin olma olasılığının %35-90 arasında olduğunu gösteren yayınlar vardır (NIMH, 2015). Bu istatistiksel veriler araştırıcıları otizme neden olan gen/genlerin araştırılmasına yöneltmiştir. Fakat otizm spektrum bozukluğu tanımının içinde genetik açıdan aydınlatılmış sendrom yalnız Rett sendromudur (Kırcaali ve İftar, 2014).

Beynin gelişim sürecinde nörolojik yolakların birbiri ile etkileşimi ve birbirlerine gönderdikleri uyarılar önemlidir. Otizm birçok nöronal sistemin etkilendiği bir hastalıktır. Otizmin beynin tümünü etkileyen nörogelişimsel sebeplerden kaynaklandığı ve sonuçta beyin gelişimin bozulduğu bilinmektedir. Teratojenler ile

yapılan çalışmalar gebeliğin başlangıcından kısa bir süre sonra beyin gelişiminin etkilenmesinin otizmin oluşumunda rol alabileceğini göstermektedir.

Otistik bireylerin beyinleri incelendiğinde kafa çevresi, hacim ve ağırlık genelde daha büyüktür. Bu bireylerin beyinlerinin yaşamın ilk yılı içerisinde hızla büyüdüğü, bu durumun beynin fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir (Lord, Cook, Leventhal ve Amaral, 2000).

Otizimde beyin yapısı incelendiğinde amigdalanın ve amigidalanın fusiform girus, üst temporal sulkusunun diğer temporal alanlar ile bağlantısında sorun olduğu gözlemlenmiştir. OSB'li bireyler çevresindeki kişiler ile iletişim halindeyken, sağlıklı bireyler gibi yüzün göz ve sosyal ifadelerin anlaşılacağı diğer bölgelerinde değil, ağız gibi farklı bölgelerine bakarlar. Bu duruma, bahsedilen beyin yapısının farklılıklarının neden olduğu düşünülmektedir (Özbaran, 2009; Özer, Özdemir, 2015).



Şekil 2.1. İnsan beyin görseli

(http://www.brain-maps.com/amygdala.html)

Serotonin ve otizm ile ilgili yayınlar son yıllarda artış göstermektedir. Gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterlerinde, selektif serotonin geri alım inhibitörü içeren antidepresan kullanımının, otistik bireylerin doğması riskini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar otizm ile serotonin ilişkisini desteklemektedir (Boukhis, Saeehy, Mottron ve Berard, 2016).

Görüntüleme tekniklerinin gelişmesiyle otizmin incelenmesi kolaylamıştır. MR, PET, Spect gibi görüntüleme teknikleri kullanıldığında otizmli hastaların beyinlerinin sağlıklı bireylerden farklı olduğu görülmüştür.

Bu görüntüleme tekniklerine dayalı olarak yapılan incelemelerde beynin her iki yarım küresini birbirine bağlayan korpus kallosum bölgesinin normalden daha küçük, beyin korteksinin ve girintili yerlerinin normal bir beyin yapısından daha kalın olduğu tespit edilmiştir (Gottfried, Bambini-Junior, Francis, Riesgo ve Savino, 2015).

Yapılan birçok çalışmada ileri yaşlarda yaşanan gebeliğin otizm riskini arttırdığı görülmüştür. Otistik bireylerin %35'nin ailesinde şizofreni, depresyon, madde bağımlılığı ve alkol kullanımı gibi problemler olduğu görülmüştür. Ayrıca otizmin doğum sırasında ve doğuma bağlı faktörlerle de bağlantılı olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (Sandin, Schendel, Magnusson ve ark., 2016; Yosunkaya, 2013).

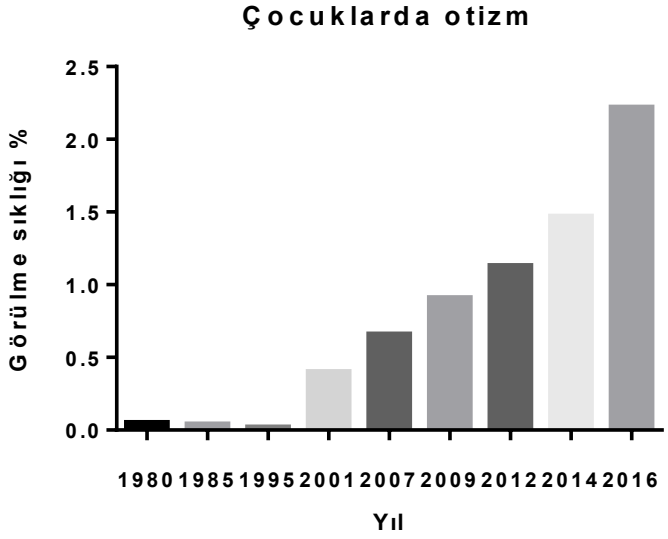
Çevresel faktörlere bakıldığında gebelikte kullanılan ilaçlar, diş dolguları, aşılar, hipertansiyon, çevre kirliliği, ağır metaller ile ilgili olduğu belirtilen çalışmalar vardır. Bahsedilen çevresel etmenlerin fetusun gen ekspresyonunda değişimler yaparak otizme neden olduğu ileri sürülmektedir (Sealey, Hughes, Sriskanda , 2016).

2.4. Görülme Sıklığı

Son yıllarda otizm görülme sıklığı artmaktadır. Artışın sebebi ailelerin ve toplumun bilinçlenmesi, otizm tarama ölçeklerinin kullanımının yaygınlaşması gibi nedenlerdir. Önceden görülme sıklığı 1000' de 1 oranında iken günümüzde yaklaşık 50' de 1 oranına çıkmıştır (NIMH, 2015). Amerika'da otizm görülme sıklığı Şekil 2.2. deki grafikte de görüldüğü gibi 1980'li yıllarda her 10 000 kişide 5, 1985'de 2500'de bir, 1995'de 500'de 1, 2001'de 250'de 1, 2007'de 150'de 1, 2009'da 110'da 1, 2012'de

88’de 1, 2014’de 68’de 1 iken, 2016 yılı başlarındaki makalelerde ve Hastalıkların Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC)’nin raporuna göre 45 çocukta 1 düzeyine ulaşmıştır (Sealey, 2016; Monteiro, 2015).

Türkiye'de buna benzer görülme sıklığı açısından yapılmış bir çalışma yoktur. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda tahmini 550.000 otistik birey, 140.000 ise çocuk olduğu bilinmektedir (otsimo, 2018).



Şekil 2.2. Literatüre dayalı, çocuklarda yıllara göre değişen otizm görülme sıklığı

OSB, erkek bireylerde kızlardan 5 kat fazla görülmektedir (Gottfried, 2015). Otizm her 42 erkek çocuktan birini etkilerken bu oran kız çocuklarında 189’da 1’dir (Centers for Disease Control and Prevention CDC, erişim tarihi 10 Şubat 2019). Görülme sıklığı erkeklerde kızlara oranla daha fazla olmasına rağmen kızların yaşadığı dil ve bilişsel problemler erkeklere göre daha fazladır (Rubenstein, Wiggins ve Lee, 2015).

2.5. Özellikler

Otizm tek bir belirteçten ziyade hastalığın doğası gereği yanında oluşan birçok hastalıkla beraber ifade edilmektedir. Sözel ve sözel olmayan iletişimde, sosyallikte sınırlılık ana belirteç iken bir veya birden fazla hastalığın bu duruma eşlik etmesi diğer

belirteçtir. OSB'li bireylerin yarısı yaşam boyu konuşamamaktadır. Bu sebepten farklı iletişim yolları tercih etmektedirler. OSB'li olan bireyler eğer konuşabiliyorsa başkalarının söylediği kelime veya cümlelerin tekrarı (ekololi) şeklinde gerçekleşir (Sterponi ve Shankey, 2013 s.138; Chalmers, Day, Fleming ve Monsen, 2013).

Otistik bireylerde görülen diğer eksiklikler göz kontağından kaçınma ya da kısa süreli göz kontağı kurma, konuşurken jest ve mimiklerin kullanımında kısıtlılık, konuşurken sıra dışı ses ve vurgular yapmak gibi özellikler gösterirler (NAC, 2009; erişim tarihi 10 Mayıs 2019, Aslan ve Şahin, 2015).

Otistik bireyler genelde yalnızlığı tercih ederler. Seslenildiğinde duymuyormuş gibi davranıp iletişimden kaçmak isteyebilirler. Sevinçli, kızan, ağlayan kişilere karşı tepkisiz kalabilirler. Arkadaşlık kurma ve yaşıtları ile etkileşimde zorluk çekebilirler (NAC, 2009 erişim tarihi 10 Mayıs 2019).

Otistik bireyler çok yavaş yürüme, ellerini uçuyormuş gibi çırpmak durduğu yerde sallanmak ekseni etrafında dönmek gibi tekrar edici davranışlar ve beden hareketleri gösterebilirler (Ardıç, 2013).

Otizmli bireylerde fiziksel yeterlilik ve istek olmasına rağmen öğrenilmiş hareketi gerçekleştirememe gibi fonksiyon bozukluklarına rastlanmıştır (Lane, Harpter ve Heathcock, 2012; Casartelli, Molteni, Ronconi, 2016).

2.6. Tedavi

OSB tedavisi hala mümkün olmamakla birlikte hastalığın yanında var olan diğer hastalıkların semptomlarını azaltmak ve bireyin yaşam kalitesini artırmak için özel eğitim çalışmaları yapılmaktadır. Ancak olumlu birçok sonuca rağmen bilimsel olarak kabul edilen kesin bir tedavisi yoktur. Otizm tanısı olabildiği kadar erken yaşlarda konulmalı ve bireyin özel eğitim programı bir an önce belirlenmelidir (NIMH, 2015).

