

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

**Otizm Aday Genlerinden CC2D1A'nın Mutasyonlarının ve Gen Ekspresyonunun  
Araştırılması**

**Proje No:** TCD-2013-4494

**Proje Türü**  
Çok Disiplinli Araştırma Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Yrd. Doç. Dr. Elif Funda Şener  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Yusuf Özkul  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Halit Canatan  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Doç.Dr. Didem Behice Öztop  
Çocuk Psikiyatri Anabilim Dalı  
Araş. Gör. Dr. Merve Çıkılı Uytun  
Çocuk Psikiyatri Anabilim Dalı

Ekim 2013

KAYSERİ



## İÇİNDEKİLER

|                                                         | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------|----------|
| ÖZET.....                                               | 4        |
| ABSTRACT.....                                           | 5        |
| 1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM.....                            | 6        |
| 2.GENEL BİLGİLER.....                                   | 7        |
| 2.1. Otizmin Tanımlanması .....                         | 7        |
| 2.2.Otizm Ve Genetik Kökeni.....                        | 7        |
| <br>                                                    |          |
| 3. GEREÇ-YÖNTEM                                         |          |
| 1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi.....                  | 11       |
| 2. Çalışmada Kullanılan Ölçek ve Değerlendirmeler ..... | 11       |
| 3. Kan Örneklerinin Toplanması.....                     | 13       |
| 4. Ekspresyon Çalışmaları.....                          | 13       |
| 5. DNA Dizi Analizi (Sekanslama) Çalışmaları.....       | 15       |
| <br>                                                    |          |
| 4. BULGULAR.....                                        | 20       |
| 1. Hastaların Klinik Bulguları.....                     | 20       |
| 2. Ekspresyon Sonuçları.....                            | 21       |
| 3. Sekans Sonuçları.....                                | 22       |
| <br>                                                    |          |
| 5. TARTIŞMAVE SONUÇ.....                                | 24       |
| 6.KAYNAKLAR.....                                        | 25       |

## ÖZET

### Otizm Aday Genlerinden *CC2D1A*'nın Mutasyonlarının ve Gen Ekspresyonunun Araştırılması

**Giriş:** Otistik spektrum bozuklukları (OSB), erken yaşlarda başlayan sosyal iletişimde güçlükler ve olağan dışı basmakalıp tekrarlayıcı davranışlarla kendini gösteren heterojen nörogelişimsel bozukluklar setidir, otizm de bu spektrum içinde yer alır. *CC2D1A* geni daha önce mental retardasyonla ilişkilendirilmiş bir gendir ve otizmde araştırılmamıştır. Bu proje, bu genin ekspresyon profilinin ve gendeki varyasyonların Türkiye'deki otistik hastalardaki profilini ortaya koymayı ve genin otizmdeki olası rolünü ortaya koymayı amaçlamaktadır.

**Metod:** Çalışmaya 44 otistik hasta ve 27 sağlıklı kontrol dahil edildi. Alınan kan örneklerinden DNA ve RNA izolasyonları yapıldı. Gen ekspresyonu için RNA, sekanslama için DNA örnekleri kullanıldı. *CC2D1A* geninin ekspresyonu kantitatif Real Time PCR ile sekanslama ise klasik Sanger sekanslama kullanılarak yapıldı.

**Sonuç:** Hasta ve kontrol grubu arasında *CC2D1A* geni ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulundu ( $p<0.001$ ).

**Tartışma:** Elde ettiğimiz bulgulara göre *CC2D1A* geni otizm için yeni bir aday gendir ve bu gen hakkında daha detaylı bilgi elde edebilmek için yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

**Anahtar Kelimeler:** Otizm, *CC2D1A*, Ekspresyon, Mutasyon, Sekans

## ABSTRACT

### Investigation of Sequencing and Expression of *CC2D1A* As a Candidate Gene For Autism

**Introduction:** Autism Spectrum Disorders (ASD) is defined as a neurodevelopmental disorder, characterized by repetitive stereotypic behaviors or restricted interests, social withdrawal, and communication deficits. Autism belongs to ASD. *CC2D1A* gene has been linked to mental retardation (MR). We aimed to investigate the expression and sequence of *CC2D1A* gene with the diagnosis of autism in Turkey.

**Method:** 44 autistic patients and 27 controls were enrolled and obtained whole blood samples to isolate DNA and RNA samples from each participant. *CC2D1A* gene expression was assessed by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) and sequence with classical Sanger sequencing.

**Results:** Expression of *CC2D1A* gene studied on ASD cases and controls were significantly different ( $p < 0.001$ ).

**Discussion:** *CC2D1A* gene expression may be used as a candidate gene for ASD cases Further studies are needed to investigate the potential role of *CC2D1A* gene in related pathways in ASD.

**Key words:** Autism, *CC2D1A*, Expression, Mutation, Sequence

## 1.GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Son 20 yıldır otizm çalışmalarında genetik araştırmalar büyük rol oynamaktadır. Bunun nedeni otizmin etiyolojisinde genetik temeller olduğunun düşünülmesidir. Ancak bugüne kadar otizm ile ilişkilendirilen belirli aday genler (*NRX1*, *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3*, *EN*, *GABRG1*, *GABRG3*, *GABRA5*, *SLC9A6*, *SLC6A4*, *RELN*, *OXT*, *OXTR*, *FMR1*, *UBE3A*, *MET*, *MECP2*), tanımlanan nadir değişimler (mutasyonlar), kopya sayı değişimleri, kromozomal bozukluklar (kromozom 2, 6, 7, 16, 17, 19, 22, X başta olmak üzere) ve çeşitli genetik sendromlar (Fragile-X Sendromu, Rett Sendromu, Angelman Sendromu, Prader-Willi Sendromu, Tuberoz Sklerozis) otizm vakalarının çok küçük bir kısmını (%15-20) açıklayabilmektedir. Geri kalan vakalarda esas neden ya da faktör tanımlanabilmiş değildir.

