



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEK KARBON REAKSİYONLARINA KATILAN
MHTFR, PHGDH VE *PSPH* GENLERİ
ÜZERİNDEKİ VARYASYONLARIN OTİZM
SPEKTRUM BOZUKLUĞU
ETİYOLOJİSİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Burak Kaan KASAP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN

TRABZON-2019

ONAY

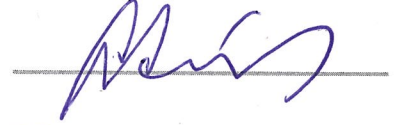
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burak Kaan KASAP'ın hazırladığı “Tek Karbon Reaksiyonlarına Katılan MTHFR, PHGDH ve PSPH Genleri Üzerindeki Varyasyonların Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyolojisindeki Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.08.2019

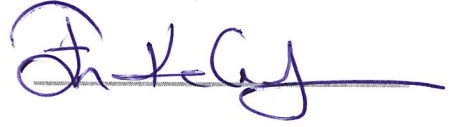
Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN (Danışman)



Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL



Prof. Dr. Ersan KALAY



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

01.08.2019

Burak Kaan KASAP

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve takıldığım her noktada bana yol gösteren değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini, fikirlerini, yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim.

Yapılan tez çalışması, Prof. Dr. Ersan KALAY'ın yürütücülüğünde 1061 no'lu KTÜ Bilimsel Araştırma Projesi ve Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'ın yürütücülüğünde 116S301 no'lu TÜBİTAK 1001 Projesi tarafından desteklenmiştir, bu bağlamda teşekkür ederim.

Araştırma süreci ve tez yazım aşamasındaki katkılarının dolayı sevgili Biyolog Tülay KÖSEAHMET, değerli arkadaşlarım, Arş. Gör. İdris ER'e, Arş. Gör. Dr. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK'a, Arş. Gör. İhsan NALKIRAN'a, Arş. Gör. Ceren SARI'ya, Gamze ZEHİR KIRKBİR'e ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü maddi manevi desteği benden esirgemeyen annem, babam ve sınır karakolunda görev yapan kardeşim Furkan Enes'e sonsuz teşekkür ederim.

Burak Kaan KASAP

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

KABUL ve ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

2

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu

2

2.2. Otizm Spektrum Bozukluğunun Etiyolojisi

2

2.2.1. OSB’de Çevresel Risk Faktörleri

3

2.2.2. OSB’de Genetik Risk Faktörleri

3

2.2.2.1. OSB ve Genomik DNA Kopya Sayısı Varyasyonları (CNV)

4

2.3. OSB ve Gen-Çevre Etkileşimi

4

2.4. Folat Döngüsü

5

2.5. Metiyonin Döngüsü

7

2.6. *MTHFR* Geni

10

2.7. L-Serin metabolizması

12

3. GEREÇ ve YÖNTEM

16

3.1. Gereç

16

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilecek Aile Bireylerinin Belirlenmesi

16

3.1.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

16

3.1.3. Kimyasallar

16

3.1.4. Kitler

17

3.1.5. Cihazlar

17

3.1.6. Sarf Malzemeler	18
3.1.7. Solüsyonlar	18
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Genomik DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü ve Çalışma Solüsyonlarının Ayarlanması	19
3.2.2. DNA Varyasyon Analizi	19
3.2.3. <i>PHGDH</i> ve <i>PSPH</i> Genleri Üzerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Ürünlerinin Temizlenmesi	20
3.2.5. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	21
3.2.6. <i>MTHFR</i> C677T Polimorfizmini Saptamak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP)	23
3.2.7. Biyoistatistiksel ve Biyoinformatik Analizler	25
3.2.7.1. Biyoistatistiksel Analizler	25
3.2.7.2. Biyoinformatik Analizler	25
4. BULGULAR	27
4.1. Kontrol Grubunda <i>MTHFR</i> C677T'nin RFLP ile Taranması	27
4.2. <i>MTHFR</i> C677T Varyantı Biyoistatistiksel Analizleri	27
4.3. <i>PSPH</i> Geninde Nadir Varyant Taraması	30
4.4. <i>PHGDH</i> Geninde Nadir Varyant Taraması	30
4.5. Görülen Değişimlerin In Silico Mutasyon Analizleri	34
4.5.1. c.141C>G; p.D47E Değişiminin Mutation Taster, PolyPhen-2 ve Human Splicing Finder Tahminleri Analizi	34
4.5.2. c.1559C>A; p.A520E Değişiminin Mutation Taster, PolyPhen-2 ve Human Splicing Finder Tahminleri Analizi	36
4.5.3. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (<i>PHGDH</i>) proteini üzerindeki post translasyonel modifikasyonlar	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
6. KAYNAKLAR	46
EKLER	65
Ek 1.	66
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. <i>PSPH</i> geninin amplifikasyonu ve döngüzel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler	22
Tablo 2. <i>PHGDH</i> geninin amplifikasyonu ve döngüzel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler	22
Tablo 3. RFLP reaksiyonunda kullanılan primerlerin isimleri ve dizileri	25
Tablo 4. OSB'li ve kontrol gruplarında <i>MTHFR</i> C ve T allelleri dağılımları	28
Tablo 5. OSB'li ve kontrol gruplarında <i>MTHFR</i> C677T genotip dağılımları	29
Tablo 6. OSB'li ve kontrol gruplarında <i>MTHFR</i> C677T varyantı homozigot/heterozigot toplam genotip dağılımları	29
Tablo 7. <i>PHGDH</i> geninde değişim gözlenen hastalarda <i>MTHFR</i> varyantları genotip dağılımları	34
Tablo 8. c.1559C>A değişiminin popülasyon frekansları (A allelinin görülme sıklığı)	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Folat yolağı ve homosistein metabolizmasına basitleştirilmiş genel bakış	6
Şekil 2. Hücresel transmetilasyon-transsülfürasyon yollarında majör enzimler ve ara ürünleri	8
Şekil 3. Metiyonin döngüsü ve trans sülfürasyon yolu	9
Şekil 4. İnsanlardaki folat metabolik yolağı	10
Şekil 5. Tek karbon metabolizmasında folat ve metiyonin döngüsü	12
Şekil 6. Nörogelişimde rol oynayan L-serinin merkezi sinir sisteminde astrositlerdeki üretimi ve dönüştüğü metabolitler	13
Şekil 7. L-serin sentez yolakları	14
Şekil 8. Kontrol grubu bulguları	27
Şekil 9. OT_56'nolu ailede <i>PHGDH</i> geninde gözlenen c.141C>G; p.D47E <i>de novo</i> değişimin kromatogramı	31
Şekil 10. OT_143'nolu ailede <i>PHGDH</i> geninde gözlenen c.1559C>A; p.A520E değişimi kromatogramı	32
Şekil 11. OT_79'nolu ailede <i>PHGDH</i> geninde gözlenen c.1559C>A; p.A520E değişimi kromatogramı	33
Şekil 12. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.141C>G; p.D47E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin Mutation Taster programı ile analizi	35
Şekil 13. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.141C>G varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin PolyPhen-2 programı ile analizi	35
Şekil 14. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.141C>G varyasyonunun splicing üzerine olası etkisinin Human Splicing Finder programı ile analizi	36
Şekil 15. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin Mutation Taster programı ile analizi	38
Şekil 16. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin PolyPhen-2 programı ile analizi	38
Şekil 17. <i>PHGDH</i> geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun splicing üzerine olası etkisinin Human Splicing Finder programı ile analizi	39
Şekil 18. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (PHGDH) proteini üzerindeki post translasyonel modifikasyonlar (PTM)	40

Şekil 19. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (PHGDH) protein sekansında 522. pozisyondaki Lizin amino asitinin ubiquitinasyonu

40



KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AdoMet	S-Adenozilmetiyonin
BHMT	Betain-homosistein metil transferaz
BTA-YBG	Başka türlü adlandırılamayan yaygın gelişimsel bozukluklar
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CBS	Sistasyonin- β -sentaz enzimi
CL	Sistasyonin- γ -Liyaz
CNV	Kopya sayısı değişikliği
CTH	γ -Sistatyonaz
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DMG	Dimetilglisin
DNTPs	Deoksinukleotid triphosphates
DSM-5	Diagnostic and statistical manual of mental disorders
Dtmp	Deoksi timidin monofosfat
dUMP	Deoksi üridin monofosfat
ESE	Exonic splicing enhancers
ESS	Exonic splicing silencers
FGCP	Folil poli- γ -glutamat karboksipeptidaz
FOLH1	Folat hidrolaz 1
FR	Folat reseptörü
FR-α	Folat alfa reseptörü
FR-β	Folat beta reseptörü
FR-γ	Folat gama reseptörü
GCPII	Glutamat karboksipeptidaz geni
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
HCY	Homosisteine
K	Lizin aminoasiti
MAF	Minör allel frekansı
MAT	Metiyonin adenosiltransferaz
5,10-Metil-THF	5,10-Metilentetrahidrofolat

MS	Metiyonin sentaz
MTs	Metiltransferaz
MTHF	5-Metiltetrahidrofolat
MTHFD	Metilentetrahidrofolat dehidrojenaz
<i>MTHFR</i>	5, 10-Metilentetrahidrofolat redüktaz geni
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
MTR	Metiyonin sentaz
MTRR	Metiyonin sentaz redüktaz
OSB	Otizm spektrum bozukluğu
PCFT1	Proton-bağılı folat taşıyıcı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
3-PGDH	3-Fosfoglisarat dehidrojenaz
PGDHD	Fosfoglisarat dehidrojenaz defekti
PHGDH	D-3 fosfoglisarat dehidrojenaz
PSAT	Fosfoserinaminotransferaz
PSPH	Fosfoserin fosfataz
PteGlu	Pteroilmonoglutamik asit
PTM	Post translasyonel modifikasyonlar
R-CH3	Metillenmiş DNA veya protein
RFC	İndirgenmiş folat taşıyıcı
ROS	Reactive oxygen species
SAM	S-Adenozilmetiyonin
SAH	S-Adenosilhomosistein
SAHH	S-Adenosilhomosistein
SFD	Serebral folat defekti
SHMT	Serin hidroksimetiltransferaz
SHMT1	Serin hidroksimetiltransferaz-1
SR	Serin rasemaz
THF	Tetrahidrofolat
TKM	Tek karbon metabolizması
TYMS	Timidilat sentaz
Vit. B12	B12 vitamini
kb	Kilobaz

Simgeler

μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
pmol	Pikomol
mM	Milimolar
ng	Nanogram
U	Ünite

Formüller

Zn	Çinko
dH_2O	Deiyonize su
$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	EDTA disodyum dihidrat
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etil alkol
$\text{C}_{12}\text{H}_2\text{ON}_3\text{Br}$	Etidyum bromür
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Glasiyel asetik asit
HCl	Hidroklorik asit

ÖZET

Tek Karbon Reaksiyonlarına Katılan *MTHFR*, *PHGDH* ve *PSPH* Genleri Üzerindeki Varyasyonların Otizm Spektrum Bozukluğu Etiyolojisindeki Etkisinin Araştırılması