OSB olan bireylere tıbbi yaklaşım bir ekip aracılığıyla yapılmalı ve ekipte klinisyen psikolog/pedagog, fizyoterapist ve tıbbi genetik uzmanı bulunmalıdır. OSB'nin sonraki kuşaklarda ortaya çıkma riski gibi konular için veriler toplanmalı ve hasta yakınlarına genetik danışmanlık verilmelidir (Yosunkaya, 2013)

Otizmli bireyler üzerinde daha fazla araştırma yapılması, eğitim ve tedavi olanaklarının artmasına neden olmuştur. Günümüzde otizmli bire111111yler özel eğitim merkezleri, özel eğitim ve rehabilitasyon merkezlerinde eğitimlerine devam etmektedir.

Tedavi ve eğitimde kullanılan yöntemler gün geçtikçe daha etkili ve başarılı olmaktadır. OSB ömür boyu süren ve etkileri kesin olarak ortadan kaldırılamayan bir hastalıktır (Ardıç, 2013).

Otizm eğitim ve tedavisinde temel amaç bireylerin yaşam kalitelerinin ve hayatlarını idame ettirebilme becerilerini arttırmak ve hastalığın belirtilerini minimuma indirmektedir. Ayrıca

- ilaç
- özel eğitim
- müzik terapisi
- beslenme ve diyetin düzenlenmesi
- hidroterapi
- hayvanlarla terapi (hippoterapi ve yunus terapisi)
- hiperbarik oksijen tedavisi
- uzay terapi
- otistik bireyin yaşam kalitesini artırmakta kullanılan tedavi ve yöntemlerdir.

2.7. Genetik Polimorfizmler

Polimorfizmler genel olarak fiziksel, biyokimyasal ve kromozomal polimorfizmler olarak adlandırılırlar. Fiziksel polimorfizmler canlının dış görünüşünde etkili olan polimorfizmlerdir. Biyokimyasal polimorfizmler ise enzim, protein, antijen gibi moleküller üzerinde etkisi olan polimorfizmlerdir. Kromozomal polimorfizmler ise kromozomun morfolojik yapısındaki değişikliklere neden olan polimorfizmlerdir. Genel anlamda polimorfizm kelimesi ise DNA düzeyinde olan polimorfizmleri ifade etmek için kullanılan terimdir.

Bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak alternatif fenotipin görülmesi genetik polimorfizm olarak adlandırılır. Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşur,

Yunanaca'da çok şekillilik anlamına gelir. Polimorfizmler canlının bulunduğu ortama adaptasyonu için önemlidir.

Bu farklılıklar tek nükleotid polimorfizmlerini (Single Nucleotide Polymorphism SNP), dizi tekrarlarını, eklemeleri, silmeleri ve rekombinasyonları içerirler. Genetik polimorfizimler virüs, radyasyon gibi etkenler yüzünden oluşabildiği gibi rastgele olarak da oluşabilirler. Bireyler arasında DNA dizisindeki bir farkın hastalık ile ilişkisi gösterilmişse buna genetik mutasyon denir. Genellikle dış etkenler nedeniyle olan DNA değişiklikleri polimorfizm yerine mutasyon olarak adlandırılır (Somaia, Mona, 2012).

Polimorfizmler mutasyonlar ile ortaya çıkarlar. Mutasyon bir nükleotidin değişimi, silinmesi, eklenmesi ya da yeniden düzenlenmesi şeklinde olabilir. Oluşan bu değişim diğer DNA sekansları gibi genetik bir miras olarak ebeveynden çocuklara aktarılabilinir.

Polimorfizmler DNA'da protein kodlamayan genler dışında da bulunurlar. Protein kodlamayan DNA bölgeleri çok daha fazla polimorfizme sahip olma eğilimindedirler. Bunun nedeni protein kodlayan bölgelerdeki değişimin onu taşıyan kişi üzerinde zararlı etki göstermesidir.

Sinonim polimorfizm olarak adlandırılan polimorfizmler üretilen proteinde aminoasit değişikliğine neden olmadığından nötr oldukları söylenilebilir. Bu nedenle bu değişimlere sessiz mutasyon da denir. Non-sinonim polimorfizmler ise kodonda bir değişikliğe neden olarak proteini değiştiren etkiye sahiptir. Kodlama dizilerindeki SNP'lerin yarısı non-sinonim kodon değişiklikleri ile sonuçlanır.

2.7.1 Genetik Polimorfizm Tipleri

2.7.1.1. Ardışık Tekrarlı Dizi (Tandem Repeat Polymorphism)

Ardışık tekrarlı diziler, bir diğer deyişle Tandem Tekrarları (Tandem repeat polymorphism) insan dahil bir çok canlı türünde yaygındır. Nesiller boyu büyük oranda korunurlar. Bu da onların önemli bir işlevi olduğunu gösterir (Kashi, King, 2006; Fondon, Hammock, Hannan ve King, 2008 ; Usdin , 2008)

Ardışık tekrarlı dizilere ayrıca basit dizi tekrarları, mikrosatellitler veya minisatellitler de denir. Bu tekrarlayan diziler eksonlara, intronlara veya genler arası bölgelere eklenebilir. Gen ekspresyonunun modülasyonunda, RNA'ların, proteinlerin yapısı ve fonksiyonuna etki eder (Somaia, Mona, 2012).

İnsan genomunda ardışık tekrarlı dizi üzerine yapılan çalışmaların çoğu baskın veya resesif bozukluklara neden olan mikrosatellitler ve *repeat-expansion* mutasyonları gibi genetik belirteçler üzerinde yoğunlaşmıştır (Sutherland, 1998; Nithianantharajah . Hannan , 2007; Usdin , 2008).

2.7.1.2. Kopya Sayısı Varyasyonu

Genetik ilişkilendirme çalışmaları genellikle aynı türdeki bireyler arasında spesifik genomik bölgelerde tek nükleotidlerde varyasyon olan SNP'leri değerlendirir. Son çalışmalar, insan genomundaki başka bir yaygın polimorfizm tipinin kopya sayısı varyasyonları (Copy Number Variations - CNVs) olduğunu göstermektedir (Conrad, 2010).

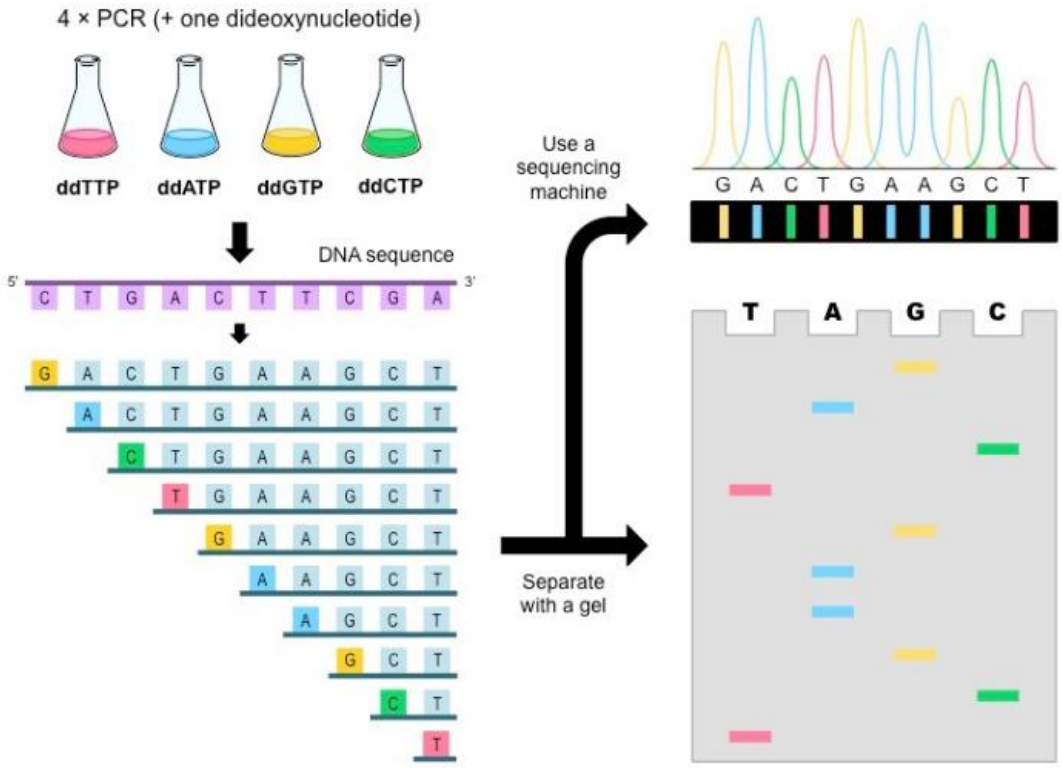
CNVs bir DNA segmentinin farklı bireylerin genomlarında çeşitli sayılarda bulunmasıdır. Boyutları bir kaç yüz nükleotit ile birkaç megabaz arasında değişebilir. SNP'ler ile karşılaştırıldığında CNVs genomun daha önemli bir kısmını etkiler ve ortaya çıkma sıklığı daha fazladır. Bu nedenle CNVs insan evrimi, genetik çeşitlilik ve fenotipik özelliklere önemli ölçüde katkıda bulunur (Stankiewicz, Lupski, 2010).

2.7.1.3. Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

Popülasyondaki DNA moleküllerinin belirli bir bölgesinde nükleotid çiftinin farklı olması durumudur. Örneğin aynı popülasyondaki bazı DNA molekülleri belirli bir nükleotit poziyonunda T-A çiftine sahipken aynı popülasyonun diğer bireylerinin DNA moleküllerinde aynı pozisyonda C-G baz çiftine sahip olabilirler. Bu fark bir SNP olarak tanımlanmaktadır.