2006 yılında *CC2D1A* geninde büyük bir delesyon tanımlanarak Mental Retardasyon (MR) ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle MR otizm vakalarının üçte birine eşlik eden bir klinik bulgudur. Bu noktadan yola çıkarak bu genin ekspresyonu otizmde daha önce ilişkilendirilmemiş ve genin sekanslanması da literatürde daha önce araştırılmamıştır.

Bu çalışma, otizmli hasta örneklerinin taranmasını, Türkiye'deki otizm hastalarının belirlenen gen açısından ekspresyon profillerinin kontrollerle birlikte ortaya konmasını ve böylelikle hastalık patogenezinde bu genin etkisinin araştırılarak anlaşılabilmesini amaçlamaktadır. Bu proje, TCD-2013-4494 kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Otizmin Tanımlanması

1943 yılında Leo Kanner tarafından tanımlanan otizm, yaşam boyu süren, yaşla ve olgunlaşma ile semptomların görünüm ve şiddetinde değişiklik görülebilen bir bozukluktur. OSB, erken yaşlarda başlayan sosyal iletişimde güçlükler ve olağan dışı basmakalıp tekrarlayıcı davranışlarla kendini gösteren heterojen nörogelişimsel bozukluklar seti olup otizm OSB'nin çekirdeğini oluşturmaktadır (1). Epidemiyolojik çalışmalar otizmin temelinde genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir. Aslında otizmin doğası, fenotipi oluşturan birçok risk faktörünün bir araya gelmesi nedeniyle multifaktöriyel olarak kabul görmektedir. Otizmin prevalansı tanımlandığı (1943) ilk günden bu yana artış göstermektedir. Bu artışın muhtemel nedenlerinden birisi; kısmen tanı kavramının ve ölçütlerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşın, tanı ölçütlerinin benzer olduğu yani DSM-IV uygun şekilde kullanıldığı halde son 20 yılda da özellikle zihinsel engel göstermeyen otistik bireylerin prevalansı artmaya devam etmiştir. Burada risk faktörlerindeki artış göz ardı edilemez. Bunun yanında, muhtemelen otizmin farkındalığının artması yaygınlığın artışında da etkili olabilir; ayrıca bu durum daha erken yaşlarda tanıya da olanak sağlamıştır (2). En son revizyon Mayıs 2013'te yayınlanan DSM-V kriterleri ile yapılmıştır. Otizmde erken tanı konulabilmesi erken müdahale yapılabilmesi için önemlidir. Erken dönemde tedavi ile sosyal iletişimde düzelmeye, anksiyete ve agresyonda azalma sağlanabilir (2). Son dönem geniş ölçekli araştırmalarda otizm yaygınlığı %1-2 olarak tahmin edilmektedir (3-5).

### 2.2. Otizm Ve Genetik Kökeni

Bugüne kadar bağlantı veya ilişki çalışmalarında otizmden sorumlu tek bir major gen belirlenememesi otizmin kompleks bir genetik hastalık olduğunu ve heterojenite gösterdiğini işaret etmektedir (6-12). Yapılan araştırmalar sonucunda belirli kromozomal lokuslarda otizm için belirli aday genler tanımlanmış durumdadır. Bu genlerin başında *NRX1*, *NLGN3*, *NLGN4*, *SHANK3*, *EN*, *GABRG1*, *GABRG3*, *GABRA5*, *SLC9A6*, *SLC6A4*, *RELN*, *OXT*, *OXTR*, *FMR1*,

*UBE3A*, *MET*, *MECP2* genleri gelmektedir (13). İlişkilendirilen diğer genler Tablo 1’de sunulmuştur.

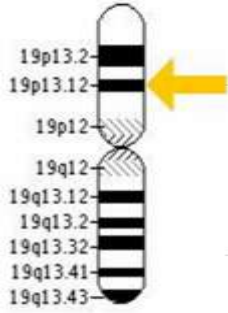
**Tablo 1.** OSB ile ilişkilendirilen aday genlerin listesi (\* işaretli genler birbirinden bağımsız çalışmalar sonucu elde edilen genleri göstermektedir).