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) sosyal iletişim ve etkileşimdeki yetersizlikler, sınırlı ilgi alanları, stereotipik motor davranışlar ve konuşma yetersizliği görülen, genetik ve klinik olarak yüksek düzeyde heterojenite gösteren nörogelişimsel bir grup bozukluktur. OSB görülme sıklığı son yıllarda hızla artmış ve son verilere göre 1/59 düzeyine ulaşmıştır. OSB'li hastalar üzerinde son yıllarda yapılan yeni nesil dizileme çalışmalarıyla yüzlerce gen, DNA kopya sayısı değişikliği (CNV) ve kromozomal anomali OSB ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalarda da *MTHFR* C677T varyantının OSB ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmanın amacı; OSB'nin genetik etiyolojisinde *MTHFR*, *PHGDH* ve *PSPH* geni varyantlarının etkilerinin araştırılmasıdır. Tek karbon metabolizmasında birlikte fonksiyon yapan bu genler üzerindeki varyantların kombine etkisinin OSB fenotipiyle ilişkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada *MTHFR* C677T varyantının hem allel frekansı hem de genotip dağılımı yönünden OSB ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. *MTHFR* C677T varyantını taşıyan OSB'li hastalarda *PSPH* geni üzerinde OSB'ye yakalanma riski ile ilişkilendirilebilecek nadir ya da yaygın SNV'lere rastlanmamıştır. Bununla birlikte, *MTHFR* C677T/A1298C varyantlarını taşıyan OSB'li 4 hastada aynı zamanda *PHGDH* geni üzerinde oldukça nadir ve zararlı mutasyonların da heterozigot olarak birlikte bulunduğu tespit edildi. Bu durum, bu iki gendeki zararlı DNA varyasyonlarının kombine etkisinin OSB'nin genetik etiyolojisinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişkinin varlığı ve anlamlılığı, *MTHFR* C677T/A1298C varyantlarını taşıyan daha fazla OSB'li ve kontrol grubunda *PHGDH* geni üzerindeki varyantların çalışılması ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu konudaki çalışmalarımız devam etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Metilentetrahidrofolat redüktaz, otizm spektrum bozukluğu, serin

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Variations on the *MTHFR*, *PHGDH* and *PSPH* Genes, which are involved in one Carbon Reactions, on the Etiology of Autism Spectrum Disorder

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders. It shows high level of heterogeneity genetically and clinically. There are inadequacies in social communication and interaction, limited interests, stereotypic motor behavior and speech failure in ASD. The frequency of ASD has increased rapidly in recent years and has reached 1/59 level according to the latest data. Hundreds of genes, DNA copy number changes (CNV) and chromosomal anomalies have been associated with ASD by next generation sequencing studies on ASD patients. In addition, *MTHFR* C677T variant is claimed to be associated with ASD in some studies. The aim of this study is to investigate the effects of *MTHFR*, *PHGDH* and *PSPH* gene variants in the genetic etiology of ASD. The relationship between the ASD phenotype and the combine effects of the variants on these genes that function together in one carbon metabolism has not been previously investigated. In this study, no statistically significant difference was found between ASD and control groups in terms of both allele frequency and genotype distribution of *MTHFR* C677T variant. There has not been come across rare or common SNVs associated with the risk of developing ASD on the *PSPH* gene in ASD patients with *MTHFR* C677T variant. However, in four ASD patients carrying *MTHFR* C677T/A1298C variants, very rare and deleterious mutations on the *PHGDH* gene were found as heterozygous. This suggests that the combined effect of deleterious DNA variations in these two genes may be important in the genetic etiology of ASD. The presence and significance of this relationship should be supported by the study of variants on the *PHGDH* gene which involves more ASD groups carrying *MTHFR* C677T/A1298C variants, and control groups. Our work is in progress on this subject.

Key Words: Autism spectrum disorder, methylenetetrahydrofolate reductase, serine

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), sosyal iletişim ve etkileşimdeki yetersizlikler, kısıtlı ilgi alanları ve stereotipik davranışlarla karakterize kompleks bir grup nörogelişimsel bozukluktur (1). OSB'nin prevalansı, ABD Hastalık Kontrol Merkezi'nin 2018 yılı raporunda tahmini olarak 1/59 olarak belirtilmiştir (2). OSB'yi belirlemeye yönelik araştırmalar, OSB'nin büyük oranda genetik bir etiyolojiye sahip olduğunu (3) ve kalıtsallık oranının %50-%90 arasında değiştiğini göstermektedir (4). OSB'nin genetik nedenlerini belirlemeye yönelik çalışmalarda karşılaşılan en büyük zorluk, bu hastalığın genetik ve klinik olarak oldukça heterojen olması ve tek gen hastalıklarında görülen Mendeliyen kalıtım kalıplarına büyük oranda uymamasıdır (5, 6). OSB'nin kompleks bir hastalık olması, sorumlu genlerin belirlenmesi çalışmalarında Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS), Genomik Kopya Sayısı (CNV) değişikliği analizleri, Tüm Ekzom ve Genom DNA Dizileme çalışmaları ve epigenetik mekanizmaların çalışılması gibi yeni nesil genomik teknolojilerinin kullanımını beraberinde getirmiştir (7–9). Bu araştırma metodları kullanılarak yapılan araştırmalarda bugüne kadar yüzlerce gen, CNV ve tek nükleotid değişiklikleri (SNV) OSB ile ilişkilendirilmiş ve ilişkilendirilmeye devam etmektedir (10–13).

Bu çalışmanın amacı; OSB'nin genetik etiyolojisinde *MTHFR*, *PHGDH* ve *PSPH* geni varyantlarının etkilerinin araştırılmasıdır. *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot olarak taşıyan OSB'li hastalar ve kontrol grubunda L-serin *de novo* biyosentezinde fonksiyon yapan *PHGDH* ve *PSPH* geni varyantlarının kombine etkisinin, OSB'nin etiyolojisinde bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bizi böyle bir olasılığı sorgulamaya iten neden; tüm genom DNA dizi analizi yaptığımız bir OSB hastasında *PHGDH* geninin bir allelinin kırıldığını ve *MTHFR* C677T varyantının da homozigot mutant olduğunu tespit etmemizdir (TÜBİTAK 1001 projesi). Bu hastadaki OSB fenotipinden bu iki gendeki mutasyonların kombine etkisinin sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu hipotezi test etmek amacıyla, elimizde DNA'sı bulunan 222 OSB hastasında *MTHFR* C677T varyantını homozigot taşıyan 20, heterozigot taşıyan 101 olmak üzere toplam 121 hastada *PHGDH* ve *PSPH* genlerindeki nadir ya da sık görülen varyantların bu hastalardaki OSB fenotipine etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otizm Spektrum Bozukluğu

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) iletişim ve etkileşim yetersizliği, sınırlı ilgi alanları, stereotipik motor davranışlar ve konuşma yetersizliği görülen genetik ve klinik olarak yüksek düzeyde heterojenite gösteren, etkileri üç yaşından önce gözlenen nörogelişimsel bir grup bozukluktur (1). Otizm Spektrum Bozukluğu epileptik nöbetler (14), gastrointestinal rahatsızlıklar (15) ve otoimmün bozukluklar (16) ile de seyredabilmektedir. Klinikte hastalık tanısı Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Mayıs 2013'te tanı kriterlerinde iyileştirme yaptığı DSM-5'e (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition) göre konulmaktadır (17). DSM-5 tanı kriterlerine göre Otizm, Asperger sendromu ve Başka Türlü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar (BTA-YBG) "Otizm Spektrum Bozukluğu" çatısı altına toplanmıştır (18). 1990'lı yıllarda OSB nadir hastalıklar grubunda değerlendirilmekteyken, ABD "Hastalıkları Kontrol Merkezi"nin (Center for Disease Control) 2018 yılı prevalans verilerine göre bu sayı 1/59' a kadar yükselmiştir (2). Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde OSB, erkeklerde kızlara göre 3-4 kat daha fazla gözlenmektedir (19). OSB, genel dismorfik bulguların ya da mikrosefalinin bulunup bulunmamasına bağlı olarak sendromik OSB ve sendromik olmayan (esansiyel) OSB olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (20). Dismorfik bulgular ve/veya mikrosefalinin varlığı erken morfogenezisteki sorunları yansıtmaktadır ve tanı konulmuş çocukların %20-30'unda sendromik OSB gözlenmektedir (6, 21). Bazı Mendeliyen kalıtmalı hastalıkları olan ve aynı zamanda OSB kriterine uyan hastalar da sendromik OSB içerisinde değerlendirilmektedir (22).

2.2. Otizm Spektrum Bozukluğunun Etiyolojisi

OSB'nin kalıtsallığı üzerine yapılan aile ve ikiz çalışmalarında; monozigotik ikizlerde %85-92, dizigotik ikizlerde de yaklaşık %31 konkordans oranları bulunmuştur (23–26). Ayrıca, etkilenmiş bireyin kardeşinde OSB görülme oranı yaklaşık %20'dir ve bu oran genel popülasyondan yaklaşık 14 kat daha fazladır (6, 23). OSB'nin etiyolojisi üzerine ileri sürülen fikirler genel olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; çevresel nedenler (hamilelikte beslenme, ilaç kullanımı, hormonal bozukluklar, geçirilmiş enfeksiyonlar, vb.) ve epigenetik faktörler de dahil genetik nedenler olarak belirtilmektedir (6, 16, 27–29).

Embriyonun anne rahminde gelişimi esnasında maruz kaldığı çevresel faktörlerin OSB'nin oluşumunda risk faktörleri olduğu genel olarak kabul edilmektedir (27). Ancak,

OSB'nin yüksek olan kalıtlılabirliği ve özellikle son yıllarda yapılan büyük orandaki yeni nesil dizileme çalışmalarıyla yüzlerce genin OSB ile ilişkilendirilmiş olması (30), genetik etiyolojilerin OSB fenotipine büyük orandaki etkisini göstermektedir. OSB, nörogelişimsel bir grup bozukluk olmakla birlikte kompleks hastalıklar grubunda yer almaktadır (24).

2.2.1. OSB’de Çevresel Risk Faktörleri

OSB’nin etiyolojisindeki çevresel risk faktörleri çok geniş bir şekilde araştırılmış ve geniş bir ölçeğe dağılmaktadır. Bunlar; pre, peri ve neonatal faktörler olarak sıralanabilir: Hamilelik öncesi ebeveyn yaşı, annenin hamilelik sürecinde beslenmesi, geçirdiği hastalıklar, kullandığı ilaçlar, maruz kaldığı toksik maddeler başta olmak üzere yenidoğanın maruz kaldığı benzer çevresel faktörler de yoğun bir şekilde araştırılmakta ve tartışılmaktadır (31–34).