2.8. DNA Dizileme Yöntemleri

DNA dizileme, bir DNA zincirinde bulunan bazların (adenin, guanin, sitozin, timin) sırasını belirlemek için kullanılan yöntemdir. Sanger ve arkadaşları zinciri sonlandırma ve parçalama yaklaşımına dayalı DNA dizileme yöntemini 1970'lerde geliştirmeye başlamışlardır. Spesifik floresan boyalar ile işaretlenmiş ve dizi sonlandırıcı ddNTP (Dideoxynucleotides triphosphates) bazlarının kapiler elektrofez cihazından geçerek tespit edilmesine dayanır. Modifiye azot bazlarının eklenmesi ile her biri farklı uzunlukta çok sayıda DNA fragmenti elde edilir. Fragmentlerin uzunluk farklarına göre DNA dizisi anlamlandırılır. Modifiye azot bazlarının eklenmesi ile DNA sentezinin kesilmesine dayanan Sanger dizileme tekniği otomatik kapiller elektroforez ile birleştiğinde güvenilirlik ve hız açısından oldukça etkilidir.



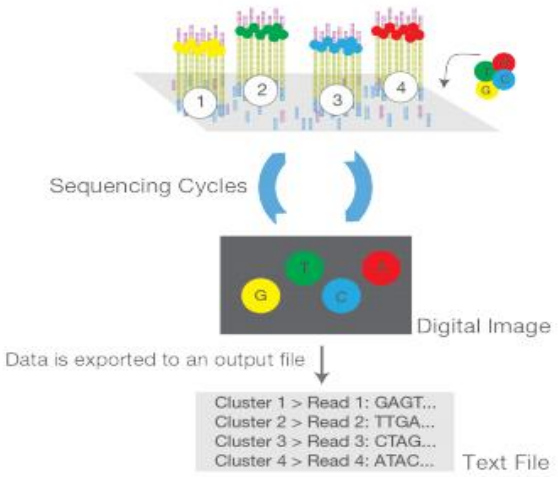
Şekil 2.3 Sanger sekanslama DNA fragmentlerinin uzunluk farkları.

(https://www.onlinebiologynotes.com/sangers-method-gene-sequencing/)

Birinci nesil dizileme olarak adlandırılan bu metot basit ve okumalardaki doğruluğu nedeniyle uzun yıllar birincil yöntem olarak kullanılmıştır. *Human Genom Project* gibi büyük projelerde kullanılsa da en önemli kısıtlama faktörü yüksek maliyetidir. Bu durum Yeni Nesil Dizileme'nin (YND) geliştirilmesine neden olmuştur (Varış, 2018).

YND, genomik araştırmalarda devrim yaratan DNA dizileme teknolojisini anlatan bir terimdir. YND temelde iki bölümde gerçekleşir. Birinci bölüm çalışılacak genetik metaryelin cihaza yüklemek için hazırlık aşamasıdır. Kütüphane olarak adlandırılır. İkinci bölüm ise cihaza yüklenen DNA'nın cihaz tarafından dizilenmesi aşamasıdır. Çalışmamızda *İllumina* firmasının *Miseq* modeli YND cihazı ile çalışıldı. *İllumina* platformu YND cihazları dizileme aşamasında DNA parçalarına reaksiyonu durdurucu etkide florosan boyalı nükleotidlerin bağlanarak okunması ve bu nükleotidlerin ortamdan uzaklaştırılarak bir sonraki nükleotidin okunmasına olanak vermesini içeren "Sequencing by reversible termination" dizileme mantığı ile çalışır.

Illumina dizileme platformunda uçları adaptör ve indeks dizileri ile uzatılmış DNA parçaları diğer deyişle *kütüphane,* cihaz içinde '*flow-cell'* denilen dizileme işleminin gerçekleştiği yüzey-cihaz parçası üzerinde "*bridge PCR*" yöntemi ile klonal olarak çoğalır.



Şekil 2.4. *İllumina* platformu *PCR* yöntemi.

(https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)

Klonal olarak çoğalan DNA parçalarına; 3'OH grubu bloke edilmiş ve floresan boya ile etiketlenmiş nükleotidler (dNTP), DNA polimeraz enziminin aktivasyonuyla her bağlandığında ışıma yapar ve cihaz kamera ile bu floresan boyaların verdiği ışık rengine göre DNA baz sırasını belirler.



Şekil 2.5. Floresan boyama ile baz sırasının belirlenmesi.
(https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)

YND kullanılarak tüm bir insan genomu tek bir gün içinde sıralanabilir. Buna karşılık öncesinde kullanılan Sanger Sekanslama tekniği aynı durum için on yıldan fazla bir süreye ihtiyaç duymaktadır (Yohe, Thyagarajan. 2017). YND, 2000'li yıllarda geliştirilmeye başlanmış ve farklı markaların farklı teknolojik yaklaşımları kullanan cihazları ile günümüze kadar gelişerek gelmiştir. Örneğin *Illumina HiSeqX* sistemi tek çalışmada 1.8 terabazlık diziyi okuyarak, veri üretebilecek kapasitedir. YND teknolojisi Sanger dizileme ile karşılaştırıldığında, gelişimi boyunca yaklaşık 100.000 kat daha fazla veri üretebilecek kapasiteye ulaşmıştır (Varış, 2018).

YND yöntemleri olan "*whole genome sequencing* (WGS)" ve "*whole exome sequencing* (WES)" yaklaşımları ile genom dizilemesi yapılmaktadır. WES Mendelyan hastalıklar ile ilişkili varyantların tanımlanmasında en uygun yöntemdir. WGS ise genomun kodlanmayan ve düzenleyici bölgeleri içeren varyantların ve SNP'lerin tanımlanmasında kullanılan yöntemdir.

WGS için İnsan Genom Projesinde 2001 yılında genom başına harcanan 95.300.000 dolar maliyet, günümüzde bin dolar seviyelerine düşmüştür. Maliyetin düşürülmesindeki en önemli etken birincil teknik olan Sanger yerine YND tekniğinin kullanılması ve yaygınlaşmasıdır.

Bir insan genomundaki varyasyonlar; küçük baz değişiklikleri, DNA'nın eklenmesi ve çıkarılması, eksonların silinmesi, inversiyon ve translokasyon gibi yeni

düzenlemeleri içerir. Geleneksel Sanger dizilimi, bazların artması azalması ve silinmesinin tespiti ile sınırlıdır (Varış 2018).

Submikroskopik kromozomal kopya sayısı değişikliklerini saptamak için karşılaştırmalı genomik hibridizasyon teknikleri ve geri kalan mutasyon tiplerinin belirlenmesi için floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanılır. Tüm genomik mutasyonların tek bir teknik ile bulunması YND ile gerçekleşmektedir.

DNA dizi analizinde YND'ye rağmen kapiller dizileme yöntemi altın standart olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem araştırılan gen veya lokusun bilinmesine bağlıdır. YND ise seçici olmayan ve tamamen yeni mutasyonları, hastalığa neden olan genleri keşfetmek için tüm genomu veya eksonları sorgulamak için kullanılır.

YND insan genetiği dışında; tarımsal biyoteknoloji, metagenomik, atasal DNA, transkriptom gibi alanlarda da kullanılan bir tekniktir. Mikrobiyoloji alanında patojenlerin tanımlanması, ilaç duyarlılıkları hakkında bilgi toplanması ve patojenlerin birbirileri ile olan ilişkilerinin anlaşılması açısından önemlidir. Enfeksiyon kaynaklarının bulunması için kullanılır. YND kullanılarak maya, bakteri, mantar, bitki, virüs gibi organizmaların genomlarının hızlı ve doğru şekilde dizilenmesi mümkündür.

YND'nin günümüz için dezavantajı elde edilen bilginin bilgisayar ortamında kapladığı depolama alanı ve elde edilen verinin uzman personel tarafından analiz edilebilmesidir (Varış 2018).

3. Otizm ve Genetik Faktörler

Otizm birden fazla genin dahil olduğu düşünülen genetik temeli aydınlatılamamış bir bozukluktur. Hastalığın oluşumunda gen mutasyonları ve kopya sayılarındaki değişimler önemli olduğu ileri sürülmektedir.

Otizm spektrum bozukluğu ile ilişkili olduğu bildirilen birçok gen vardır. HD8, ARID1B, SYNGAP1, DYRK1A, SCN2A, ANK2, ADNP, DSCAM, CHD2, KDM5B, SUV420H1, GRIN2B, ASH1L, NLGN, NRXN, PTEN, MECP2, UBE3A, ŞANK, FMR1, CHD8, DYRK1A, ADNP, SCN2A, TBR1, SYNGAP1, SERBP1, BOLA2, STXBP1, CDLK56 ve POGZ bu genlerden bazılarıdır (Kensuke, 2016).

Mitokondri, hücrenin güç kaynağı olarak bilinir. Solunum zinciri kompleksi içinde bir dizi ile hücresel enerjinin çoğunu üretmek, ATP oluşturmak için oksidatif fosforilasyon reaksiyonları kullanılır (Saraste, 1999). Bu zincirdeki bozulmalar enerji üretiminde bozulmalara, bu bozulmalarda hastalıklara yol açar.

Mitokondriyal disfonksiyonlar en çok enerji gerektiren organları etkilerler. Bunlar; beyin, kas, karaciğer, kalp ve böbrektir. 300 den fazla mitokondriyal DNA kodlama ve düzenleme bölgesi varyantları nadir görülen nörogelişimsel hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Lott, 2013).