| <b>Genetik Kategori</b> | <b>Genlerin Sayısı</b> | <b>Genler</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nadir                   | 81                     | <i>ANKRD11</i> , <i>A2BP1*</i> , <i>APC*</i> , <i>ASTN2</i> , <i>AUTS2</i> ,<br><i>BZRAP1</i> ,<br><i>C3orf58</i> , <i>CA6</i> , <i>CACNA1H</i> , <i>CADM1</i> , <i>CENTG2*</i> ,<br><i>CNTN4</i> ,<br><i>CNTNAP2*</i> , <i>CNTNAP5</i> , <i>CXCR3</i> , <i>DIAPH3</i> ,<br><i>DLGAP2</i> , <i>DPP10</i> ,<br><i>DPP6</i> , <i>DPYD</i> , <i>EIF4E</i> , <i>FABP5*</i> , <i>FABP7*</i> ,<br><i>FBXO40</i> , <i>FHIT</i> ,<br><i>FRMPD4</i> , <i>GALNT13</i> , <i>GLRA2</i> , <i>GRPR</i> , <i>HNRNPH2</i> ,<br><i>IL1RAPL1</i> , <i>IMMP2L*</i> , <i>JMJD1C</i> , <i>KCNMA1</i> ,<br><i>KIAA1586</i> ,<br><i>MBD1</i> , <i>MBD3</i> , <i>MBD4</i> , <i>MCPH1</i> , <i>MDGA2</i> ,<br><i>MEF2C</i> , <i>NBEA</i> ,<br><i>NLGN1</i> , <i>NLGN3</i> , <i>NLGN4X</i> , <i>NOS1AP</i> , <i>NRXN1</i> ,<br><i>ODF3L2</i> ,<br><i>OPHN1</i> , <i>OR1C1</i> , <i>PARK2</i> , <i>PCDH9</i> , <i>PCDH10</i> ,<br><i>PCDH19</i> ,<br><i>PDZD4</i> , <i>PLN</i> , <i>PPP1R3F</i> , <i>PSMD10</i> , <i>PTCHD1</i> ,<br><i>RAB39B*</i> ,<br><i>RAPGEF4</i> , <i>RB1CC1</i> , <i>REEP3</i> , <i>RFWD2</i> , <i>RIMS3</i> ,<br><i>RPL10</i> ,<br><i>RPS6KA2</i> , <i>SCN1A</i> , <i>SCN2A</i> , <i>SEZ6L2</i> , <i>SH3KBP1</i> ,<br><i>SHANK2</i> ,<br><i>SHANK3</i> , <i>SLC4A10</i> , <i>SLC9A9</i> , <i>ST7</i> , <i>SUCLG2</i> ,<br><i>TMEM195</i> ,<br><i>TSPAN7</i> , <i>UBE3A*</i> , <i>WNK3</i> |
| Sendromik               | 21                     | <i>ADSL</i> , <i>AGTR2</i> , <i>AHI1*</i> , <i>ALDH5A1</i> , <i>ARX</i> ,<br><i>CACNA1C</i> ,<br><i>CACNA1F</i> , <i>CDKL5</i> , <i>DHCR7</i> , <i>DMD</i> , <i>DMPK</i> ,<br><i>FMR1</i> , <i>MECP2</i> ,<br><i>NF1</i> , <i>NTNG1</i> , <i>PTEN</i> , <i>SLC6A8</i> , <i>SLC9A6</i> , <i>TSC1</i> ,<br><i>TSC2</i> , <i>XPC</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| İlişki                  | 84                     | <i>ABAT</i> , <i>ADA</i> , <i>ADORA2A</i> , <i>ADRB2</i> , <i>AR</i> , <i>ARNT2</i> ,<br><i>ASMT</i> ,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|             |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |    | <i>ATP10A, AVPR1A, C4B, CACNA1G, CCDC64, CDH10, CDH22, CDH9, CTNNA3, CYP11B1, DISC1, DLX1, DLX2, DRD3, EN2, ESR1, ESRRB, FBXO33, FEZF2, FOXP2, FRK, GABRA4, GABRB1, GABRB3, GLO1, GPX1, GRIK2, GRIN2A, GRM8, GSTM1, HLA-A, HLA-DRB1, HOXA1, HRAS, HS3ST5, HSD11B1, HTR1B, HTR3A, HTR3C, INPP1, ITGA4, ITGB3, LAMB1, LRFN5, LRRC1, LZTS2, MACROD2, MARK1, MET, MTF1, MYO16, NOS2A, NPAS2, NRCAM, NRP2, NTRK1, NTRK3, OXTR, PER1, PIK3CG, PITX1, PON1, PRKCB1, PTGS2, RELN, RHOXF1, SLC1A1, SLC25A12, SLC6A4, STK39, SYT17, TDO2, TPH2, UBE2H, VASH1, WNT2</i> |
| Fonksiyonel | 23 | <i>ALOX5AP, ASS, CACNA1D, CADPS2, CBS, CD44, CNR1, DAB1, DAPK1, DCUN1D1, DDX11, EGR2, F13A1, FLT1, ITGB7, MAOA, MAP2, OPRM1, RAI1, ROBO1, SDC2, SEMA5A, TSN</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

Literatürde kromozom 19 ve otizm ilişkisinin ortaya konulduğu birkaç araştırma bulunmaktadır (9-11). Bugüne kadar en yüksek bağlantıyı (LOD skor 3.57) Kilpinen ve arkadaşları bulmuşlardır (12,13). 2006 yılında İsrailli bir grup araştırmacı tarafından non sendromik mental retardasyon ile ilişkilendirilen yeni bir gen bulunmuştur (14). Bu çalışma ile araştırmacılar *CC2D1A* geninde tanımlanan ilk mutasyonu ve mental retardasyondaki bağlantısını açıklamaya çalışmışlardır. Bu genle ilgili literatürde çok fazla veri bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu genin fonksiyonunu anlamaya yönelik çalışmalar yapılması gerektiği açıktır.

19p13.12 bölgesinde lokalize olan bu gen ilk olarak bizim araştırmamızda otizm ile ilişkilendirmiş bulunmaktadır. Bu gen 29 ekzonlu, yaklaşık olarak 37 kilobaz büyüklükte ve 950 aminoasit kodlayan bir gendir (Şekil 1). C2 ve DM14 gibi iki farklı özelleşmiş bölgeden oluşmaktadır. Proteinin her iki bölgesi de oldukça korunmuş düzeydedir ve gendeki mutasyonlar bu bölgeleri etkileyerek genin fonksiyonunu bozmaktadırlar. Beyinin çeşitli bölgelerinde eksprese olduğu gösterilen bu genin çok önemli fonksiyonlara sahip olduğu düşünülmektedir. Özellikle NF-kappaB sinyal yolağında görevli olduğu ve serotonin 1A (5-HT1A) geninin baskılayıcı bölgesine bağlanarak bu genin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (15-18).