Çevresel risk faktörleri içerisinde en kayda değer olanlar anne adayının hamilelik sürecinde kullandığı/maruz kaldığı ilaçlar/toksik metabolitlerin etkisi ve beslenme olarak görölmektedir. Özellikle antiepileptik bir ilaç olan valproatın hamilelik döneminde kullanımının OSB riskini artırdığı bilinmektedir (35, 36). Hamilelikten kısa bir süre öncesinden başlayarak hamilelik süreci boyunca yetersiz/sağlıksız beslenme ve vitamin eksikliğinin (özellikle folik asit ve B12 vitamini) OSB gibi nörogelişimsel hastalıklarda ve nöral tüp defekti gibi konjenital malformasyonlarda önemli bir risk faktörü olduğu düşünölmektedir (37–39). ABD ve Norveç’te yapılan iki çalışmada hamilelik öncesi folik asit kullanımının OSB riskini yaklaşık %40 azalttığı belirtilmiştir (40, 41). Yine bir araştırmada *MTHFR* C677T varyantı gibi folik asit metabolizmasında yetersizliğe neden olan DNA varyantı taşıyan annelerde folik asit kullanımı ile OSB riski arasında yüksek bir korelasyon (ters korelasyon) olduğu vurgulanmaktadır (42).

2.2.2. OSB’de Genetik Risk Faktörleri

OSB’nin genetik etiyolojisinden sorumlu yüzlerce gen mutasyonu, DNA kopya sayısı değışiklikleri (CNV), kromozomal anomali tanımlanmıştır (43). Özellikle, kromatin yeniden düzenleme genleri (*CHD8*, *BAF155*), snaptik hücre yapışma (adhezyon) genleri (*CNTN4* ve diğer nöroksin/nöroligin ailesi), sinapsın yapısındaki nörotransmitter ve iskelet (scaffolding) proteini genleri (*SHANK2* ve *SHANK3*), iyon kanalı proteinleri genleri (*CACNA1A*, *CACNA1H*, *SCN1A*, *SCN2A*) en öne çıkan ve *de novo* mutasyonları OSB’lilerde sıkça rapor edilen genlerdir. Bunlardan başka, nöral ağ/sinyal yolağı ve sinaptik gen transkripsiyonu/translasyonunda (*FMR1*, *TSC1*, *TSC2*, *PTEN*, *NF1*, *CYF1P1*),

protein degradasyonunda (*UBE3A*, *PARK2*, *TRIM33*) ve embriyonik nörogelişim/nörofarklılaşmada fonksiyon yapan genler (*FOXP1*, *KATNAL2*, *ANK3*, *PTEN*) de sıkça *de novo* fonksiyon kaybı mutasyonları gözlenen genler arasındadır. Ancak, ilginç olan bir nokta da tüm bu yüksek düzeyde aday genlerin hiçbirisi esansiyel OSB’li hastaların %1’inden daha fazlasının genetik etiyolojisini açıklayamamaktadır (11, 44, 53, 54, 45–52). Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara topluca bakıldığında ilişkilendirilen genlerin ortak metabolik/nöronal yolaklarda, benzer embriyonik süreçlerde (nöronal gelişim) ve epigenetik mekanizmalarda rol oynadıkları gen zenginleştirme, ortak yolak ve gen ontoloji analizleriyle gösterilebilmektedir (55–61). Sonuç olarak, OSB’nin etiyolojisini en son genetik ve epidemiyolojik araştırma verilerine dayanarak özetleyecek olursak, OSB riskinin epigenetik faktörler de dâhil, büyük oranda (yaklaşık %60) genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (62).

2.2.2.1. OSB ve Genomik DNA Kopya Sayısı Varyasyonları (CNV)

Genomda 1 kb ve daha büyük DNA bölgelerine CNV, bu bölgelerin toplumda normal bireyler arasında farklılık göstermesine de CNV polimorfizmi denmektedir. Normal insan popülasyonuna ait bu polimorfizmlerin sıklığı ve çeşitleri bu alanda yapılan araştırmalardan derlenerek çeşitli veri tabanlarında kayıt altına alınmış ve araştırmacıların kullanımına sunulmuştur (63). Ayrıca, OSB’nin de dahil olduğu birçok kompleks hastalığa yatkınlık sağladığı düşünülen CNV’ler de yine ilgili hastalıklara ait veri bankalarında bulunabilmektedir (64, 65). Bugüne kadar OSB ile ilişkilendirilmiş olan CNV’lere ve ilgili makalelere SFARI veri bankasından ulaşılabilir (66). Buna göre, toplamda 2.290 adet CNV OSB çalışmalarında rapor edilmiştir. Birçok çalışmada tekrarlanan ve dolayısıyla yüksek güvenle patolojiden sorumlu CNV kabul edilenlerin sayısı yaklaşık olarak 40 adettir (67). Özellikle, 15q11-q13 duplikasyonu, 16p11.2 delesyon/duplikasyonu (OSB’lilerin yaklaşık %1’inde) tanımlanmıştır (68) ve 22q11.2 delesyonu OSB’li hastalarda görece sık rapor edilmiş CNV’lerdir. Dolayısıyla OSB’nin genetik etiyolojisinin yaklaşık %5-10 kadarının CNV kaynaklı olduğu düşünülmektedir (69).

2.3. OSB ve Gen-Çevre Etkileşimi

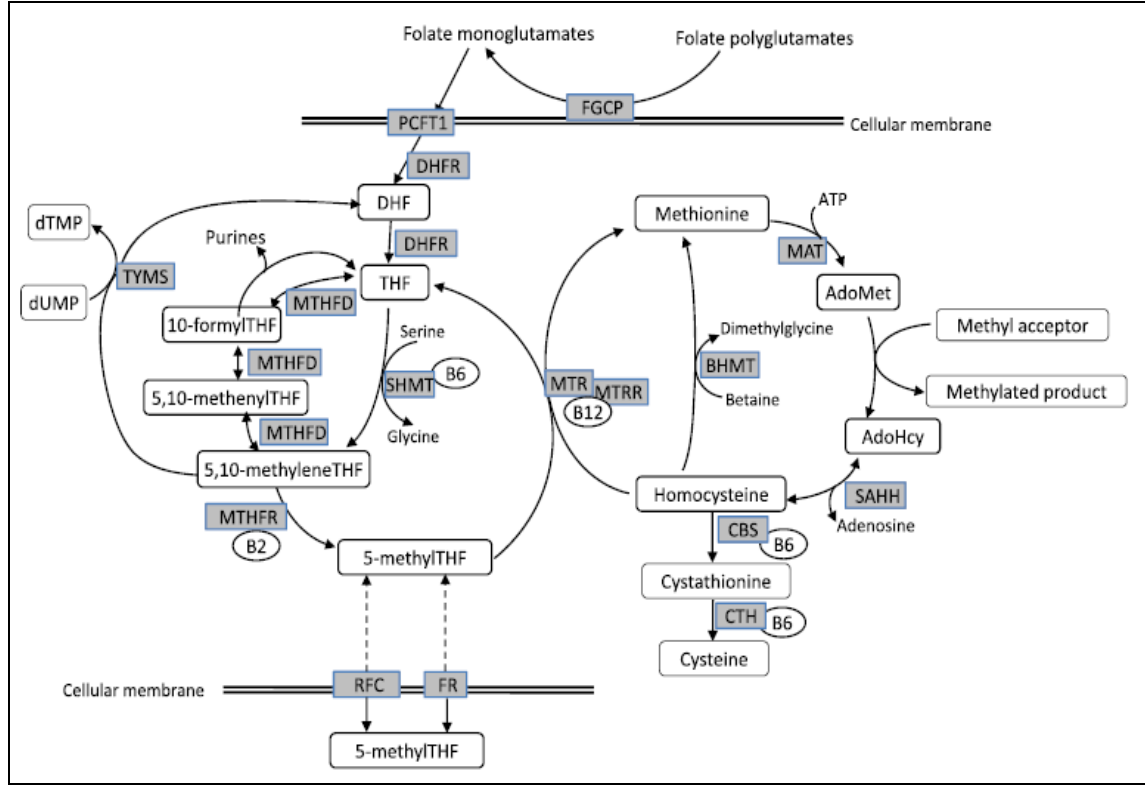
Tek karbon metabolizması (TKM) ve OSB gibi hastalıklarla ilişkisi de uzun zamandır araştırılmaktadır (70–73). TKM birbiri içinde entegre olmuş üç adet yolağı (folat döngüsü, trans-metilasyon döngüsü ve trans-sülfürasyon yalağı) içeren ve özellikle kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörogelişimsel/nörodejeneratif hastalıklarda sıkça araştırılan

önemli bir metabolik reaksiyonlar dizisidir (74). Birçok araştırmada TKM metabolitlerinin OSB'li hastaların serumunda ve beyin-omurilik sıvısında (BOS) kontrollere kıyasla anlamlı derecede farklı olduğu rapor edilmiştir (75–78). Aynı şekilde hücrenin redoks potansiyeli olarak da indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı önemli bir değerdir ve yine OSB'lilerde GSH/GSSG (okside glutatyon) oranının düşük olduğu belirtilmektedir (79). TKM'de fonksiyon yapan enzimleri kodlayan genlerdeki nadir mutasyonlar ve yaygın ($MAF \geq 0.05$) SNP'lerin OSB ile ilişkisi birçok araştırmada incelenmiş ve özellikle *MTHFR* genindeki C677T ve A1298C yaygın zararlı varyantları OSB de dahil birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (40, 75, 80–82).

OSB ile folat siklusunun ve folatın hücre içerisine alınmasının doğrudan ilişkili olduğunu gösteren en önemli kanıt, serebral folat defekti (SFD) denilen ve folat reseptör-alfaya (FR- α) karşı otoantikörlerin geliştiği ve dolayısıyla beyne folat alımının bozulduğu bir otoimmün hastalıkta oldukça net biçimde gösterilmiştir. FR- α beyne folat alımının sağlandığı en önemli transport mekanizmasıdır. Bu hastalıktan müzdarip çocuklarda kan-beyin bariyerinde folatın hücre içerisine veziküllerle alınmasına aracılık eden FR- α 'ya karşı otoantikör oluşumu söz konusudur ve dolayısıyla BOS'a ve beyne folat alımı bozulmuştur (78). SFD'den müzdarip çocuklar doğumda ve erken çocuklukta normal bir nörogelişim göstermekteyken aniden ilerleyici tarzda nörogelişim bozukluğu, epilepsi, uykusuzluk, hırçınlık ve mikrosefalinin eşlik ettiği hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Bu çocukların önemli bir kısmında da nörogelişim bozukluğuna OSB eşlik etmektedir (83–85).

2.4. Folat Döngüsü

Çoğu bakteri, maya ve bitki folatı sentezleyebilse de hayvanlar diyetle folat almak zorundadırlar. Yetişkinlerde, yetersiz folat alımı kansızlığa neden olmaktadır. Yetersiz folat alımı gelişmekte olan fetüslerde, nöral tüp defektleri olarak bilinen ve gebelikte erken dönemlerde nöral tüpün kapanmamasını içeren doğum kusurlarında artışa neden olur. Sonuç olarak hamilelikte yetersiz folat alımına bağlı olarak fetüslerde anensefaliden kısmi bacak felci ve spina bifida'ya kadar değişen spektrumda patolojiler gözlenmiştir (86).