Mitokondriyal disfonksiyonun otizme de neden olduğu gösterilmiştir (Legido, Jethva, Goldenthal, 2013). Otizmli bireylerde görülen mitokondriyal disfonksiyon genel popülasyona kıyasla 200 kez daha fazladır (Rossignol, Frye, 2012). Küçük çalışmalar ve vaka raporları mitokondriyal delesyonlar ve kopya sayılarındaki farkların otizmde etkili olduğunu göstermiştir. (Agustín, ReenaJethv, Michael, 2013; Rossignol, Frye, 2012)

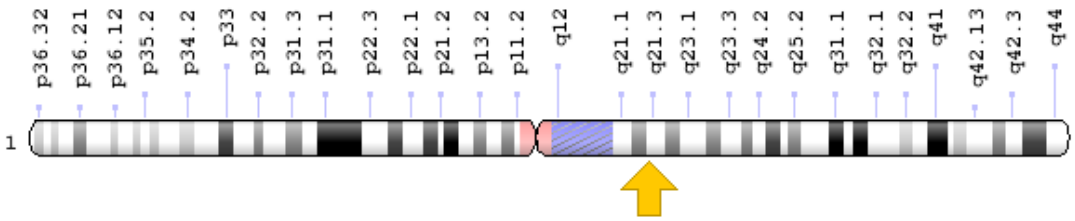
Yeni nesil dizi analizi sayesinde DNA'yı analiz etme ve değerlendirme fırsatı sunduğu için Otizmin anlaşılmasında fayda sağlamıştır. Kopya sayılarındaki değişikliklerin (copy number variants-CNVs) otizm ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırma yapılan çalışmalarda nörogelişimsel CNVs (delesyon ve duplikasyon) OSB ile ilişkilendirilmiştir (Jack, 2019).

Yapılan bir çalışmada de novo mutasyona sahip bireylerde aileleri ile kıyaslandığında daha düşük IQ görülmüştür. Örneğin SHANK grubu genler merkezi sinir sisteminde post sinaptik bölgede uyarıcı sinapsların içinde ifade edilirler. Cinsiyet hormonlarının ifade edilmesinde etkilidirler. SHANK genlerinde bulunan mutasyonların otizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ricardo, Juan, 2019).

Tüm bunlara rağmen sadece genetik faktörlerin yeterli olmadığı çevresel faktörlerinde otizm oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir (Ricardo, Juan, 2019).

4. POGZ

POGZ geni, 1q21 bölgesinde bulunur (Şekil 2). POGZ geni, hücre çekirdeğinde bulunan bir proteini yapmak için talimatlar içerir. POGZ proteini, çinko parmak alanları adı verilen bir veya daha fazla kısa bölge içeren çinko parmak proteinlerinin bir üyesidir. Bu bölgeler protein yapısındaki spesifik amino asit paterni ile bir veya birden fazla yüklü çinko atomlarını (çinko iyonlarını) bağlar. Çinko parmak bölgesinin katlanmış konfigürasyonu, proteini stabilize eder ve diğer moleküllere bağlanmasını sağlar.



Şekil 2.3. POGZ gen lokasyonu(https://ghr.nlm.nih.gov/gene/POGZ#location)

POGZ proteini, hücre çekirdeğinde DNA'ya ve DNA'yı paketleyen proteinler ağına bağlanır. POGZ proteininin kromatine bağlanması, DNA'nın bölgelerinin ne kadar sıkı bir şekilde paketlendiğini değiştirir. Dolayısıyla bu kromatin yapısını değiştiren işlemin bir parçasıdır. POGZ proteini nedeniyle kromatinde gen ekspresyon düzenlenmesinin beyin gelişimi için önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak POGZ geninin beyindeki spesifik fonksiyonu iyi açıklanmamıştır.

POGZ geni için iki fonksiyonel alan bildirilmiştir. HP1 bağlayıcı çinko-parmak benzeri motif (amino asitler 791–850) domaini POGZ'un heterokromatine bağlanması için görev alır. POGZ geninin ifadesi insan hücresinde susturulduğunda, uygun hücre büyümesi ve bölünmesi hasar görür. İkinci omein olan transpozaz türevli DDE domeinin (amino asitler 1117-1323) fetal beyin gelişimi ve nörojenezde aktif rol oynadığı düşünülmektedir. Stessman ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada POGZ mutasyonları olan bireylerde motor gelişim ve koordinasyon eksikliği, pediatrik bireylerde hipotalamus-hipofiz yapısal lezyonları gibi bir çok anomalilikten bahsedilmiştir (Stesman vd., 2016)



Şekil 2.4. POGZ protein yapısı

POGZ gen mutasyonları nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir, OSB'li kişilerde de bu gene ait varyasyonlar tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar POGZ gen varyasyonlarının, POGZ proteininin kromatine bağlanma kabiliyetini zayıflattığını, bu etkinin kromatinin anormal yeniden şekillenmesine (*remodelling*) neden olduğunu işaret etmektedir. Kesin hastalık mekanizması bilinmemekle birlikte; OSB'ye yol açan ve beyin gelişiminde rol oynayan genlerin normal ekspresyonunu değiştiren bu etkinin hastalık ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (ghr.nlm.nih, 2018 erişim tarihi 11 Şubat 2019).

POGZ geni otistik hastalarda tekrarlı mutasyona en çok uğramış genlerden biridir (Wang, T., 2016). Zihinsel engellilik, mikrosefali, kısa boy, hipotoni, fasiyal dismorfizm, şaşılık, işitme kaybı, brakidaktili, nörodavranışsal anormallikler ve özellikle yüz bölgesinde görülen brakisefali, uzun ve düz malar bölge, geniş burun ucu, kısa filtrum, ince vermilyon sınır, gerilmiş ağız ve sivri çene köşeleri POGZ geninin mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

5.1. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (-20°C): İndesit

Buzdolabı (+4°C): İndesit

PCR Cihazı: AB Applied Biosystems

Jel Elektroforez Cihazı:

YND Cihazı: Miseq

Mini Santrifüj: Allsheng mini santrifüj

DNA İzolasyon Cihazı: QIAGEN EZ1

Otomatik pipet: Eppendorf

Çeker Ocak: Nüve MN120

Kullanılan Kimyasallar

Amplitaqgold

Distile su

Enhancing buffer

Etidyum Bromit

Tris Barote Edta

Agaroz

5.2. Çalışma Grubu ve Metodoloji

Çalışmamızda, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı A.D. polikliniğine OSB ön tanısı ile başvuran hastalardan DSM-V tanı kriterlerine göre OSB tanısı alan hastaların periferik kanları çalışmada kullanılmak üzere alındı. Çalışmaya dahil edilen OSB hastalarının kromozom analizi, Frajil X sendromu ilişkili FMR1 gen analizi ve Array CGH analizi sonuçları normaldir.

Alınan kanlar Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinde +4 °C de çalışma gününe kadar saklandı

Çalışmaya dahil edilen hastalarda kardeşlik tek ve çift yumurta ikizleri olma durumunda tek bir bireyin DNA örneği ile çalışıldı. Sağlıklı kontrol grubu için 50 adet benzer yaş gruplarında nörogelişimsel problemi olmayan çocuklardan kan örnekleri alındı. Çalışma grubunun yaşları 2 ile 18 arasında olmasına dikkat edildi.

Çalışma Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi laboratuvarlarında geçekleştirildi. Kanlar karıştırıcı üzerinde 5 dakika homojenize edildikten sonra DNA izolasyon işlemine alındı.. İzolasyon işlemi kanlar 14'lü gruplara ayrılarak *QIAGEN EZ1 Advanced XL* (Seri No: L122A1010) DNA izolasyon cihazında yapıldı.. İzolasyon işleminde 200 µl tam kan kullanıldı ve işlem sonucunda her verici için 200 µl DNA izole edildi. İzole edilen DNA'lar gruplar halinde *Polymerase Chain Reaction* (PCR) işlemine alındı. PCR işlemi *AB Applied Biosystems* cihazında yapıldı. PCR işleminin protokolünü belirlemek üzere 55 ve 57 °C'lik iki farklı optimizasyon denemesi yapıldı Bu denemeler sonucunda Tablo 1'de yer alan primerler ve yapışma sıcaklıkları belirlendi.

Çizelge 1: Eksonlar, primerler ve uygun yapışma sıcaklıkları.