**Şekil 1.** Genin kromozomdaki yerleşimi.

Otizmin heterojen doğası genetik çalışmaları ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğini etkileyen en önemli faktörlerdendir (19). Otizm sebebi olarak tek nükleotid değişimleri (SNP), kopya sayı değişimleri (CNV), yaygın polimorfik varyantlar, çeşitli mutasyonlar ve kromozom anormallikleri gösterilebilir (20). Bununla birlikte vakalardan sorumlu olan varyantların belirlenmesi ve otizmdeki ilişkilerinin ortaya konması açısından sekans çalışmaları da önemlidir. Dolayısıyla yeni bir aday gen olabileceği önerilen *CC2D1A* genindeki olası değişimlerin kendi hasta grubumuzda tanımlanabilmesi çalışmaya ayrı bir önem katmaktadır.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 1. Hasta Gruplarının Belirlenmesi:

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran otizm tanısı ile takipte olan; hastalar ve konuşma, sosyal ve iletişimde gecikme şikâyeti ile ilk kez polikliniğimize başvurup yapılan değerlendirme sonrası DSM-IV kriterlerine göre otizm tanısı alan bireylerden çalışmayı kabul edenler araştırmaya dahil edilecektir. Kontrol grubu olarak aynı hastanenin Çocuk ve Genetik Polikliniğine başvurup kronik bir tıbbi, psikiyatrik ve genetik hastalığı olmayan ve psikiyatrik ilaç tedavisi kullanmayan 1.5-18 yaş arası çocuklar alınacaktır. Çocukluk çağı otizm değerlendirme ölçeği ve otistik davranışları değerlendirme ölçekleri belirti, şiddeti ve tespiti taramalarda kullanılabilmektedir. Başvuran olgularda gelişim testi veya zekâ testi yaşlarına göre hastalara uygulanabilir. Çalışmaya alınacak gruplar ve hasta sayıları aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- **Hasta Grubu:** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda otizm tanıları konulan 44 hasta alınmıştır.
- **Kontrol Grubu:** Hasta grubunun yaş ve cinsiyetleri dikkate alınarak 27 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak kullanılacaktır. Kontrol grubunun herhangi bir hastalık ile ilişkisinin olmamasına ve ilaç kullanmamasına dikkat edilecektir.

#### 2. Çalışmada Kullanılan Ölçek ve Değerlendirmeler

##### Sosyodemografik veri formu

Hastaların ilk başvuru şikâyetleri, prenatal ve gelişim özellikleri, şimdiye kadar aldığı tedaviler (farmakoterapi, özel eğitim vb.) ve güncel şikâyetler hakkında bilgi edinilmesi planlanmıştır. Ayrıca hastaların sosyodemografik özellikleri, kullandığı tedaviler, herhangi bir genetik bozukluğu tanısı olup olmadığını kontrol eden, bu çalışma için tasarlanan ve araştırmacı tarafından doldurulan bilgi formu verilecektir.

##### Çocukluk otizmi derecelendirme ölçeği (CARS)

15 maddeden oluşan, davranışların gözlemlenmesine dayanan, üniteler arasında ara değerlerin olduğu, 1-4 arası 7 puanlık likert tipi ölçektir. Çocukların, diğer insanlarla ilişkileri, beden ve

nesne kullanımları, değişikliğe uyumları, sözlü ve sözel olmayan iletişim ve taklit becerilerinin yanı sıra duyuşal özellikleri, korkuları ve etkinlik düzeyleri profesyoneller tarafından değerlendirilir ve puanlanır. Bir puan normal davranışları tanımlarken, dört puan anormal uygunsuz davranışları tanımlamaktadır. CARS 'da 38 ile 60 puan alanlar şiddetli belirtiler gösteren otistik grubu, 30 ile 38 arası puan 23 alanlar hafif-orta belirtiler gösteren otistik grubu, 15 ile 29 arası puan alanlar ise otistik belirti olmayan grubu oluşturmaktadır.

İlk defa Schopler ve ark. tarafından 1971 yılında otizm tanısında yardımcı bir araç olarak geliştirilmiştir. İlk yayımlanan şeklinde DSM III' de yer alan tanı ölçütlerine paralel olarak hazırlanmış, daha sonra DSM-IV-TR' de yer alan ölçütlere göre uyarlanmıştır. CARS'ın DSM-IV ile büyük oranda bağıntılı olduğu düşünülmektedir. CARS'ın Türkçe geçerlilik, güvenilirlik çalışması Hacettepe Üniversitesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları tarafından yapılmıştır. Ölçek Türkiye'de otizmle ilgili daha önce yapılan araştırmalarda kullanılmıştır.

#### **Otizm davranış kontrol listesi (ABC)**

Eğitimsel Planlama İçin Otizm Tarama Aracı'nın (ASIEP-2) beş alt ölçeğinden biri olup, duyuşal 9, ilişki kurma 12, beden ve nesne kullanımı 12, dil becerileri 13, sosyal ve öz bakım becerileri 11 madde olmak üzere toplam beş alt ölçekte 57 maddelik bir değerlendirme aracıdır. Ölçekten alınabilecek en düşük puan 0, en yüksek puan 159'dur ve Krug ve arkadaşları kesme puanını 68 olarak önermiştir. ABC'nin Türkçeye çevirisi ve geçerlilik / güvenilirlik çalışması 2007 yılında yapılmış olup kesme puanı 39 olarak belirtilen ölçeğin otizmin ayırt edilmesi, eğitimin planlanması ve değerlendirilmesi gibi konularda kullanılabilecek geçerli ve güvenilir bir değerlendirme aracı olduğuna karar verilmiştir.

#### **Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE)**

Bebeklerin ve okul öncesi dönemdeki çocukların gelişimini ve becerilerini bakımveren kişiden alınan bilgiler doğrultusunda sistemli biçimde değerlendiren bir envanterdir. Çeşitli yaş gruplarına ve kültüre özgü olarak düzenlenmiştir. "Evet / hayır / bilmiyorum" şeklinde yanıtlanan 154 maddeden oluşur. Uygulama sonucu Toplam Gelişim Puanı ve gelişimin farklı ancak birbiriyle ilişkili alanlarını temsil eden Dil-Bilişsel, İnce- Motor, Kaba-Motor ve Sosyal Beceri - Öz Bakım puanları olmak üzere 5 ayrı puan elde edilmektedir. Üç farklı yaş grubunda (0-12 ay, 13-44 ay, 45-72 aylar) hesaplanan test tekrar test güvenilirlikleri .99 ve .88 arasında bulunmuştur. Envanterin ve alt ölçeklerin iç tutarlılığı üç yaş grubunda Cronbach alfa

katsayıları hesaplanarak incelenmiş ve ilk iki yaş grubunda katsayıların çok yüksek olduğu görülmüştür (.99 ve .80 arası). Denver Gelişim Tarama Envanteri kriter olarak kullanıldığında her iki ölçüm aracı arasındaki ilişki yüksek bulunmuştur. Bayley Bebekler için Gelişim ölçekleri ve Vineland Uyum Davranış ölçeği ile AGTE arasındaki ilişkiler de yüksek bulunmuştur.