Şekil 1. Folat yolağı ve homosistein metabolizmasına basitleştirilmiş genel bakış. AdoHcy, S-adenozilhomosistein; AdoMet, S-adenozilmetilionin; BHMT, betain-homosistein metiltransferaz; CBS, sistatyonin β -sentaz; CTH, γ -sistatyonaz; DHF, dihidrofolat; FGCP, folil poli- γ -glutamat karboksipeptidaz; FR, folat reseptörü; MAT, metiyonin adenziltransferaz; MTHFD, metilentetrahidrofolat dehidrojenaz; MTHFR, metilentetrahidrofolat redüktaz; MTR, metiyonin sentaz; MTRR, metiyonin sentaz redüktaz; PCFT1, proton-bağılı folat taşıyıcı; RFC, indirgenmiş folat taşıyıcı; SAHH, S-adenozilhomosistein hidrolaz; SHMT, serin hidroksimetiltransferaz; THF, tetrahidrofolat; B2, B2 vitamini; B6, B6 vitamini; B12, B12 vitamini (Hiraoka'dan 87).

Diyet folatları ağırlıklı olarak poliglutamatlar olarak mevcuttur, taşınabilmesi için emilmeden önce monoglutamatlara dönüştürülmesi gerekir (87). Bağırsakta bu dekonjugasyondan sorumlu olan enzim, bağırsak apikal brush borderda bulunur ve glutamat karboksipeptidaz II (*GCPII*) geni tarafından kodlanan folil poli- γ -glutamat karboksipeptidazdır (*FGCP*). Bu gen folat hidrolaz 1 (*FOLH1*) olarak da bilinir (88). Buna karşılık, sentetik folik asit (pteroilmonoglutamik asit (PteGlu)), tek bir glutamat kalıntılarına bağlanmış, tamamen oksitlenmiş bir pteridin halkasına sahiptir.

Pteroilmonoglutamik asit içeren Folat monoglutamatlar duodenumda ve jejunumun üst kısmında yüksek afiniteli proton-bağılı folat taşıyıcı PCFT1 (*SLC46A1*) tarafından emilir (89). Bununla birlikte, PteGlu, folat metabolizmasına girmek için ilave bir adım

olarak önce dihidrofolat (DHF) ve daha sonra aktif form olan 5-metiltetrahidrofolat'a (5-metil-THF) indirgenir. Folat kan dolaşımına girdiğinde, 5-metil-THF folat reseptörü (FR)- α üzerinden hücreye girebildiği için ana formu oluşturur. FR- α , monoglutamat 5-metil-THF'ye yüksek afiniteye sahip (90) bir glikosilfosfatidilinositol-bağlı glikoproteinidir ve ağırlıklı olarak renal proksimal tübüller, uterus ve plasentada ayrıca sınırlı sayıda da epitel hücrede eksprese edilir (91). FR- β ve FR- γ 'nın 5-metil-THF için FR- α 'ya göre afiniteleri daha düşüktür. Ayrıca 5-Metil-THF, taşıyıcı aracılı taşıma yolunu kullanan ve her yerde eksprese edilen indirgenmiş folat taşıyıcısı (RFC) ile hücrelere girebilir. RFC, 5-metil-THF için FR- α 'dan daha düşük bir afiniteye sahiptir. 5-metil-THF hücreye girdikten sonra, Homosistein (Hcy) remetilasyonu için bir metil donör olarak işlev görür (Şekil 1) (87).

Tetrahidrofolat (THF), B6 vitamini bağımlı enzim serin hidroksimetiltransferaz (SHMT) ile 5,10-metilen-THF'ye dönüştürülebilir. THF 5,10-metilen-THF'ye dönüştürülmesi, üç fonksiyonlu enzim metilen-THF dehidrojenaz (MTHFD) ile katalize edilir (92). 10-Formil-THF, pürinlerin sentezi için bir karbon vericisi olarak görev yapabilir. Bir metilen grubu 5,10-Metilen-THF, deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüştürülmesi için bağışlayabilir. Bu reaksiyon timidilat sentaz (TYMS) ile katalize edilir ve DHF redüktaz (DHFR) katalizörlüğünde THF'ye geri indirgenen dihidrofolat (DHF) üretir. Riboflavin (B2 vitamini) bağımlı enzim 5,10-Metilen-THF, metilen-THF redüktaz (MTHFR) ile 5-metil-THF'ye dönüştürülebilir. Bu enzim, Hcy remetilasyonu için mevcut 5-metil-THF'nin düzenlenmesi için kritiktir. Homosistein remetilasyonu, metiyonin sentaz (MTR) katalizörlüğünde bir metil grubunun 5-metil-THF'den Hcy'ye bağışını içerir, bu da metiyonin ve THF oluşumuna yol açar (Şekil 1) (87).

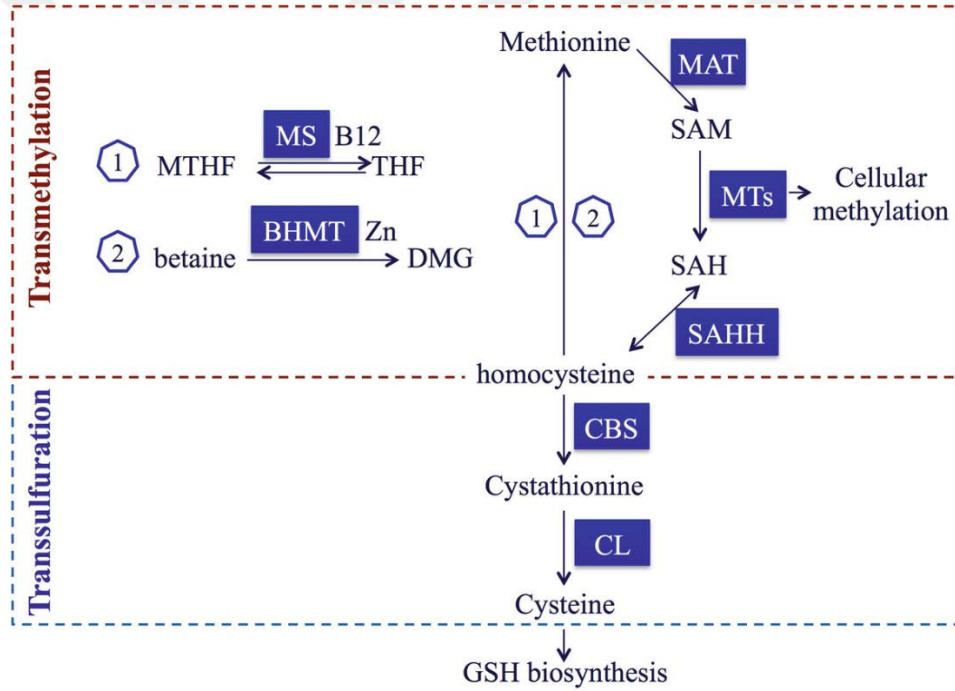
2.5. Metiyonin Döngüsü

Metiyonin, metiyonin adenosiltransferaz (MAT) etkisiyle, başlıca biyolojik metil donörü olan S-adenozilmetiyonini (SAM) oluşturur. S-adenozilmetiyonin daha sonra çeşitli metiltransferazların (MTs) kataliziyle S-adenosilhomosistein'e (SAH) dönüştürülür. Metiltransferazlar, metilasyona uğrayacak moleküllere (DNA, RNA ve protein vb.) metil grubu transfer eder. S-adenosilhomosistein hidrolazın (SAHH) katalizörlüğünde SAH'ın hidrolizinden homosistein üretilir (93).

Metiyonin döngüsünde, metiyonin, iki remetilasyon yolundan biri ile homosisteinden yeniden üretilebilir. Birinci yol, metiyonin sentaz (MS) enzimi kofaktör olarak B12

vitamini kullanarak bir metil grubunun 5-metiltetrahidrofolattan (MTHF) homosisteine transferini katalize ederek metiyonin ve tetrahidrofolat (THF) oluşur. İkinci yol, betainden metil grubunun çinko (Zn) bağımlı enzim, betain homosistein metil transferaz (BHMT) tarafından katalize edilerek homosisteine transferidir.

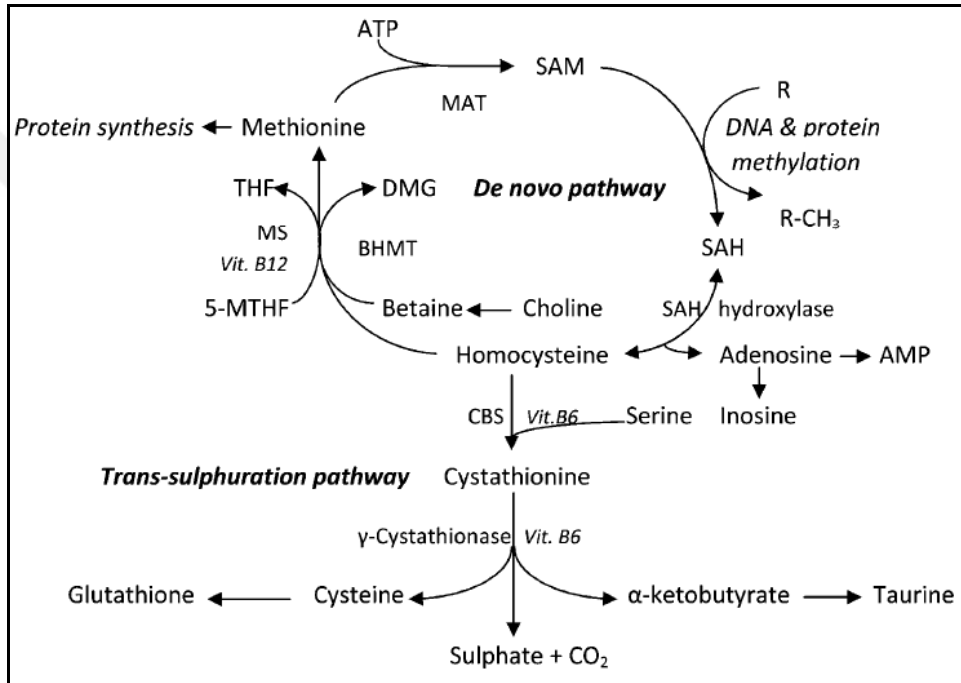
Tek karbon metabolizmasının başka bir birimi karaciğerde gerçekleşen transmetilasyon döngüsünü (metiyonin döngüsü) glutatyon (GSH) biyosentezine bağlayan transsülfürasyon yoludur. Transsülfürasyon yolu, homosisteinin, sistatyonin-β-sentaz enzimi (CBS) tarafından geri dönüşümsüz olarak sistatyonine dönüştürülmesi ile başlar. Sistatyonin ayrıca sistatyonin-γ-liyaz (CL) ile sisteine dönüştürülür. Sistein daha sonra GSH biyosentezini besler (Şekil 2) (93).



Şekil 2. Hücresel transmetilasyon-transsülfürasyon yollarında majör enzimler ve ara ürünleri. Kısaltmalar: Glutatyon (GSH), S-adenozilmetiyonin (SAM), Metiyonin adenziltransferaz (MAT), S-adenozilhomosistein (SAH), Metiltransferazlar (MT), SAH hidrolaz (SAHH), 5-metiltetrahidrofolat (MTHF), Tetrahidrofolat (THF), B12 vitamini (B12), çinko bağımlı enzim (Zn), Betain homosistein metil transferaz (BHMT), Sistatyonin-β-sentaz (CBS), Sistatyonin-γ-liyaz (CL) (Chen'den, 93).