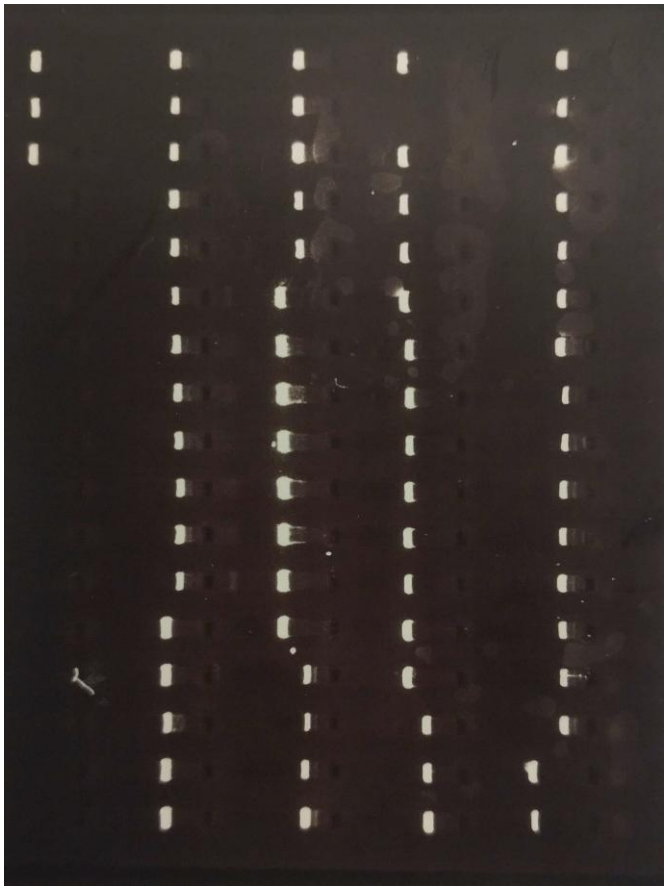
Ekson		Primer Dizileri	yapışma sıcaklığı
	Primer F	TTGGAAATGGAGGAAGGCTAGAGGATATG	57°C
2	Primer R	GGATGAGGAAACTGAGGTTTTCACAGAC	
	Primer F	TAGGAGGAGAAATCACATGAACAGTTGG	57°C
3	Primer R	GAAACACCAGTACCGAGTCAGCA	
	Primer F	GGTCACTTAAATCATGAGAGTCAGGGTG	57°C
4	Primer R	GTCATCTTCCTTGTCTCCCAAAGGTC	
	Primer F	CCCCACCCCCACTTCTGTTCATTTA	55°C
5	Primer R	TGTCTCCTGGCTCAACTGTAGACAATTC	
	Primer F	GCTGCCCAGGTTATTTTGTCAACAT	55°C
6,7	Primer R	CTCAACCTGAAGATCTCTCTACCAAATCC	
	Primer F	TGGTAGCTGGGCTGGATTTGATCTGT	57°C
8	Primer R	CATTTTAGAGCCCCTGCTTACAAGCTTCC	
	Primer F	ACCTAAGACAGGCAGGAGGGAGAAAT	57°C
9,10	Primer R	CGCCCCTAACAATTCAGGATCTAACACT	
	Primer F	TGGTAAGACAGGAGGATGCTGAATTAGG	57°C
11,12	Primer R	AGCCTTACTAGGCACCCAGAATAGC	
	Primer F	CAAGTCAGGAAAGGATGATTTGAGAACTT	55°C
13,14,15	Primer R	TACTTGAATAGCAAGGCCCTATGAAATTAG	
	Primer F	GTATTAGGTGGGAGCTTGTTAGAAATGCTG	57°C
16,17	Primer R	TCAACAGTGAATGAGTGAGGCCAAGTAG	
	Primer F	GTTGAGATGTGCTGGACCTAATTAGAAACC	55°C
18,19	Primer R	AGCTCCTTGGCTCAGACGTGATTACTATT	

55°C'lik protokol için 12 µl Amplitaqgold, 5 µl distile su, 6 pmol primer F, 6 pmol primer R, 10-30 ng/ul arasında olacak şekilde total hacim içerisine 2 µl DNA örneği eklendi. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. 57°C'lik protokol için 12 µl Amplitaqgold, 2 µl Enhancing B. 3µl distile su, 6 pmol primer F, 6 pmol primer R, 2 µl DNA örneği olacak şekilde toplam 25 µl karışım hazırlandı. Çalışma öncesinde PCR cihazına ısı ve süreleri içeren programlar kaydedildi. Denatürasyon aşaması için 95°C'de 10 dakika, primerlerin yapışma ve çoğalma aşaması için 35 tekrar olarak 95°C'de 40 saniye, 55 ve ya 57°C'de 1 dakika, 72°C'de 3 dakika, uzama aşaması için de 72°C'de 7 dakika. olacak şekilde programlar kaydedildi.



Şekil 3.1. AB Applied Biosystems PCR cihazı.

Elde edilen DNA örnekleri 0.5'lik Tris Barote Edta (TBE) jelde görüntülenmiştir



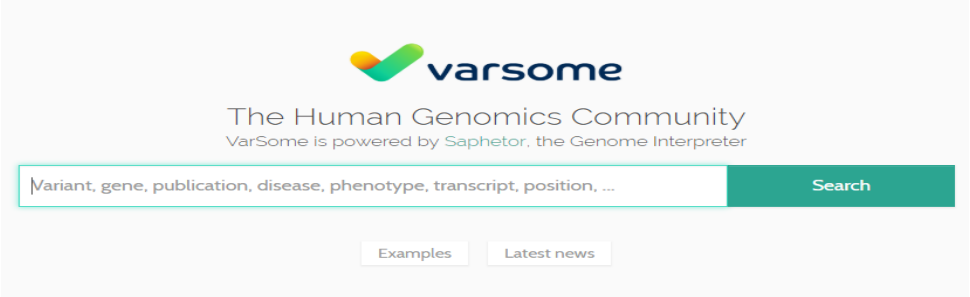
Şekil 3.2. Jel elektroforez örneği

PCR ürünlerini jel elektroforezinde görüntülemek için 500 ml, 0.5 lik TBE jel hazırlandı. 10x TBE tampondan 25 ml alıp 475 ml distile suyun içerisine eklendi. 3gr Agaroz ve 150 ml TBE buffer eklendi. Bu karışım erlende çalkalandı ve mikrodalga fırında orta derece ısıda ortalama 5 dk bekletildi. Homojen, şeffaf bir hal alıncaya kadar fırında bekletildi.

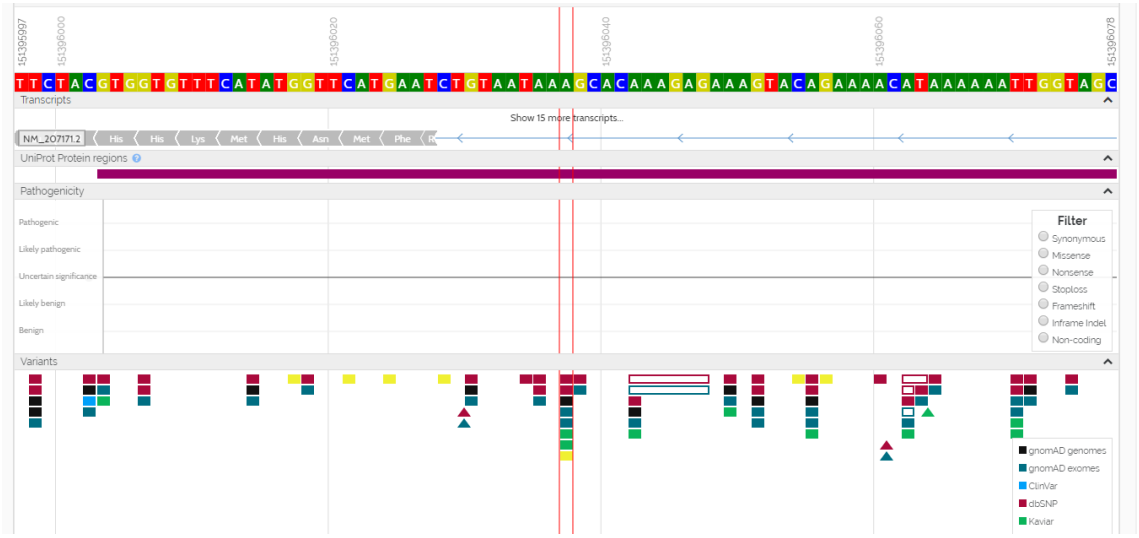
Çeker ocak altında jel tablasını standa yerleştirildi ve dengesi ayarlandı. Denge durumunda taraklar yerleştirildi. Jeli dökmeden önce içerisine 6 µl Etidyum Bromit eklendi. Tekrar çalkalanıp standa döküldü. Dökülen jelde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. 25 - 30 dakika soğumaya bırakıldı.

Jel yükleme işlemi için CarolLoad Concentrate 10x kırmızı boya örnek sayısı kadar parafilm üzerine 1 µl damlatıldı. Boya ve 1.5 µl örnek parafilm üzerinde karıştırıldı ve pipet yardımı ile jele yüklendi. Jel 140 volt, 400amper'de 20dk yürütüldü. Jel elektorforezinde başarılı bir şekilde çoğaltıldığı görülen PCR ürünleri YND tekniği için +4 derece buzdolabında saklandı

Çalışmaya dahil edilen her bir kişinin eksonlarına ait PCR ürünleri birleştirilerek YND tekniği için Miseq cihazına yüklendi. Elde edilen veriler .bam-.bai formatında analiz için korunaklı dijital ortamda saklandı. Verilerin değerlendirilmesi *Integrative Genomics Viewer* (IGV) 2.3.91 programı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Programda DNA dizisi üzerindeki polimorfizim ve mutasyonlar için belirlendi. Belirlenen anomalililerin patojenite açısından değerlendirilmesi *Varsome* (varsome.com) üzerinden kontrol edildi. Varsome, patojenite değerlendirmesi için American College of Medical Genetics 2015 (ACMG 2015) kriterlerini baz alır. *Varsome'*da bildirilen varyantlar, delesyonlar, insersiyonlar gibi anomalilikler her bir hasta ve sağlıklı kontrol için kayıt altına alındı.