Genetik çalışmalar Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde yapılmıştır.

### **3. Kan Örneklerinin Toplanması:**

Hasta ve kontrol grubundan 5 ml EDTA'lı kan örnekleri alınarak DNA ve RNA izolasyon kitleri yardımıyla DNA ve RNA elde edilmiştir. Ekspresyon ve sekans çalışmaları yapılana kadar izolasyonların tamamlanmasından sonra örnekler -80°C'de saklanmıştır.

## **4. EKSPRESYON ÇALIŞMALARI**

### **4.1. RNA İZOLASYONU**

1. 500 µl kana 500 µl trizol eklenip vortekslendi ve buza alındı.
2. 200 µl kloroform eklenip vortekslendi ve tekrar buza alındı.
3. 12000 rpm'de 30dk santrifüj edildi. Aköz faz yeni tüpe alındı.
4. 1:1 oranında izopropanol eklendi, alt-üst edilip yaklaşık 3 saat -20'de bekletildi.  
(bu süre over night olabilir)
5. 14000 rpm 30dk +4 ya da oda ısısında santrifüj edildi.
6. Supernatant atıldı, pellet çok az ya da görünmüyor olabilir.
7. %70'lik ethanol tüpe full dolduruldu.
8. 14000 rpm 5 dk santrifüj edildi.
9. Supernatant atıldı. 500 µl dH<sub>2</sub>O eklenip vortekslendi ve 25 µl 5M NaCl eklendi.
10. 1ml absolute ethanol eklenip alt-üst edildi. -20 'de overnight bekletildi.
11. 14000 rpm 30 dk santrifüj edildi. Supernatant döküldü.
12. %70'lik ethanol tüpe full dolduruldu. 14000 rpm 5dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı ethanol uzaklaşsın diye 5-10 dk beklendi.
13. 50 µl Nuclease free Water ile pellet resüspanse edildi, vortex yapıp buza alındı.
14. Biospec Nano (Shimadzu) ile konsantrasyon ölçümü yapıldı.

#### 4.2. cDNA SENTEZİ

Yapılış şekli aşağıdaki gibidir.

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Random Primer     | 1 µl   |
| Oliga Primer      | 1 µl   |
| dH <sub>2</sub> O | 4,4 µl |
| RNA               | 5 µl   |

6,4 µl mix dağıtıldı. 5 µl RNA eklendi.

65 °C’de 10 dk inkübe edildi.

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Reaction Buffer           | 4 µl   |
| Protector RNase İnhibitör | 0,5 µl |
| DeoxynucleotMRe Mix       | 2 µl   |
| DTT                       | 1 µl   |
| Reverse Transcriptase     | 1,1 µl |
| Toplam Mix                | 8,6 µl |

8,6 µl mix dağıtıldı.

#### PCR Programı

|       |       |
|-------|-------|
| 29 °C | 10 dk |
| 48 °C | 60 dk |
| 85 °C | 5 dk  |

Sentezlenen cDNA -20’de saklandı.

#### 4.3. KANTİTATİF REAL TIME PCR (QRT-PCR) ÇALIŞMASI

1. cDNA örnekleri 1/5 oranında Nuclease Free Water ile seyreltildi.
2. Aşağıdaki miktarlarda reaksiyon plate (Roche) üzerine dağıtıldı.

|                     |      |
|---------------------|------|
| 2X Probe Master Mix | 10µl |
| Primer/Probe        | 1µl  |
| Nuclease Free Water | 2µl  |
| cDNA                | 7µl  |

3. LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında aşağıdaki programa koyuldu.

|        |           |   |          |
|--------|-----------|---|----------|
| 95° C  | 10 dk     |   |          |
| 95° C  | 10 saniye | } | 45 Döngü |
| 60° C  | 30 saniye |   |          |
| 72 ° C | 1dk       |   |          |
| 40° C  | 30 saniye |   |          |

4. Her bir örnek çift çalışıldı.

5. Housekeeping gen olarak beta-actin kullanıldı.

6. Veriler delta delta ct metodu kullanılarak hesaplandı.

7. Veriler normalize edildi.

#### 4.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmede histogram ve q-q grafikleri kullanıldı, ayrıca Shapiro-Wilk testi uygulandı. Gruplar arası varyansların homojen olup olmadığını değerlendirmede Levene testinden faydalanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için bağımsız iki örneklem t testi ve Mann-Whitney U testleri, nitel değişkenler için ise Fisher kesin  $\chi^2$  testi kullanıldı. Otizm grubunda genler arasındaki ilişki miktarını belirlemek üzere Pearson korelasyon analizinden yararlanıldı. Veriler frekans ve yüzde, ortalama ve standart sapma veya ortanca ile 25. ve 75.yüzdelik olarak ifade edildi. Verilerin analizi R 3.0.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) programında uygulandı.  $p < 0.05$  düzeyi anlamlı kabul edildi.

## 5. DNA DİZİ ANALİZİ (SEKANSLAMA) ÇALIŞMALARI

### 5.1. DNA İZOLASYONU

Kandan genomik DNA eldesi için High Pure PZR Template Preparation Kit kullanıldı.

Hasta ve kontrol grubundan 3 ml periferik kan alındı ve DNA eldesi için aşağıda sıralanan aşamalar uygulandı.

Liyofilize haldeki Proteinaz K'ya 5 ml distile su ilave edildi. İnhibitör Removal Buffer 20 ml etanol eklenerek, yıkama solüsyonu (wash buffer) 80 ml etanol eklenerek hazırlandı. Ön hazırlık aşamasından sonra aşağıdaki işlem sıralaması uygulandı;

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alındı.

2. Üzerlerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek iyice karıştırıldı.
3. Karışım 10 dakika 70°C’de inkübasyona bırakıldı.
4. DNA’ ların çökmesini sağlamak için, daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Hasta sayısı kadar toplama tüpü çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım toplama tüplerine aktarıldı.
6. Tüplerdeki karışım 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi ve 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g’ de 1 dk santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g’ de 10 saniye santrifüj edildi.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml’ lik ependorf tüplerine alındı.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 70 °C’de bekleyen elution buffer’ dan 200 µl eklendi.
16. Ependorf tüplerindeki karışım 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
17. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu Biospec Nano (Shimadzu) ile ölçüldü.
18. DNA örnekleri sonra çalışılmak üzere -20°C’de saklandı.

## **5.2. PCR AMPLİFİKASYONU**

CC2D1A geni 29 ekzonludur. CC2D1A geninin sekanlanması için öncelikle ekzonik bölgelere özgü primerler dizayn edilmiştir. Her bir ekzon için ayrı ayrı dizayn edilen primer dizileri kullanılarak spesifik PCR çoğaltılması yapılmıştır. PCR ürünlerinin doğru çalışıp çalışmadığının kontrolü agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. Çalışmayan bölgeler için yenMREn primer dizayn edilerek çalışmalar tekrarlanmıştır.

**Ekzonlara göre Kullanılan PCR malzemeleri ve PCR Programı:**

| <b>CC2D1A Ekzon 1</b> |      |
|-----------------------|------|
| R.Buffer              | 12,5 |
| Primer F              | 2    |
| Primer R              | 2    |
| DNA                   | 2    |
| Anneling              | 67°C |

| <b>CC2D1A Ekzon 2, Ekzon 3-4, Ekzon 5-6, Ekzon 13-14, Ekzon 16</b> |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| R.Buffer                                                           | 5    |
| MgCl <sub>2</sub>                                                  | 4    |
| dNTP                                                               | 3    |
| Primer F                                                           | 1    |
| Primer R                                                           | 1    |
| Taq polimeraz                                                      | 0,5  |
| DNA                                                                | 1    |
| Anneling                                                           | 61°C |

| <b>CC2D1A Ekzon 17, Ekzon 18-20, Ekzon 21-22</b> |      |
|--------------------------------------------------|------|
| R.Buffer                                         | 5    |
| MgCl <sub>2</sub>                                | 4    |
| dNTP                                             | 3    |
| Primer F                                         | 1    |
| Primer R                                         | 1    |
| Taq polimeraz                                    | 0,5  |
| DNA                                              | 1    |
| Anneling                                         | 65°C |

| <b>CC2D1A Ekzon 23-24, Ekzon 25-26, Ekzon 27-29</b> |      |
|-----------------------------------------------------|------|
| R.Buffer                                            | 5    |
| MgCl <sub>2</sub>                                   | 4    |
| dNTP                                                | 3    |
| Primer F                                            | 1    |
| Primer R                                            | 1    |
| Taq polimeraz                                       | 0,5  |
| DNA                                                 | 1    |
| Anneling                                            | 66°C |

Her bir örnek PCR kontrolü için %2'lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. Çalışan PCR ürünleri saflaştırmaya alınmıştır.

### 5.3. PCR Sonrası İlk Saflaştırma

1. PCR ürününün 4-5 katı kadar CP Buffer eklenir.
2. Tüpleri vorteksle ve kısaca santrifüjlenir.
3. Kit içerisinde çıkan kolonlu tüpe ürünleri aktarılır.
4. 1 dk. oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılır.
5. Alttaki toplama tüpü atılır ve yeni toplama tüpü konulur. Üzerine 700 µl DNA wash buffer eklenir.
6. 1 dk. oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılır.
7. Alttaki toplama tüpü atılır ve yeni toplama tüpü konulur. Üzerine 700 µl DNA wash buffer eklenir.
8. 1 dk. oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılır.
9. Filtreden kalan bufferı uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 2 dk. maksimum hızda santrifüj yapılır.
10. Yeni 1,5 ml'lik tüp etiketlenir ve filtre teni tüpe aktarılır. Üzerine 50 µl elution buffer eklenir. 2 dk oda sıcaklığında beklenir.
11. 1 dk. oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılır.
12. Alttaki saflaştırılmış PCR ürünümüz. -20 ' e saklanır.

### 5.4. Sekans PCR

- Her bir primer için ayrı ayrı mix hazırlanır.

|   |                 |      |
|---|-----------------|------|
| 1 | Quick Start Mix | 8 µl |
| 2 | Primer          | 2 µl |
| 3 | PCR ürünü       | 6 µl |
| 4 | dH2O            | 4 µl |

### Sekans PCR Koşulları

|   |     |         |           |
|---|-----|---------|-----------|
| 1 | 96° | 1 min.  | 25 cycle° |
| 2 | 96° | 10 sec. |           |
| 3 | 50° | 10 sec. |           |

|   |     |          |  |
|---|-----|----------|--|
| 4 | 60° | 4 min.   |  |
| 6 | 4°  | $\infty$ |  |

##### 5.5. Sekans PCR Sonrası Saflaştırma

1. 20 µl PCR ürününü kit içinden çıkan tüpün içindeki sefadeks üzerine konulur. 2600 rpm’de 3 dk santrifüj yapılır.
2. Filtre altındaki saflaştırılmış ürün plate alınır.
3. Üzerlerine 20 µl SLS buffer eklenir ve sekans cihazına verilir

##### 5.6. Verilerin Analizi

Sekans analizi için Beckman Coulter CEQ8000 cihazı kullanılmıştır. Analiz için Beckman Software kullanılmıştır. Verilerin analizi için referans diziler hazırlanmış ve sekanstan elde edilen diziler referans genom ile karşılaştırılarak olası değişiklikler belirlenmiştir.