Karaciğerde GSH sentezi için kullanılan sisteinin yaklaşık %50'si transsülfürasyon yolundaki metiyoninden türetilir (94). TKM'nin işlevsel önemi, hücresel metilasyon ve hücrel redoks homeostazının sürdürülmesidir. Ara ürün SAM, epigenetik gen

regülasyonu, protein stabilitesi, fosfolipid ve nörotransmitter üretimine katılan birincil metil donörü olarak görev yapar (93). Transsülfürasyon yolağının enzimlerindeki eksiklikler; proinflatuar moleküllerin makrofaj sentezine, ROS (reactive oxygen species) oluşumuna ve homosistein birikimine yol açabilir. Bu da ateroskleroz ve tümör gelişimi gibi patolojilere sebep olabilir (95). TKM birçok kanserde, kardiyovasküler hastalıkta ve nörogelişimsel bozuklukta (özellikle nöral tüp defekti) oldukça sık çalışılmıştır (74, 96).

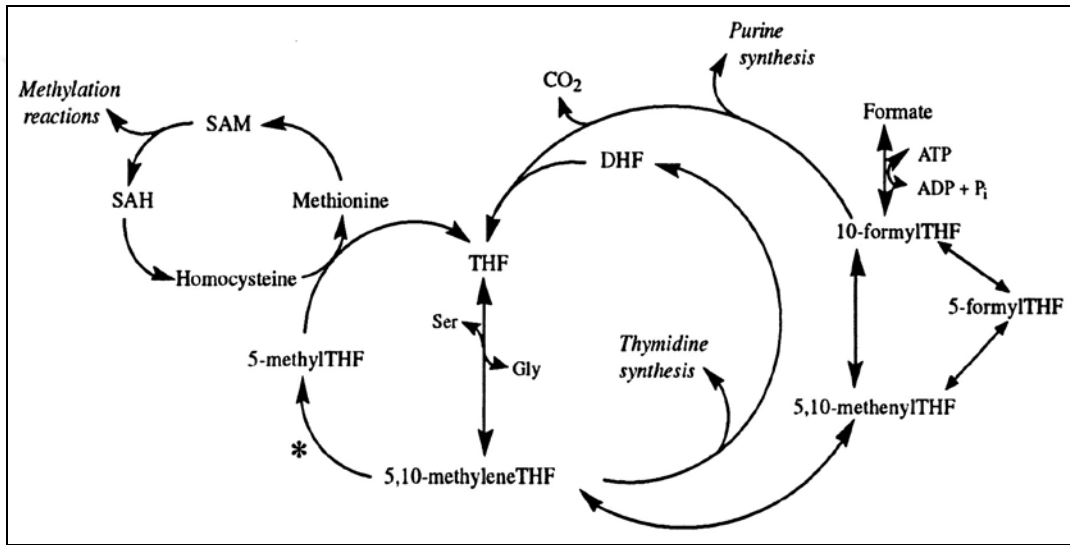


Şekil 3. Metiyonin döngüsü ve trans sülfürasyon yolu. S-adenozil-metiyonin (SAM); S-adenozilhomosisteine (SAH); tetrahidrofolat (THF); 5 metil-tetrahidrofolat (5-MTHF); DNA veya protein (R); metillenmiş DNA veya protein (R-CH₃); metiyonin adenzin transferaz (MAT); metiyonin sentaz (MS); betain homosistein metiltransferaz (BHMT); sistasyon B sentaz (CBS); dimetilglisin (DMG); B-6 vitamini (Vit. B6); B-12 vitamini (Vit. B12) (Main'den, 97).

Otizm Spektrum Bozukluğu hastası birçok kişide yetersiz folat-metiyonin yolu tanımlanmıştır (97). Folat-metiyonin yolu DNA sentezi (98), DNA metilasyonu (99) ve hücrel redoks dengesi (100) için çok önemlidir. Şekil 3'te gösterildiği gibi, esansiyel bir amino asit olan metiyonin SAM'a dönüştürülür. Vücudun ana metil grup donörü olan SAM metilasyon reaksiyonları sırasında SAH'a dönüştürülür. Böylece plazmadaki SAM/SAH oranı, metilasyon seviyesini gösterir. SAH daha sonra geri dönüşümlü olarak homosisteine hidrolize olurken aynı zamanda adenzin açığa çıkar (97).

2.6. MTHFR Geni

İnsan *MTHFR* geni (NM_005957) 1. kromozom üzerinde 1p36.3 bölgesinde lokalizedir ve MTHFR enzimini kodlamaktadır (101). MTHFR enzimi folat metabolizmasında fonksiyon yapan enzimlerden biridir ve 5,10-metilentetrahidrofolatın (5,10-methyleneTHF) 5-metiltetrahidrofolata (5-methylTHF) dönüşümünü katalizler (Şekil 4) (102). 5-methylTHF, folik asitin dolaşımında kullanılan formudur ve reaksiyonlarda metil grubu vericisi olarak fonksiyon yapar. Bu reaksiyonlar arasında nükleotid sentezi, Hcy'nin metiyonine remetilasyonu, SAM sentezi ve DNA metilasyonu yer almaktadır (74).



Şekil 4. İnsanlardaki folat metabolik yolağı. MTHFR ile katalizlenen enzimatik reaksiyon, * ile gösterilmiştir. S-adenozilmetiyonin (SAM), S-adenozilhomosisteine (SAH) (Bagley'den, 103).

Otozomal resesif kalıtılan ve perinatal ölüm, gelişme geriliği, ağır mental retardasyon, nöral tüp defekti gibi fenotiplere neden olan ve nadir görülen (prevalansı bilinmemektedir) metilentetrahidrofolat redüktaz defektinde *MTHFR* geninin nadir zararlı mutasyonları rol oynamaktadır (OMIM:236250). Bu nadir varyantlar dışında oldukça sık görülen iki varyant C677T (rs1801133) ve A1298C (rs1801131) enzimin aktivitesini en fazla etkileyen değişimlerdir. C677T varyantının enzimin aktivitesinde homozigotlarda yaklaşık %70, heterozigotlarda yaklaşık %35 azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (104). C677T varyantı *MTHFR* geni 4. ekzonu üzerinde 677. nükleotit C'nin T'ye değişmesi sonucunda ortaya çıkan tek nükleotitlik bir değişimdir. Bu missens mutasyon

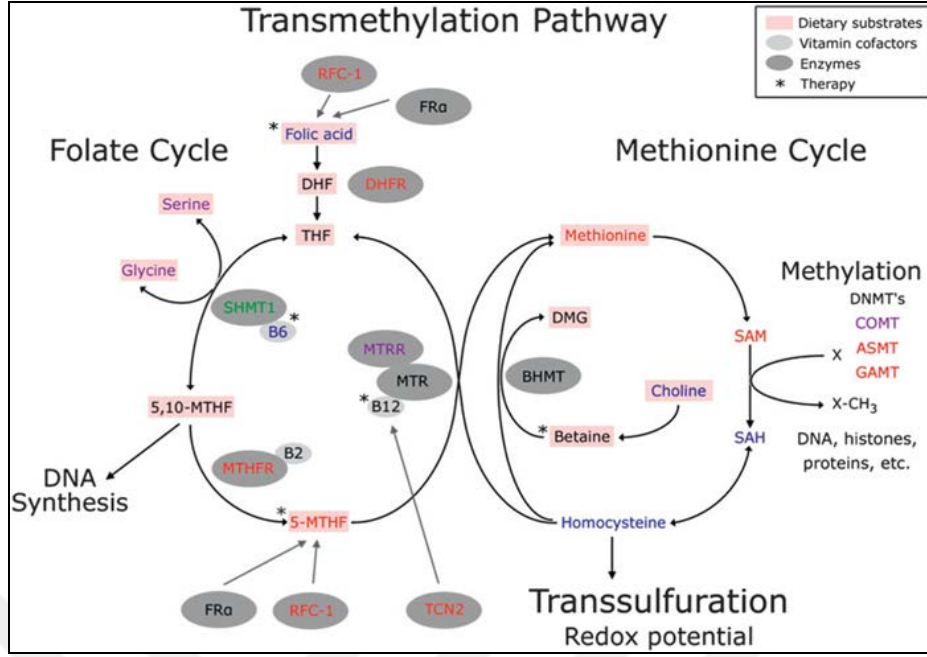
genin ürünü olan proteinin 222. pozisyonundaki alanin aminoasitinin valin'e değişimine (A222V) sebep olur (105–107).

C677T varyantının minör allel frekansı (MAF) = 0,24-0,30 aralığında verilmektedir (96). Aynı şekilde A1298C varyantının minör allel frekansı da 0,25-0,29 aralığındadır ve ilgili varyantın da enzim aktivitesini homozigotlarda yaklaşık %60 düşürdüğü rapor edilmektedir (108).

Her iki yaygın varyantın da azalmış enzim aktivitesine neden olduğu belirtilmesine rağmen, özellikle C677T varyantı, serumda artmış Hcy düzeyleriyle ilişkilendirilmiştir (109). *MTHFR* genindeki ilgili varyant kaynaklı azalmış enzim aktivitesinden dolayı 5-metil-THF'in yetersiz sentezlenmesinin serumda Hcy konsantrasyonu artışına neden olduğu düşünülmektedir. 5-metil-THF'in yetersiz sentezlenmesi Hcy'nin metiyonine remetilasyonunu ve dolayısıyla da SAM sentezini etkilemektedir (Şekil 5). SAM, metilasyon reaksiyonlarında kullanılan ana kofaktördür ve reaksiyon sonunda SAH'a dönüşür (29, 110). OSB'li hastalarda düşük SAM/SAH oranı ve DNA metilasyon bozuklukları sıklıkla rapor edilmektedir (111–113).

MTHFR C677T varyantı ile OSB riski arasındaki ilişki hala tartışmalıdır. Bunun sebebi olarak birçok etnik grupta yapılan araştırma sonuçlarındaki tutarsızlıklar gösterilmektedir. Örneğin *MTHFR* C677T varyantının Çin Han popülasyonunda OSB için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (114). Yine Kore popülasyonunda *MTHFR* C677T ve A1298C varyantları ile OSB arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir (115). Aksine Romanya ve Brezilya popülasyonlarında yapılan çalışmalarda (75). Kontrol grubu ve OSB arasında *MTHFR* C677T varyantında allel ve genotip dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadığı gösterilmiştir (116). Yine ülkemizde yapılan bir araştırmada OSB ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülememiştir (117).

Farklı ülkelerde yapılan toplam 13 farklı çalışmanın meta-analizinin sonuçları *MTHFR* C677T varyantının, Asya ve Kafkas popülasyonlarının yanı sıra tüm popülasyonlarda OSB için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (118).