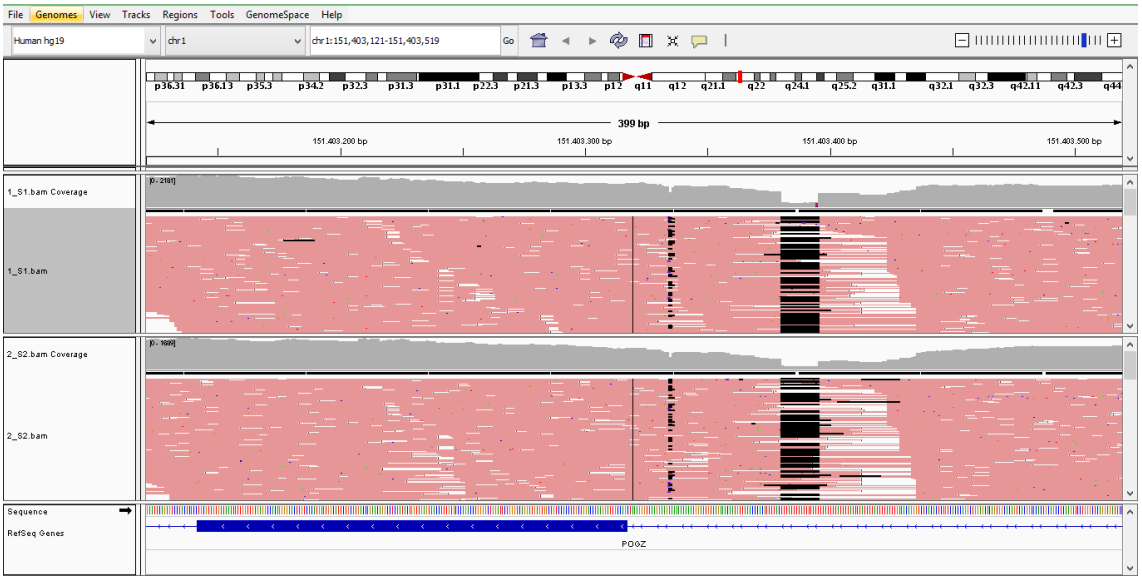


Şekil 3.3. Varsome arama ekranı (10 Nisan 2018)



Şekil 3.4. Varsome örnek ekranı (10 Nisan 2018)

Elde edilen verilerin gruplar arasındaki istatistiki karşılaştırması *IBM SPSS 22* programında ki-kare testi yapılarak değerlendirilmiştir. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.5. IGV ekranı POGZ geni. (10 Nisan 2018)

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

51 hasta ve 50 sağlıklı kontrol bireyden oluşan çalışmamızın sonuçları istatistiksel olarak incelendi. Ekson 4'te rs113396244, Ekson 6'da rs11204811, Ekson 9'da rs779479223, Ekson 10'da rs772352054, Ekson 13'te rs3831142, Ekson 15'te rs112072925, Ekson 18'de rs:227453 ve Ekson 19'da rs142860188 numaralı varyantlar tespit edildi.

Ekson 4 ile ile ilgili yapılan deneylerde, sağlıklı kontrol grubunda bulunan 2 örneğin dizilemesi, kalite kontrol standartlarını sağlayamadığı için değerlendirmeye alınmadı. Bu nedenle Ekson 4 verileri 48 sağlıklı kontrol 51 OSB tanılı hasta üzerinden değerlendirildi. Ekson 4'te tespit edilen rs113396244 numaralı varyant 48 sağlıklı kontrolün 45'inde bulundu, 51 otistik bireyin 1 tanesinde tespit edilmedi. Ekson 4 için yapılan değerlendirmede istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$)

Ekson 6'da bulunanan rs11204811 varyantı 50 sağlıklı bireyin 47'sinde bulunurken, OSB'li grupta 44 kişide tespit edildi. Ekson 6 içinde bulunan varyasyona dair dağılım istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p> 0.05$).

Ekson 9'da bulunan rs779479223 varyantı sağlıklı kontrol grubunda sadece 2 bireyde görüldü, OSB'li grupta görülmedi ($p> 0.05$).

Ekson 10'da görülen rs772352054 varyantı sağlıklı kontrol grubunda 50 hastanın 46'sında varken OSB'li grupta 51 hastanın 46'sında tespit edildi. Sağlıklı kontrol grubunda 4 bireyde, OSB'li grupta ise 5 hastada bulunmadı. Ekson 10 için otistik ve sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. rs3831142 numaralı varyantı Ekson 13'te gözlemlendi. Bu varyant 50 sağlıklı kontrol bireyin 28'inde bulunurken, 51 otistik bireyin 48'inde bulundu. Sağlıklı kontrollerin 22'sinde, OSB'li grupta ise 3 kişide tespit edilmedi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde bu varyantın bulunma sıklığı sağlıklı kontrol grubunda %56, OSB'li grupta %94,1olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlılık teşkil etmektedir ($p<0.0001$; OR:12,5; %95 GA:3,45-45,81).

Ekson 15'te görülen rs112072925 varyant OSB'li grupta anlamlı olarak yüksek belirlenmiştir. Bu varyant sağlıklı kontrol grubunun 24'ünde (%48) tespit edilirken otistik bireylerin 47'sinde (%92,2) tespit edildi. Sağlıklı kontrollerin 26'sında tespit edilmedi. OSB'li grupta ise 4 bireyde bu varyant belirlenmedi. Varyantın gruplardaki bulunma sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.0001$; OR:12,73; %95GA:3,98-40,6).

Ekson 18 ve 19'da bulunan varyantlar sağlıklı kontrol gruplarında tespit edilememiştir. Ekson 18'de görülen rs:2274535 varyantı otistik bireylerin 8'inde, Ekson 19'da yer alan rs142860188 varyant ise otistik grubun 5 bireyinde tespit edildi. Ekson 18'de yer alan rs:2274535 varyantı istatistiksel olarak incelendiğinde $p<0.004$ değeri ile; Ekson 19'da yer alan rs142860188 varyantı ise $p<0.023$ değeri ile anlamlı olarak OSB'li grupta yüksek bulunmuştur. Bu varyantların p değerlerine ait OR ve %95 GA değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Çizelge 2: Eksonlarda bulunan varyantlar ve istatistiksel verileri

Ekson No	Bulunan Varyasyon	Sağlıklı Kontrol n/N (%)	Otizm Grubu n/N (%)	P	OR (%95 GA)
Ekson 4	rs113396244	45/48 (93,8)	50/51 (98)	0,279	3,33 (0,33-33,2)
Ekson 6	rs11204811	47/50 (94)	44/51 (86.3)	0,194	0,4 (0,09-1,64)
Ekson 9	rs779479223	2/50 (4)	0/51 (0)	0,149	0,96 (0,9-1,01)
Ekson 10	rs772352054	46/50 (92)	45/51 (88,2)	0,527	0,65 (0,17-2,46)
Ekson 13	rs3831142	28/50 (56)	48/51 (94,1)	0,0001	12,5 (3,45-45,81)
Ekson 15	rs112072925	24/50 (48)	47/51 (92,2)	0,0001	12,73 (3,98-40,6)
Ekson 18	rs2274535	0/50	8/51 (15,7)	0,004	1,186 (1,05-1,33)
Ekson 19	rs142860188	0/50	5/51 (9,8)	0,023	1,10 (1,01-1,21)

Çizelge 3. Genotip frekans karşılaştırması.

		Hasta Grubu	Kontrol Grubu
rs3831142 (n-%)	**A/A**	3 %5,9	22 %44
	A/-	20 %39,2	27 %54
	-/-	28 %54,9	1 %2
rs112072925 (n-%)	**A/A**	4 %7,85	26 %52
	A/-	12 %23,5	24 %48
	-/-	35 %68,65	0 %0,0
rs2274535 (n-%)	**G/G**	43 %84,3	0 %0,0
	G/A	5 %9,8	0 %0,0
	A/A	3 %5,9	0 %0,0
rs142860188 (n-%)	**A/A**	46 %90,2	0 %0,0
	A/C	3 %5,9	0 %0,0
	C/C	2 %3,9	0 %0,0

Cinsiyet farkları incelendiğinde 51 otistik bireyin 37'si (%72,5) erkek, 14'ü ise (%27,5) kadındır. Sağlıklı kontrol grubunda ise 20 (%40) erkek, 30 (%60) kadın bulunmaktadır.

Sadece otistik grupta görülen varyasyonlardan Ekson 18'de görülen rs2274535 varyantı 7 otistik erkekte bulunurken 1 otistik kadın bireyde bulundu. Ekson 19'da bulunan rs142860188 varyantı sadece 5 otistik erkekte tespit edilmiştir. Diğer varyasyonlar için cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi. Yaş dağılımları ile ilgili bilgiler Tablo 3'te yer almaktadır.

Çizelge 4: Çalışma grupları cinsiyet dağılımları.

	OSB	Kontrol
Yaş (ortalama)	8,1	10,64
Erkek	37	20
Kadın	14	30

BÖLÜM 5

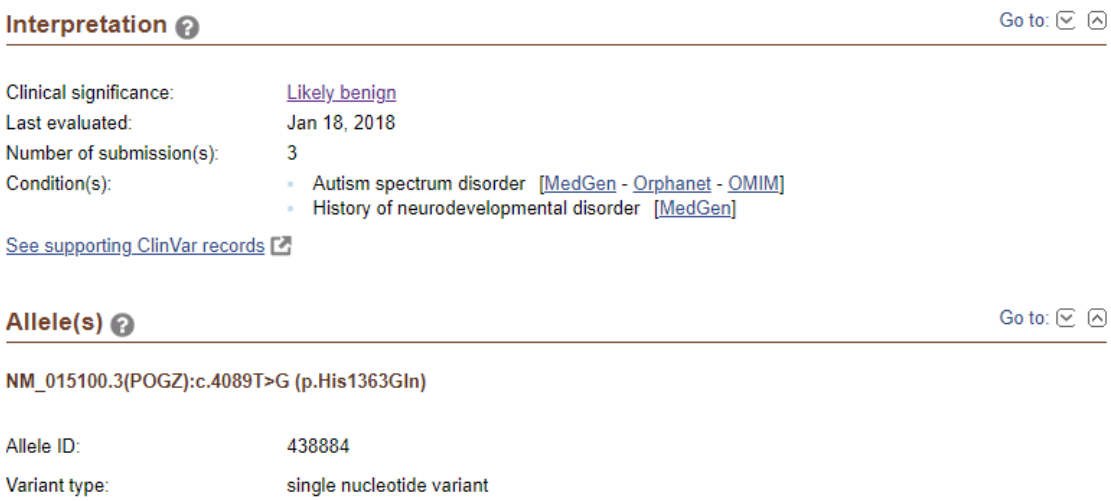
TARTIŞMA

Otizm spektrum bozukluğu günümüzde görülme sıklığı artan nörogelişimsel bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkış nedeni bilinmediğinden, doğum öncesi belirlenmesini sağlayacak bir metot olmadığından ve kesin bir tedavi yöntemi gelişmediğinden dolayı otizm her geçen gün yeni çalışmalara konu olmaktadır. Otizmin oluşmasında çevresel ve genetik bir çok etkenin bir arada rol aldığı çalışmalarda gösterilmiştir (Sealey, 2016).