#### 4. BULGULAR

##### 1. HASTALARIN KLİNİK BULGULARI

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik bulgular tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Hastalara ait klinik özellikler.

| Hasta   | Yaş<br>(ay) | Cinsiyet | Klinik Bulgu | Akrabalık | Aile Öyküsü |
|---------|-------------|----------|--------------|-----------|-------------|
| H10-101 | 65          | Erkek    | MR           | Negatif   | Pozitif     |
| H10-102 | 27          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H10-103 | 36          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H13-101 | 36          | Kız      | MR           | Negatif   | Pozitif     |
| H17-101 | 72          | Erkek    | Negatif      | Pozitif   | Negatif     |
| H24-101 | 96          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H27-101 | 41          | Kız      | MR           | Pozitif   | Negatif     |
| H27-102 | 41          | Erkek    | MR           | Pozitif   | Pozitif     |
| H28-101 | 29          | Erkek    | Negatif      | Pozitif   | Negatif     |
| H33-101 | 36          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H34-101 | 108         | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H35-101 | 42          | Kız      | Negatif      | Negatif   | Pozitif     |
| H36-101 | 108         | Erkek    | Negatif      | Pozitif   | Pozitif     |
| H37-101 | 41          | Erkek    | MR, Epilepsi | Negatif   | Pozitif     |
| H46-101 | 48          | Erkek    | MR           | Negatif   | Negatif     |
| H47-101 | 60          | Erkek    | MR, DEHB     | Negatif   | Negatif     |
| H51-101 | 36          | Kız      | Negatif      | Negatif   | Negatif     |
| H52-101 | 48          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Negatif     |
| H54-101 | 72          | Erkek    | MR           | Negatif   | Pozitif     |
| H56-101 | 36          | Erkek    | MR           | Negatif   | Negatif     |
| H58-101 | 29          | Erkek    | MR           | Negatif   | Negatif     |
| H60-101 | 24          | Erkek    | Negatif      | Negatif   | Negatif     |

|         |     |       |                |         |         |
|---------|-----|-------|----------------|---------|---------|
| H61-101 | 36  | Kız   | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H62-101 | 60  | Kız   | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H66-101 | 108 | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H68-101 | 108 | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H69-101 | 101 | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H72-101 | 36  | Erkek | Epilepsi       | Negatif | Negatif |
| H72-102 | 36  | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H75-101 | 89  | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H76-101 | 52  | Erkek | MR             | Negatif | Negatif |
| H76-102 | 63  | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H78-101 | 45  | Kız   | MR             | Pozitif | Pozitif |
| H79-101 | 52  | Erkek | MR             | Pozitif | Negatif |
| H81-101 | 40  | Erkek | MR, DEHB       | Pozitif | Negatif |
| H84-101 | 38  | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H85-101 | 30  | Erkek | MR             | Negatif | Negatif |
| H86-101 | 49  | Erkek | Negatif        | Negatif | Pozitif |
| H91-101 | 9   | Kız   | DEHB, Epilepsi | Negatif | Negatif |
| H94-101 | 48  | Erkek | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H96-101 | 50  | Kız   | Negatif        | Negatif | Negatif |
| H98-101 | 29  | Erkek | Negatif        | Pozitif | Negatif |
| H99-101 | 50  | Erkek | DEHB           | Pozitif | Pozitif |

MR: Mental Retardasyon, DEHB: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu

## 2. EKSPRESYON SONUÇLARI

Ekspresyon için elde edilen ilk veriler 24-27 Eylül 2014 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur (21). Çalışmanın ilk basamağında *CC2D1A* geni ve bu genin kontrol ettiği düşünülen *HTR1A* gen ekspresyonları çalışılmıştır. Elde edilen veriler 2016 yılında yayınlanmıştır (22).

44 hastanın 35'i erkek, 9'u kız, kontrol grubunda 20 erkek, 7 kız bulunmaktadır ve cinsiyetler açısından istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Yine yaşlar açısından da bir farklılık yoktur ( $p>0.05$ ). Hasta grubunda *CC2D1A* gen ekspresyonu kontrole göre yüksek ve anlamlı

bulunmuştur (p=0.025). *HTR1A* gen ekspresyonu ise hasta grubunda düşük ve anlamlı bulunmuştur (p< 0.001) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Gruplar arasında gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.

|                               | <b>Kontrol<br/>(n=27)</b> | <b>Hasta<br/>(n=44)</b> | <b>p<br/>value</b> | <b>adjusted p<br/>value</b> | <b>OR (95% CI)</b> |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| <b>Yaş (yıl)</b>              | 5.00±0.39                 | 5.75±0.33               | 0.439              | 0.585                       | 1.08(0.99-1.18)    |
| <b>Cinsiyet</b>               |                           |                         |                    |                             |                    |
| <b>Kız</b>                    | 7(25.9)                   | 9(20.5)                 | 0.592              | 0.592                       | 1.36(0.44-4.22)    |
| <b>Erkek</b>                  | 20(74.1)                  | 35(79.5)                |                    |                             |                    |
| <b>CC2D1A<br/>ekspresyonu</b> | 0.83(0.52-<br>0.91)       | 0.97(0.70-<br>1.21)     | 0.025              | 0.049                       | 8.58(1.45-50.93)   |
| <b>HTR1A<br/>ekspresyonu</b>  | 0.87(0.16-<br>2.46)       | 0.00(0.00-<br>0.48)     | <0.001             | 0.004                       | 1.00(0.99-1.01)    |

### 3. SEKANS SONUÇLARI

Hastalardan birisi çalışmaya alındıktan sonra Rett Sendromu tanısı aldığından çalışmadan dışlandı. Sekans sonuçları 39 hasta için değerlendirildi. Bulunan değişimler tablo 4’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.** Bulunan değişimler.

| <b>Yer</b> | <b>Değişim</b>             |
|------------|----------------------------|
| Ekzon 12   | c.1281T>C<br>(rs10410239)  |
| Ekzon 12   | c.1345G>A<br>(rs199644216) |
| Ekzon 12   | c.1281T>C<br>(rs10410239)  |