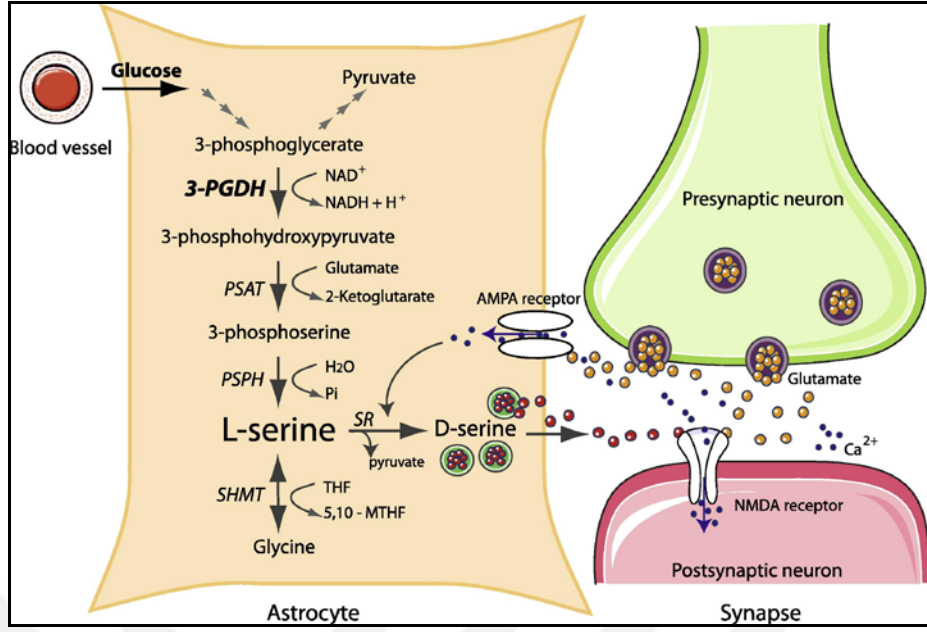


Şekil 5. Tek karbon metabolizmasında folat ve metiyonin döngüsü. Şekilde TKM'ye katılan önemli substratların, kofaktörlerin ve enzimlerin birçoğu gösterilmiştir. Şekilde bu yolakta bir şekilde OSB ile ilişkilendirilmiş ve metabolit konsantrasyonları sıklıkla düşük olanlar kırmızı renkte, sıklıkla yükselenler mavi renkte, metabolit konsantrasyonları bazı çalışmalarda düşük bazılarında yüksek olmak üzere değişkenlik gösterenler ise mor renkte gösterilmiştir (Schaevitz'den, 70).

2.7. L-Serin metabolizması

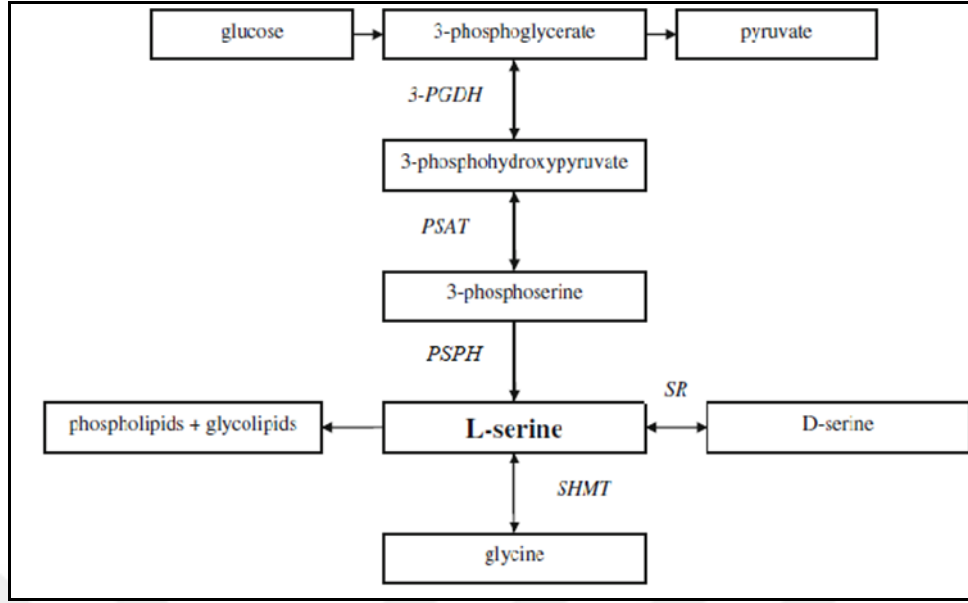
Tek karbon metabolizmasının (TKM) önemli diğer bir metaboliti de L-serindir. TKM'de, tek karbon (metilen grubu) vericisi olarak fonksiyon yapar. L-serinin metilen grubu metiyonin döngüsüne aktarılarak L-serin glisine dönüştürülür ve bu reaksiyonu SHMT1 (serin hidroksimetil transferaz-1) enzimi katalizler. Metiyonin, folat döngüsünden elde edilen tek karbon atomu (5-metiltetrahidrofolat) kullanılarak metiyonin sentaz (MS) enzimi katalizörlüğünde Hcy'den sentezlenir (119) (Şekil 2). Protein sentezindeki rolünün yanı sıra, L-serin; fosfatidilserin, sfingomiyelin, glisin ve D-serin olmak üzere birçok önemli bileşiğin öncüsüdür (Şekil 7).

Ayrıca, L-serinin kültüre edilmiş nöronlarda sağ kalım, büyüme, farklılaşma, dendritik uzama ve sinaptogenezisi destekleyen güçlü bir nöronal besleyici faktör olarak işlev gördüğü belirtilmektedir (120).



Şekil 6. Nörogeleşimde rol oynayan L-serinin merkezi sinir sisteminde astrositlerdeki üretimi ve dönüştüğü metabolitler (Tabatabaie'den, 121).

L-serin çeşitli yollarla sentezlenmektedir. Bunlar; intrasellüler proteinlerin degradasyonu, besinlerle alınan proteinlerin hidrolizi, fosfolipit döngüsü, glisinden SHMT1/2 enzimi katalizi ve glikolizde 3-fosfoglisierattan *de novo* şekilde üretilmesi olarak belirtilmektedir (122). L-serin, üç adımda glikolitik ara madde 3-fosfoglisierattan *de novo* olarak sentezlenir (Şekil 7). Birinci adım, 3-fosfoglisieratın 3-fosfohidroksipiruvata dönüşümüdür. Bu dönüşümü *PHGDH* geni tarafından kodlanan fosfoglisierat dehidrojenaz (PGDH) enzimi katalizler. İkinci adım, 3-fosfohidroksipiruvatin 3-fosfoserine dönüşümüdür. Bu dönüşümü *PSAT1* geni tarafından kodlanan fosfoserin aminotransferaz (PSAT) enzimi katalizler. Son adım olarak 3-fosfoserinin L-serine dönüşümüdür. Bu dönüşümü *PSPH* geni tarafından kodlanan fosfoserin fosfataz (PSPH) enzimi gerçekleştirir. Bu son adım reaksiyonu *de novo* L-serin sentezinin allosterik olarak kontrol edildiği geri dönüşümsüz bir reaksiyon basamağıdır (123, 124) (Şekil 7).



Şekil 7. L-serin sentez yolları. 3-PGDH:3-fosfogliseratdehidrogenaz, PSAT: fosfoserinaminotransferaz, PSPH: fosfoserin fosfataz, SR: serin rasemaz, SHMT: serin hidroksimetiltransferaz (Crabben'den, 123).

L-serin çeşitli alternatif yollardan elde edilebilmesine rağmen *de novo* biyosentez yolu, memelilerde beynin embriyonik gelişiminde L-serinin ana kaynağıdır. Çünkü, bu alternatif kaynaklar serin biyosentezi yolunda meydana gelen kusurları telafi etmek için yeterli değildirler. Serin biyosentezindeki kusurlar, L-serinin sinir sisteminin yapısı ve işlevinde hayati rolünü yansıtır şekilde nörolojik bir grup konjenital hastalığa neden olur. Bunlar; her ikisi de otozomal resesif kalıtılan Neu-Laxova sendromu (OMİM #256520) ve fosfogliserat dehidrojenaz defekti (PGDHD) (OMİM #601815) hastalıklarıdır. Serin biyosentez kusurları, serin biyosentezinde yer alan 3-PGDH, PSAT ve PSPH enzimlerinden herhangi birinin eksikliğinden kaynaklanır ve en ağır fenotip Neu-Laxova sendromu (multipl konjenital anomali) ile ağır fenotipik bulguların yanında zeka geriliği ile de seyredabilen PGDHD gelmektedir (125).

PHGDH heterozigot mutant farelerin bariz gelişimsel anormallikler olmadan canlı ve verimli olmalarına karşın, knock-out edildiği homozigot mutant farelerin ağır nörogelişimsel fenotipler gösterdiği ve embriyonik olarak lethal olduğu gösterilmiştir (126). *PHGDH* geninin tam inaktive olduğu iki Neu-Laxova sendromlu fetüsün ağır konjenital malformasyonlar gösterdiği, sezeryan ile alındığı ve birinin 5 hafta diğerinin ise 5 ay sonra öldüğü, yapılan otopsi raporlarıyla yayımlanmıştır (127). *PHGDH*'ın nörogelişimdeki fonksiyonlarını fareler ölmeden araştırmak için, ilgili genin beyinde

koşullu knock-out edildiği modeller üretilmiştir. Farelerde yapılan koşullu inaktivasyonun yavru farelerde hafif mikrosefaliye neden olduğu, normal farelere oranla daha küçük hipokampüse sahip ve farelerin beyin-omurilik sıvısında yapılan metabolik ölçümlerde D-serin ve L-glisin seviyesinin anlamlı şekilde azaldığını rapor edilmiştir (128). Bir diğer önemli husus da fetal dönemde kan-beyin bariyerinin L-serin ve L-glisin amino asitlerine geçirgen olmaması, nöron hücrelerinde fosforile L-serin yolağı genleri (enzimleri) ifade edilmediği için (129) astrositler tarafından nöronlara L-serinin sağlanması gerekliliğidir (Şekil 6). Dolayısıyla L-serin biyosentezinin fetal dönemde nörogelişimdeki önemini araştırmalar ortaya koymuştur.

Yürütölmekte olan bir TÜBİTAK projesi (116S301) kapsamında dengeli kromozomal translokasyon taşıyıcısı olan OT_49 nolu aileye, tüm genom DNA dizi analizi (trio analizi) gerçekleştirildi. İlgili çalışmada OSB hastası çocukta *MTHFR* C677T varyantı homozigot ve *PHGDH* geninin bir kopyasında da translokasyondan dolayı kırık tespit edildi. Hasta çocuğun genetik etiyolojisini açıklayacak başka bir zararlı DNA varyantı ya da genomik kopya sayısı değışikliğı (CNV) bulunamadı. Dolayısıyla çocuğun OSB fenotipinden sorumlu olabilecek genetik varyasyonun *PHGDH* geninde görölen heterozigot kayıp ve *MTHFR* C677T homozigot varyasyonunun kombine etkisi olabileceğı şeklinde değerdendirildi. Diğer OSB hastalarında da aynı ya da benzer genetik etiyolojinin olup olmadığını da bu çalışma kapsamında araştırmaya karar verildi. Bu tez çalışmasının amacı *MTHFR* C677T varyantını homozigot veya heterozigot taşıyan OSB hastalarında *PHGDH* ve *PSPH* genleri üzerindeki yaygın ya da nadir DNA varyantlarının OSB'nin genetik etiyolojisinde bir rolünün olup olmadığını araştırmaktır. Bu genlerin ürünü olan enzimlerin katalizlediğı reaksiyon ürünlerinin TKM'de birlikte fonksiyon yapmaları (L-serin ve folat siklusu) (Şekil 5) böyle bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir. Literatürlerde bu konu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. *PHGDH* ve *PSPH* genlerini seçme nedenimiz de bu iki genin ürünü olan enzimlerin *de novo* L-serin sentezi yolağında, sırasıyla ilk ve son basamakta yer almasıdır (Şekil 6 ve 7).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilecek Aile Bireylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı arasındaki işbirliği ile hazırlanan 1061'nolu Otizm Spektrum Bozukluğunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması adlı proje kapsamında Otizm Spektrum Bozukluğu hastaları ve aile bireylerinden oluşturulan DNA bankası kullanıldı. İlgili çalışmada, 13 farklı ilden Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Çocuk-Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvurarak, DSM-IV tanı kriterlerine göre OSB tanısı almış 222 birey yer almaktadır. Ayırıcı tanı için hastalara nörolojik muayene ve işitme testleri de yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen bütün bireylerden Onam Formu alınmıştır. Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Dosya No: 2016/24). Bu çalışmaya 222 OSB'li birey ile kendi ve ailesinde nörolojik hastalık öyküsü olmayan 323 kontrol grubu dahil edilmiştir.