Yapılan çalışmalarda nörogelişimsel hastalıklar ve genetik varyasyonların ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte literatürde nörogelişimsel hastalıkların genetik temeli ile ilgili olarak bildirilen çalışmaların sayısının az olduğu görüldü. Nörogelişimsel hastalıklardan birisi olan epilepside Antonietta Coppola ve arkadaşlarının 2018'de yaptığı çalışmada 1255 hastanın kopya sayısı varyasyonlarının (CNVs) ilişkisi incelenmiştir. Genetik veri kalite kontrol aşamasından sonra elde kalan 1097 hastanın 120'sinde (%10.9) en az bir patojenik olarak sınıflandırılan CNV, 19'unda (%1.7) muhtemel patojenik bir CNV tespit edilmiştir. Bu çalışmada epilepsi ile ilişkilendirilen genlerin, tanı için bir gösterge niteliği taşıyacağını desteklemektedir (Antonietta Coppola vd., 2018). Otizminde dahil olduğu nörogelişimsel hastalıkların genetik temelini açıklamaya katkı sağlayan ve tanı için yararlı olabilecek göstergeleri belirleyen bu ve buna benzer çalışmalar önemlidir.

Otizmli hastalarda Rena J. Vanzo ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada KANK1 geninin kopya sayısı varyasyonları (CNVs) incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda CNV bulunan 28 hastanın 13'ünde belgelendirilmiş OSB tanısı aldığı, 2'sinde ise beyin felci olduğu gösterilmiştir. Bu değerlendirme ve literartürde bu gene dair verilen diğer bulgular sonucunda; bu genin OSB için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Vanzo vd., 2019).

Teknolojik gelişmeler günümüzde tüm genomun veya tüm eksonların dizilenerek, genetik etkenlerin geniş ölçeklerde hastalıklara katkısını ortaya koyabilmektedir. Bütün ekson dizilimi (*Whole Exon Sequencing*) tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda 400-1000 genin OSB duyarlılığına neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CHD8, GRIN2B, SCN2A vb. gibi birtakım genlerin OSB ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur (Xiu-juan vd., 2018). Bu büyük ölçekli çalışmalarda otizim ile ilişkili olduğu bildirilen genlerden biri olan POGZ geni bu tez çalışması kapsamında incelendi. Kromozom 1 üzerinde yer alan POGZ geninin 19 eksonu, yeni nesil dizileme yöntemi ile çalışıldı. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırma yaptığımız çalışmamızda, hem sağlıklı kontrol grubunda hem de OSB'li grupta belirlediğimiz varyantların daha önceden POGZ geni için tanımlanmış olduğu görüldü. Bu bağlamda POGZ geni için yeni bir varyasyon tanımlaması yapılmadı. Örneklem grubunda belirlenen bu varyantlardan Ekson 19'da bulunan varyant hariç, diğer varyantlar için var olan çalışmalarda otizm ile doğrudan bir ilişki bildirilmemiştir. White ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada Ekson 19'da bulunan varyantın OSB ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada nörogelişimsel bozukluğu olan 5 bireyin POGZ geninin eksonları Sanger sekans ile incelenmiş ve otizm tanısı almış olan bireylerden bir tanesinde Ekson 19'da (rs142860188) bizim de belirlediğimiz varyantın bulunduğu bildirilmiştir (White vd. 2016). Bu çalışmanın verileri nedeniyle, Ekson 19'da bulunan rs142860188 no'lu varyant, NCBI (ClinVar)'da yapılan tarama sonucunda, olası bening şeklinde klinik olarak otizm ile ilişkili bildirilmektedir (Şekil 7). Bu tez çalışmasından üretilecek olan verilerin de literatüre katkıda bulunacağı ve arama motorlarında benzer şekilde otizm ile ilişkilendirileceği öngörülmektedir.



Şekil 5.1. NSBI(ClinVar) tarama sonucu. rs14286018

Temelinde genetik faktörlerin rol aldığı düşünülen otizmin aydınlatılmasında, belirli genlerin çalışılması ve hastalık ile ilişkisinin ispatlanması, hastalığın prenatal tanısının gerçekleştirilmesinde ve/veya hastalığın patogenezinin açıklanmasında, tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde büyük rol oynayacaktır. Bu nedenlerle OSB ve belirli gen gruplarının ilişkilerini açığa çıkarmak için yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Çin'de Xiujuan ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada 80 OSB'li çocuk ve ailesinden alınan örneklerde sanger dizileme ile belirli genlerin eksonları çalışılmıştır. POGZ geninin de içinde yer aldığı bazı genlerin, otizm ile ilişkili olduğu ve bu genlerde tespit edilen tek nükleotid varyasyonlarının doğum öncesinde otizmin tanısında kullanılabileceği ön görülmektedir (Xiu-juan vd. 2018). Bu ve buna benzer çalışmalardan elde edilen veriler ile otizmin doğum öncesi tespitinin mümkün olması söz konusu olabilecektir.

Bu tez çalışmasının planlama aşamasında POGZ geni ve otizmin ilişkisini inceleyen yayın sayısı ülkemizde ve dünyada çok azdı, halen de birçok hastalığa göreceli olarak az sayıdadır.

Literatürdeki çalışmalar ile yapmış olduğumuz tez çalışması popülasyon açısından karşılaştırıldığında; yaptığımız çalışmadaki birey sayısının yeterli büyüklükte olduğu görülmektedir. Literatürdeki çalışmalarda bildirilen bulgular, 5 ve 105 arasında değişen popülasyonlarda incelenmiştir. Hem çalışılan popülasyonun yeterli büyüklüğe sahip olması açısından, hem ülkemiz verilerine katkı sağlaması açısından, hem de bu verilerin elde edildiği deneylerin teknolojik açıdan yeni olması bu tez çalışmasının özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Ardıç, A. (2013). Otistik Spektrum Bozukluğu Tanısı Almış Çocukların Ailelerine Yönelik Bir Psiko-Eğitsel Grup Programının Ebeveynlerin Bazi Psikolojik Değişkenleri Üzerindeki Etkisi. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Özel Eğitim Bölümü Zihinsel Engelliler Anabilim Dalı. Eskişehir.

Agustín L., ReenaJethv., Michael J.G. 2013 Mitochondrial Dysfunction in Autism *Seminars in Pediatric Neurology Volume 20,* Issue 3, September 2013, Pages 163-175

Coppola, A., Cellini, E., Stamberger, H., Saarentaus, E., Cetica, V., Lal, D., Djémié, T., Bartnik-Glaska, M., Ceuleman, B., Cross, J.T., Deconinck, T., Masi, S.D., Dorn, T., Guerrini, R., Hoffman-Zacharska, D., Kooy, F., Lagae, L., Lench, N.,. Lemke, J.R., Lucenteforte, E., Madia, F., Mefford, H.C., Morrogh, D., Nuernberg, Palotie, A., Schoonjans, A., Striano, P., Szczepanik, E., Tostevin, A., Vermeesch, J.R., Esch, H.V., Paesschen, W.V., Waters, J.J., Weckhuysen, S., Zara, F., Jonghe, P.D., Sisodiya, S.M., Marini, C., Consortium, E.(2018). Diagnostic implications of genetic copy number variation in epilepsy plus. *Epilepsia* epi.14683.

Aslan, K., & Şahin, S. (2015). Ülkemizde otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda sosyal becerileri geliştirmeye yönelik yapılan güncel çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, *2(3),* 1-18.

Boukhris, T., Sheehy, O., Mottron, L., & Bérard, A. (2016). Antidepressant use during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in children. *JAMA pediatrics, 170(2):*117-24.

Casartelli, L., Molteni, M., & Ronconi, L. (2016). So close yet so far: Motor anomalies impacting on social functioning in autism spectrum disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 63,* 98-105.

CDC. (2019). 10 Şubat 2019 tarihinde https://www.cdc.gov/

adresinden erişildi.

Chalmers, M.G., Day, A., Fleming, M., 2013. Profound expressive language impairment in low functioning children with autism: an investigation of syntactic awareness using a computerised learning task. *Journal of Autism and Developmental Disorders, 43(9):*2062-81.

Colm T O. Denis C S. (2008) Marked variation in predicted and observed variability of tandem repeat loci across the human genome. *BMC Genomics 9(1)*:175.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME., (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* Apr 1;*464(7289):*704-12.

Evaluation of Trio-Based Whole Exome Sequencing Among Children With Diagnosed or Suspected Autism Spectrum Disorder. Frontiers in Genetics. *9*: 594.

Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., & Ripke, S. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics, 46(8),* 881-885.

Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., & Savino, W. (2015). The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry,* 6, Article ID 121.

ghr.nlm.nih. (2018). 11 Şubat 2019 tarihinde https://ghr.nlm.nih.gov/gene/POGZ adresinden erişildi.

docplayer.biz.tr/757227. (2015). 10 Nisan 2019 tarihinde https://docplayer.biz.tr/757227-Otizmli-cocuklarin-sosyal-becerilerini-gelistirmeye-yonelik-android-uygulamasi.html adresinden erişildi.

Holly A.F. Stessman, Marjolein H. Willemsen, Michaela Fenckova, Osnat Penn, Alexander Hoischen, Bo Xiong, Tianyun Wang, Kendra Hoekzema, Laura Vives, Ida Vogel, Han G. Brunner, Ineke van der Burgt, Charlotte W. Ockeloen, Janneke H. Schuurs-Hoeijmakers, Jolien S. Klein Wassink-Ruiter, Connie Stumpel, Servi J.C. Stevens, Hans S. Vles, Carlo M. Marcelis, Hans van Bokhoven, Vincent Cantagrel, Laurence Colleaux, Michael Nicouleau, Stanislas Lyonnet, Raphael A. Bernier, Jennifer Gerdts, Bradley P. Coe, Corrado Romano, Antonino Alberti, Lucia Grillo, Carmela Scuderi, Magnus Nordenskjo¨ld, Malin Kvarnung, Hui Guo, Kun Xia, Ame´lie Piton, Be´ne´dicte Gerard, David Genevieve, Bruno Delobel, Daphne Lehalle, Laurence Perrin, Fabienne Prieur, Julien Thevenon, Jozef Gecz, Marie Shaw, Rolph Pfundt, Boris Keren,Aurelia Jacquette, Annette Schenck, Evan E. Eichler, Tjitske Kleefstra 2016. Disruption of *POGZ* Is Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders *American Journal of Human Genetics* 2016 Mar 3; *98(3):* 541–552.

Ismail, S.; Essawi, M., (2012). Genetic polymorphism studies in humans *Middle East Journal of Medical Genetics Volume 1* - Issue 2 - p 57–63.

Jack F. G. Underwood, Kimberley M. Kendall, Jennifer Berrett, Catrin Lewis, Richard Anney, Marianne B. M. van den Bree, Jeremy Hall, 2019. The British Journal of Psychiatry (2019) Page 1 of 7. doi: 10.1192/bjp.2019.30

Janson White, Christine R. Beck, Tamar Harel, Jennifer E. Posey, Shalini N. Jhangiani, Sha Tang, Kelly D. Farwell, Zöe Powis, Nancy J. Mendelsohn, Janice A. Baker, Lynda Pollack, Kati J. Mason, Klaas J. Wierenga, Daniel K. Arrington, Melissa Hall, Apostolos Psychogios, Laura Fairbrother, Magdalena Walkiewicz, Richard E. Person,

Beaudet, James R. Lupski, Eric Boerwinkle, Richard A. Gibbs, Yaping Yang, Fan Xia, V. Reid Sutton. 2016. POGZ truncating alleles cause syndromic intellectual disability. *Genome Medicine* (2016) 8:3

John W. Fondon, Elizabeth A. D. Hammock, Anthony J. Hannan and David G. King (2008). Simple sequence repeats: Genetic modulators of brain function and behavior Trends in Neurosciences, *31(7):*328-34 ·

Kashi, Y, King, DG., (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *CellPress, 22(5):*253-239.

Kensuke, M., Takanobu, N., Kazuki, N., Nanaka, Gotoda-N., Atsushi, K., Atsuko, Hayata-T., Norihito, S., Hidenaga, Y., Yuka, Y., Ryota H., Hitoshi H., (2016). De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *J Mol Psychiatry* . 4: 1.

Zhiyv Niu, Jing Zhang, Jill A. Rosenfeld, Donna M. Muzny, Christine Eng, Arthur L.
Kırcaali-İftar G. (2014). Otizm Spektrum Bozukluğuna Genel Bakış. (Ed). Tekin-İftar E. Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Çocuklar ve Eğitimleri. 3. Baskı. Ankara: Vize Basın Yayın.

Lane A., Harpster K., Heatcock J., (2012). Motor characteristics of young children referred for possible autism spectrum disorder, *Pediatric Physical Therapy*. *24(1):*21-29.

Monteiro, S.A., Spinks-Franklin, A., Treadwell-Deering, D., Berry, L., Sellers-Vinson, S., Smith, E., Proud, M., Voigt, R.G. (2015) Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Children Referred for Diagnostic Autism Evaluation, *Clinical Pediatric*, *Vol 54*, Issue 14.

NIMH. (2018). 25 Nisan 2019 tarihinde National Institute of Mental Health. Autism. http://www.nimh.nih.gov/news/science-news/science-news-about-autism.shtml adresinden erişildi.

Nithianantharajah, Hannan, (2007). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews Neuroscience 7(9)*:697-709.

NAC. (2009). 10 Mayıs 2019 tarihinde http://www.nationalautismcenter.org/autism/ adresinden erişildi.

Otsimo.(2018). 10 Şubat 2019 tarihinde https://otsimo.com/tr/turkiyede-otizmli-cocuk-sayisi adresinden erişildi.

Özbaran, B., Köse, S. G., & Erermiş, S. (2009). Yaygın gelişimsel bozukluklarda sosyal biliş. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, *19*, 322-331.

Özer, E., & Özdemir, S. (2015). Face processing and eye tracking skills in children with autism spectrum disorders. *International Journal of Early Childhood Special Education*, *7*(1), 1-23.

Paweł S., James R. L. (2010). Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. Annual Review of Medicine Vol. 61:437-455

Ricardo Gutiérrez, Juan P. Garrahan *MEDICINA* (Buenos Aires) 2019; Vol. 79 (Supl. I): 16-21

Ronconi, L., Molteni, M., Cosortelli, L., (2012). Building Blocks of Others' Understanding: A Perspective Shift in Investigating Social-Communicative Deficit in Autism, Frontiers in Human Neuroscience, *10*, 144.

Rubenstein, E., Wiggins, L.D., Lee, L.C., (2015). A Review of the Differences in Developmental, Psychiatric, and Medical Endophenotypes Between Males and Females with Autism Spectrum Disorder. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*, *27(1):*119–139.

Rossignol, D.A., Frye, R.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. *17(3):*290-314.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. (1999) *Science 5;283*(5407):1488-93.

Sansin, S., Schendel, D., Magnusson, p. (2015). Autism Risk Associated With Parental Age And With Increasing Difference In Age Between The Parents. *Moleculer Psychiatry*, *21*, 693-700.

Sealey, L.A., Hughes, B.W., Sriskanda, A.N., (2016). Environmental Factors In The Development Of Autism Spectrum Disorders. *Elsevier*, *88*, 288-298.

Sterponi ve Shankey (2013) The Child as Musician: A Handbook of Musical Development Oxford University Press (ilk baskı 2006)

Sutherland, W.J., (1998). The importance of behavioral studies in conservation biology. *Animal Behaviour*, *56(4)*:801-809.

Usdin, K., (2008), The biological effects of simple tandem repeats: Lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Research*, *18*:1011-1019.

Ünal, P. V. (2018). "Sendromik Olmayan" Otizm Spektrum Bozukluğu Tanılı İkisi De Etkilenmiş İkiz Çocuk Ve Ergenlerin Ve Anne-Babalarının Genomlarının Ve Transkriptomlarının Tüm Genom Dizileme Ve Rna Dizileme Yöntemi İle Analizi. (Uzmanlık tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi/ Tıp Fakültesi Çocuk Ve Ergen Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

Yohe, S., Thyagarajan, B., (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med. 141(11):*1544-1557.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson H, CM., Reichenberg, A., (2014). The familial risk of autism. *JAWA Network, 7;311*(17):1770-7

Sandin, S., Schendel, D., Magnusson, P., Hultman, C., Suren, P., Susser, E., Grønborg, T., Gissler, M., Gunnes, N., Gross, R., Henning, M., Bresnahan, M., Sourander, A., Hornig, M., Carter, K., Francis, R., Parner, E., Leonard, H., Rosanoff, M., Stoltenberg, C., & Reichenberg, A. (2016). Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. Molecular Psychiatry. *21(5):*693-700.

Yosunkaya, E. (2013). Otizm etyolojisinde genetik ve güncel perspektif. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, *76(4)*, 84-88.

Wang., T. (2016). De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nature Communications,* 1-9

Xiujuan Du, Xueren Gao, Xin Liu, Lixiao Shen, Kai Wang, Yanjie Fan, Yu Sun, Xiaomei Luo, Huili Liu, Lili Wang, Yu Wang, Zhuwen Gong, Jianguo Wang, Yongguo Yu , Fei Li 2018. Genetic Diagnostic Evaluation of Trio-Based Whole Exome Sequencing Among Children With Diagnosed or Suspected Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Genetics 9:*594.

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	Gökberk
Soyad:	YILDIRIM
Doğum Yeri:	Edirne
Doğum Tarihi:	04.07.1990
Mesleği	Uzm. Biyolog
Yabancı Dil:	İngilizce
E-Posta Adresi	yildirim.gokberk@gmail.com
Tarih	**Eğitim**
2008	Edirne Lisesi/Fen Bilgimleri
2014	Mustafa Kemal Üniversitesi-Biyoloji
2018	Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Tıbbi Farmakoloji ABD
2018	Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik ABD
Aldığı Eğitimler ve Sertifikalar	
2015	Deney Hayvanlarında Temel Uygulamalar Kursu
	İş Tecrübesi
2017-Devam ediyor	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Korodinatörü.