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| Intron 8 | c.874-48A>C<br>(rs2305776) |
|----------|----------------------------|

## 5.TARTIşMA VE SONUÇ

*CC2D1A* geninin araştırıldığı çalışmalar literatürde son 10 yılı kapsamaktadır. Bu gende tanımlanan büyük bir delesyon ile gen Non-Sendromik Mental Retardasyon ile ilişkilendirilmiştir. 2014 yılında bu gende başka mutasyon bulunmuştur (23). Ancak yine de otizm ile ilişkilendirilmemiştir. Özellikle otistik hastaların üçte birinde MR görülmesi en önemli klinik bulgulardan biri olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışma *CC2D1A* ve *HTR1A* genlerinin ekspresyonlarının otistik hastalarda karşılaştırılması açısından literatüre yeni bir katkı sağlayacaktır. Ek olarak, bu çalışma bu genlerin kandaki ekspresyonlarının otizmde araştırıldığı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Elde edilen sonuçlara göre *CC2D1A* gen ekspresyonunun hastalarda artması önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir. İlerleyen dönemlerde bu gen, otizm için bir biyomarker olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, bu gen ve içinde bulunduğu yolağın araştırıldığı yeni çalışmaların planlanması, bu genin otizmdeki ilişkisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Yeni hastalarda ilgili genin varyasyonlar açısından taranması, klinik bulgularla birlikte değerlendirilmesi ve genle ilgili başka yeni çalışmaların planlanması önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Sutcliffe JS. Insights into the Pathogenesis of Autism. *Science* 2008; 321: 208-209.
2. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 2008; 9(5): 341–355.
3. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research* 2011; 1380: 42-77.
4. Buxbaum JD, Silverman JM, Keddache M, et al. Linkage analysis for autism in subset families with obsessivecompulsive behaviors: evidence for an autism susceptibility gene on chromosome 1 and further support for susceptibility genes on chromosome 6 and 19. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 144-150.
5. McCauley JL, Li C, Jiang L, et al. Genome-wMRe and Ordered-Subset linkage analyses provMRe support for autism loci on 17q and 19p with evMRence of phenotypic and interlocus genetic correlates. *BMC Med Genet* 2005; 6: 1.
6. Liu J, Nyholt D, Magnussen P, et al. Autism Genetic Resource Exchange Consortium A genomewMRe screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 327–340.
7. Kilpinen H, Ylisaukko-oja T, Rehnström K, et al. Linkage and Linkage Disequilibrium Scan For Autism In An Extended Pedigree From Finland. *Hum Mol Gen* 2009; 18(15): 2912-2921.
8. Şener EF, Özkul Y. Otizmin Genetik Temelleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*. 2013; 22(1) 86-92.
9. Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, et al. The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *J Med Genet*. 2006;43:203–210.
10. Şener EF. Otizm ve Genetik Temelinin Araştırılması. *Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2013.
11. Şener EF, Bademci G, Tekin M, Diken İH, Özkul Y. Otizmin 19p13 Bağlantısı ve Ekzom Sekansın Başarısı. P200, 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 20-23 Aralık 2012, Bursa, Türkiye.

12. Şener EF, Bademci G, Tekin M, Diken İH, Özkul Y. Ekzom Sekans İle Otizm-Nonssendromik Mental Retardasyonlu Bir Ailede Yeni Bir Mutasyon Tanımlanması. Uluslararası Katılımlı 1. Otizm Kongresi, 25-28 Kasım 2012, İzmir, Türkiye (Sözel Bildiri).
13. Al-Tawashi A, Jung SY, Liu D, Su B, Qin J. Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity. J Biol Chem. 2012 Apr 27;287(18):14644-58.
14. Shi ZY, Li YJ, Zhang KJ, Gao XC, Zheng ZJ, Han N, Zhang FC. Pozitif association of CC2D1A and CC2D2A gene haplotypes with mental retardation in a Han Chinese population. DNA Cell Biol. 2012 Jan;31(1):80-7.
15. Albert PR, Le François B, Millar AM. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. Mol Brain. 2011 May 27;4:21.
16. Zhao M, Raingo J, Chen ZJ, Kavalali ET. Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. J Neurophysiol. 2011 Apr;105(4):1506-15.
17. Zhao M, Li XD, Chen Z. CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway. J Biol Chem. 2010 Aug 6;285(32):24372-80.
18. Shi ZY, Li YJ, Zhang KJ, Gao XC, Zheng ZJ, Han N, Zhang FC. Pozitif association of CC2D1A and CC2D2A gene haplotypes with mental retardation in a Han Chinese population. DNA Cell Biol. 2012 Jan;31(1):80-7.
19. Sener EF. Association of Copy Number Variations In Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. Chinese Journal of Biology, 2014, doi.org/10.1155/2014/713109.
20. Sener EF, Canatan H, Ozkul Y. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders: Applications of Whole Exome Sequencing Technology. Psychiatry Investig 2016;13(3):255-64.
21. Şener EF, Öztıp DB, Çıkılı Uytun M, Zararsız G, Canatan H, Özkul Y. Otizmde CC2D1A Gen Ekspresyonunun Araştırılması. 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 24-27 Eylül 2014, İstanbul, Türkiye.
22. Sener EF, Cıkılı Uytun M, Korkmaz Bayramov K, Zararsız G, Oztop DB, Canatan H, Ozkul Y. The roles of CC2D1A and HTR1A gene expressions in autism spectrum disorders. Metab Brain Dis 2016;31(3):613-9.

23. Manzini MC, Xiong L, Shaheen R, Tambunan DE, Di Costanzo S, Mitisalis V, Tischfield DJ, Cinquino A, et al. (2014) CC2D1A regulates human intellectual and social function as well as NF- $\kappa$ B signaling homeostasis. *Cell Rep* 8(3):647-55