3.1.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

MTHFR C677T varyantının OSB hastaları ve kontrol grubundaki allel ve genotip dağılımlarının istatistiksel olarak araştırılmasında 222 OSB hastası ve ailesinde herhangi bir nörogelişimsel hastalık öyküsü bulunmayan 323 kontrol grubu kullanılmıştır. *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot olarak taşıyan OSB ve kontrol grubunda *PHGDH* ve *PSPH* genleri üzerindeki nadir varyantların araştırılmasında da 121 OSB'li birey ve kontrol grubu olarak da 323 kontrol grubu içinden *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot olarak taşıdığını PCR/RFLP ile tespit ettiğimiz 125 birey kullanılmıştır. Hasta ve kontrollerin aynı etnik yapıdan olmalarına dikkat edildi. Çalışmaya dahil edilen 121 OSB'li hastanın 20'si *MTHFR* C677T varyantını homozigot olarak, kalan 101 hasta ise heterozigot olarak taşımaktadır.

3.1.3. Kimyasallar

Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
SeaKem® LE agaroz	Lonza, 50004L
Etidyum bromür ($C_{12}H_{20}N_3Br$)	Sigma, E-7637
Orange G	Sigma, O-1625

Gliserol	Amresco, 0854
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Mey, Türkiye
Deoksinukleotid triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
GoTaq® Flexi DNA polimeraz	Promega, M8305
Oligonucleotid primer	Macrogen, Güney Kore
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Sephdex®G-50	Sigma, S5897-25G
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Tris-baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	AppliChem, A2264.1000
GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder	Thermo, SM0322

3.1.4. Kitler

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macharey-Nagel, 740609.50
BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Nimagen, BRD3-100
3130 POP-7™ Polymer	Applied Biosystems, 4352759
Taq I, recombinant	NEB, R0149S
LongAmp Taq DNA Polymerase	NEB, M0323S

3.1.5. Cihazlar

Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	Consort E833, Belçika
Yüksek devirli santrifüj (2 adet)	Eppendorf 5810, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
UV translüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
pH metre	Hanna, Portekiz
Gel Logic 2000 jel görüntüleme sistemi	Kodak, ABD
Termal yazıcı	Sony UP-D897, Japonya
Otomatik pipet seti	Pipetman, Fransa
Hassas terazi	Ohaus, ABD
Buz makinesi	Scotmann, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD 554, Türkiye

Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Derin dondurucu (-20)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-86)	Thermo, ABD
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Termocycler	GeneAmp 9700, ABI, ABD
Termocycler	Techne Genius, İngiltere
3130 Genetik analiz cihazı	ABI, Japonya
Termomikser (ısıtıcı blok)	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Nanodrop® 2000 UV-Vis spektrofotometre	Thermo, ABD

3.1.6. Sarf Malzemeler

200 µl sarı pipet uçları	Axygen, T-200-Y
1000 µl mavi pipet uçları	Axygen, T-1000-B
1,5 µl mikrosantrifüj tüpleri	Nest, NST615001
96 x 0.2 ml plate	Bioplastics, B70501
Optical Tear-off 8-Cap Strip	Bioplastics, BPB57651
Termal yazıcı kağıdı	Sony, UPP 110 HG

3.1.7. Solüsyonlar

Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1 M Na₂EDTA Solüsyonu Hazırlanışı

37.2 g Na₂EDTA.2H₂O 80 ml deiyonize suda çözüldü. NaOH ile pH 8.5 olacak şekilde ayarlandı ve son hacim 100 ml olacak şekilde üzerine deiyonize su eklendi. Böylece 1 M 100 ml Na₂EDTA solüsyon elde edildi.

50X TAE Elektroforez Tamponu (pH 8.5)

800 ml deiyonize su behere koyuldu. Üzerine 242 g Tris base ve 57.1 ml glasiyel asetik asit eklendi ve çözülene kadar karıştırıldı. Üzerine 1 M 100 ml Na₂EDTA solüsyonu eklendi. Son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1X çalışma solüsyonu için 50X stok solüsyondan 20 ml alınarak deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Etidyum Bromür Solüsyonu

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Karanlıkta muhafaza edildi.

Yükleme Tamponu

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

100 mg Orange G 15 ml gliserol içerisinde çözülerek son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA Konsantrasyonlarının Ölçümü ve Çalışma Solüsyonlarının Ayarlanması

Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı DNA Bankasından alınan örneklerden çalışma solüsyonu hazırlamak için stok genomik DNA'lar 2 gün oda sıcaklığında bekletildi. Stok genomik DNA'lardan 20 µl alınarak 80 µl enjeksiyonluk su ile seyreltildi ve karışım oda sıcaklığında 1 gün bekletildi. Seyreltilen genomik DNA örneklerinden 1 µl alınarak Nanodrop® 2000 UV-Vis spektrofotometre'de DNA konsantrasyonları ve absorbans değerleri ölçüldü. Konsantrasyonları belirlenen sulandırılmış stok genomik DNA'lardan 25 ng konsantrasyonda çalışma solüsyonları hazırlandı.

3.2.2. DNA Varyasyon Analizi

3.2.3. PHGDH ve PSPH Genleri Üzerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

MTHFR C677T varyantını homozigot/heterozigot olarak taşıyan OSB'li bireylerde *PHGDH* (NM_006623.3) ve *PSPH* (NM_004577.4) genleri üzerinde nadir veya yaygın DNA varyantları taraması için PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. *PHGDH* üzerindeki olası patolojik varyantlar hizmet alımı yöntemiyle hedefli yeni nesil DNA dizileme yöntemiyle İntergen firmasında gerçekleştirildi. Patolojik olduğu düşünülen DNA varyantlarının Sanger dizilemeyle doğrulanması ve anne-babanın ilgili varyantları taşıyıp taşımadığının tespiti Anabilim dalımızda yapıldı. *PSPH* geni nadir ve yaygın DNA varyantlarının analizi ise tamamı bölümümüzde Sanger dizilemeyle gerçekleştirilmiştir. *MTHFR* C677T varyantını homozigot olarak taşıyan 20 OSB hastasında *PSPH* geninin tüm kodlayan ekzonları dizilendi. *MTHFR* C677T varyantını heterozigot olarak taşıyan 101 OSB hastasında *PSPH* geninde en sık gözlenen 7 yaygın missens varyantın üzerinde bulunduğu

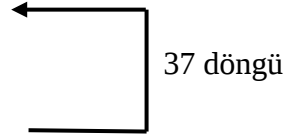
4. ve 5. ekzonları dizilendi. Her bir PCR ve dizileme reaksiyonu için gerekli primerler *Primer3* programı kullanılarak hazırlandı (Tablo 1) (130).

PSPH geninin her bir ekzonunun amplifikasyonu için PCR işlemi 25 µl son hacimde gerçekleştirildi ve bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	0.7 µl
Pr F (10 pmol/µl)	1 µl
Pr R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl)	0.1 µl
Kalıp DNA (25 ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	13.7 µl
Toplam	25 µl

PCR işlemi Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

<u>PCR Koşulları</u>	
94°C 5'	Başlangıç denatürasyonu
94°C 30"	Denatürasyon
58°C 30"	Bağlanma
72°C 30"	Uzama
72°C 7'	Son uzama
10°C ∞	Bekleme



3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Ürünlerinin Temizlenmesi

Elde edilen PCR ürünlerinin 2 µl'si, 3 µl yükleme tamponu ve 5 µl dH₂O ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 voltta 40 dakika yürütüldü. Jel görüntüleme sisteminde PCR ürünlerinin kantitasyonu sağlandı. Kaliteli PCR ürünleri NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kiti ile üretici firmanın önerdiği protokole göre temizlendi.

1. 23 µl PCR ürünlerinin üzerine 75 µl Binding Buffer NTI (DNA bağlayıcı tampon) ilave edildi.
2. PCR ürünü + Buffer NTI karışımı 2 ml'lik toplama tüpü üzerindeki NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column tüplerine aktarılarak, 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
3. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı.
4. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column tüplerindeki membran üzerine 700 µl Wash Buffer NT3 (yıkama tamponu) eklenerek 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırılıp aynı işlem tekrarlandı.
6. İkinci kez toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüpler bu kez bir şey eklenmeden 180 derece ters çevirilip santrifüje yerleştirilerek 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek Wash Buffer NT3'ün membrandan tamamen uzaklaşması sağlandı.
7. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column tüpleri 1.5 ml'lik mikro hacimli kapaklı tüplerin üzerine alınarak 10 dakika alkolün uzaklaştırılması için 65°C deki etüve Elution Buffer NE eklenerek koyuldu.
8. Etüvden çıkartıldıktan sonra membranların tam ortasına emdirilecek şekilde üzerine PCR ürünlerinin konsantrasyonlarına göre 15-30 µl Elution Buffer NE eklendi ve 3 dakika bekletildikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Mikro hacimli kapaklı tüplere toplanan temizlenmiş ürünümüzdür. Elde edilen bu ürünlerinin 2 µl'si, 3 µl yükleme tamponu ve 5 µl dH₂O ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 voltta 50 dakika yürütüldü. Jel görüntüleme sisteminde dizileme reaksiyonu için kaç µl kalıp kullanacağının kantitasyonu sağlandı.

3.2.5. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

Temizlenen PCR ürünleri, her bir bandındaki DNA miktarı bilinen markır (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) referans olarak kullanılarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Böylece her bir dizileme reaksiyonunda kullanılacak kalıp PCR ürününün miktarı belirlendi. Döngüsel dizileme reaksiyonunda her bir ekzonun iki yönlü okuma sağlanması için, ekzonun amplifikasyonunda kullanılan primer çiftleri kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. *PSPH* geninin amplifikasyonu ve döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR Ürünü (bp)
PSPH_Ex4_F	TTAGATTGGCTTAGTAGGCAAG	319
PSPH_Ex4_R	GGTCTAGCACTTCATCCAAAAC	
PSPH_Ex5_F	TCTCCTAGTAGCAAAGCCTGTC	362
PSPH_Ex5_R	GGAATAGTTAGATGCTCTTGGG	
PSPH_Ex 6F1	TGTATTACTCAGTGTTGGGTATTTTG	381
PSPH_Ex 6R1_2	GTGACTGTTCAAGTTGCATTCCAAAGA	
PSPH_Ex7_F	TATCATCTATGCAGAAAGCTGG	375
PSPH_Ex7_R	GCGGATATTGCAGTAAGCTG	
PSPH_Ex8_F	GTGAGTGGAGATTGTGTCACTG	316
PSPH_Ex8_R	AGCAAGTTGTAATAGGCAACTG	

Tablo 2. *PHGDH* geninin amplifikasyonu ve döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	PCR Ürünü (bp)
PHGDH_EX2F	TTGGTGTGTTAGAGGCACAGTC	486
PHGDH_EX2R	CCAATGGACTCAGCTTTCTCTC	
PHGDH_EX12F	AGACCATCATCCGCTCATTG	490
PHGDH_EX12R	CGCTTTAGGATAATGACCACAC	

Döngüsel dizileme reaksiyonu BrilliantDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti kullanılarak yapıldı. Bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

Reaksiyon Karışımı

	<u>1X</u>
BrilliantDye	0.75 µl
5X Buffer	1,625 µl
Primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
Temizlenmiş PCR ürünü	2 µl
dH ₂ O	2.25 µl
Toplam	10 µl

Döngüsel dizileme reaksiyonu Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

Reaksiyon Koşulları

96°C 45''	Başlangıç denatürasyonu	
94°C 10''	Denatürasyon	28 döngü
50°C 5''	Bağlanma	
60°C 2'	Uzama	
10°C ∞	Bekleme	

Döngüsel dizileme reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 ile aşağıdaki temizleme protokolü kullanılarak saflaştırıldı;

1. 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 13 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve çalışmaya başlamadan önce en az 30 dakika +4°C'de bekletildi.
2. Kolon tüpler 2 ml'lik toplama tüpleri üzerine alındı.
3. Kolon tüplere 600 µl Sephadex®G-50 eklendi ve 800 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
4. Toplama tüpleri temizlenmek üzere 0,1 N HCl solüsyonuna atıldı ve kolon tüpler 1.5 ml'lik mikro hacimli kapaklı tüplerin üzerine alındı.
5. Döngüsel dizileme reaksiyonu ile çoğaltılan PCR ürünleri kolon tüpteki Sephadex®G-50 üzerine dikkatlice eklenerek 750 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Saflaştırılan PCR ürünleri 96 kuyulu platelere transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Dizileme sonuçları Chromas 2.32 ve SeqScape® software v2.5 programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler gen bankasından (131) alınan referans *PSPH* dizisi (RefSeq: NM_004577) ile karşılaştırıldı.

3.2.6. *MTHFR* C677T Polimorfizmini Saptamak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP)

Kontrol grubunu oluşturmak için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı DNA bankasından kendisinde veya ailesinde herhangi bir nörogelişimsel hastalığı (OSB, Şizofreni, Bipolar bozukluk, vb) bulunmayan 323 örnek seçildi ve aralarından *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot taşıyan bireylerin belirlenmesi için PCR-RFLP reaksiyonu kullanıldı. Buna göre; *MTHFR* geni referans DNA dizisi (NM_005957) UCSC veri bankasından indirilerek ilgili C677T varyasyonunun yeri belirlendi. Bu varyasyonun olup

olmamasına göre farklı kesim paterni yapan enzimler tarandı ve *TaqI* enziminin kullanılabileceği görüldü. Bu varyantın tespiti için dizayn edilen primer çiftinden (Tablo 3) elde edilen 388 bp'lik PCR ürünü eğer varyantı taşıyorsa (C>T) 155.pozisyonda enzimin kesim bölgesi oluşmaktaydı (T'CGA). İlgili varyantın belirlenmesi için kurulan PCR koşulları;

PCR Karışımı

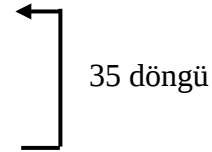
1X

5X PCR Tamponu (Promega)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	0.7 µl
Pr F (10 pmol/µl)	1 µl
Pr R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)	0.1 µl
Kalıp DNA (25 ng/µl)	2 µl
dH ₂ O	13.7 µl
Toplam	25 µl

PCR işlemi Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

94°C 5'	Başlangıç denatürasyonu
94°C 30"	Denatürasyon
59°C 30"	Bağlanma
72°C 1'	Uzama
72°C 7'	Son uzama
10°C ∞	Bekleme



Elde edilen PCR ürünlerinin 2 µl'si, 3 µl yükleme tamponu ve 5 µl dH₂O ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 voltta 40 dakika yürütüldü. Jel görüntüleme sisteminde beklenen PCR ürünleri gözlemlendikten sonra aşağıdaki koşullarda RFLP reaksiyonu kuruldu.

<u>RFLP Reaksiyon Karışımı</u>	<u>1X</u>
PCR product	10 µl
TaqI (NEB®)	0.4 µl
Buffer-3 (NEB®)	1.5 µl
dH ₂ O	2.60 µl
BSA (NEB®)	0.5 µl
Toplam	15 µl

Hazırlanan karışım 65°C’de 1 saat kesim için inkübe edildi. 1 saatin sonunda reaksiyon karışımının üzerine 3 µl yükleme tamponu ilave edilip %2’lik agaroz jelde 100 volta 40 dakika yürütüldü. Homozigot, heterozigot ve normal genotipler belirlendi. PCR-RFLP için kullanılan primerlerin dizileri aşağıdaki Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. RFLP reaksiyonunda kullanılan primerlerin isimleri ve dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5’-3’)	PCR Ürünü (bp)
MTHFR_rs1801133_F	AGTCCCTGTGGTCTCTTCATC	388
MTHFR_rs1801133_R	AGGAGATCTGGGAAGAACTCAG	

3.2.7. Biyoistatistiksel ve Biyoinformatik Analizler

3.2.7.1. Biyoistatistiksel Analizler

Kontrol ve OSB grubunda *MTHFR* C677T varyantı allel ve genotip frekanslarının anlamlı düzeyde farklı olup olmadığı GraphPad Prism 7® programında Ki-kare (χ^2 - Contingency table) testiyle değerlendirildi.

3.2.7.2. Biyoinformatik Analizler

PSPH ve *PHGDH* genleri üzerinde bulunan DNA varyantlarının etkileri, polimorfizm olup olmadıkları, minör allel frekansları gibi özellikleri farklı veri bankalarında analiz edildi. Bu veri bankaları UCSC Genom Browser (131), NCBI (132) ve EMBL-EBI (133) dir. Ayrıca, bulunan varyantların etkileri *MutationTaster2* (134), *PolyPhen-2* (135) ve *SIFT* (136) programları kullanılarak analiz edildi. İlâveten, DNA varyasyonlarının genin ekzon-intron sınırına yakın olması durumunda pre-mRNA kırılmasına etkisi *Human Splicing Finder* (137) programı ile analiz edildi.

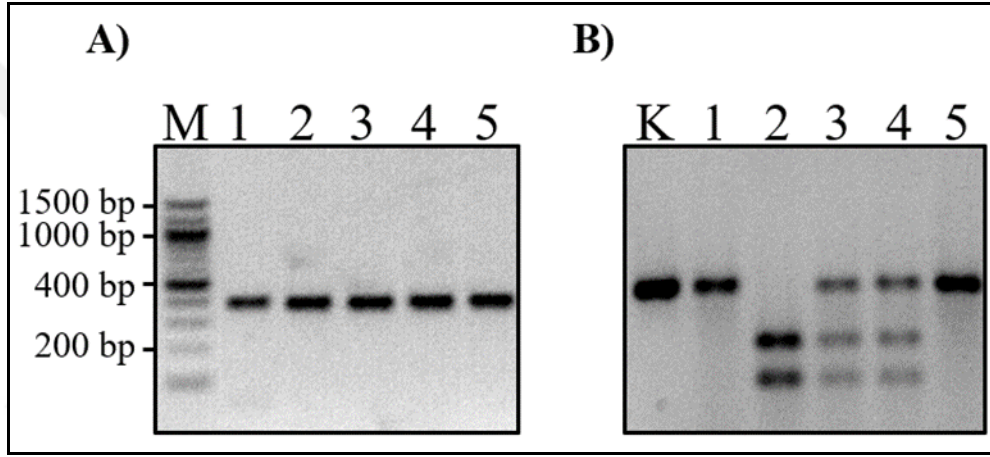
Kontrol ve OSB grubunda tespit edilen *MTHFR* C677T varyantının allel frekanslarının Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı web tabanlı software (138) kullanılarak gerçekleştirildi (139, 140).



4. BULGULAR

4.1. Kontrol Grubunda *MTHFR* C677T'nin RFLP ile Taranması

MTHFR C677T varyantını homozigot/heterozigot olarak taşıyan kontrol grubunu belirlemek için 323 kontrol PCR-RFLP ile tarandı. PCR reaksiyonu ile istenilen ürünler elde edildi (Şekil 8A). PCR ürünleri RFLP yöntemiyle *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot taşıyan bireyler seçildi (Şekil 8B). 139 heterozigot mutant (CT), 23 homozigot mutant (TT) ve 161 normal (CC) genotip saptandı. *MTHFR* C677T homozigot/heterozigot 121 OSB'li hasta grubuna karşın 125 kişilik kontrol grubu seçildi.



Şekil 8. Kontrol grubu bulguları A) RFLP reaksiyonu için kullanılan PCR ürünleri B) RFLP sonuçları. K olarak adlandırılan *TaqI* enziminin eklenmediği örnek. 1 ve 5 nolu örnekler homozigot normal (CC), 3 ve 4 nolu örnekler heterozigot mutant (CT) ve 2 nolu birey homozigot mutant (TT) genotipi göstermektedir. M: Markır, K: Kesilmemiş örnek

4.2. *MTHFR* C677T Varyantı Biyoistatistiksel Analizleri

MTHFR C677T varyantı için OSB ve kontrol grubunda normal (C) ve mutant (T) allel dağılımları incelendiğinde; OSB'li hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.2691$) (Tablo 4).

MTHFR C677T varyantı için genotip dağılımları incelendiğinde; OSB'li hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.5238$) (Tablo 5).

MTHFR C677T varyantı homozigot/heterozigot toplam genotip dağılımları incelendiğinde; OSB'li hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.1444$) (Tablo 6).

Tablo 4. Kontrol ve OSB grubunda *MTHFR* C ve T allelleri dağılımları

P değeri ve istatistiksel önemi			
Test	Ki-kare		
Ki-kare; df (serbestlik derecesi)	1.221; 1		
Z	1.105		
P değeri	0.2691		
P değeri özeti	Ns (non-significant)		
Bir ya da iki-yönlü	İki-yönlü (Two-sided)		
İstatistiksel olarak anlamlı mı ($P < 0.05$)?	Anlamsız		
Analiz edilen veri	MTHFR T Allel	MTHFR C Allel	Total
OSB'li	141	303	444
Kontrol	185	461	646
Total	326	764	1090
Satır toplamın yüzdesi	MTHFR T Allel	MTHFR C Allel	
OSB'li	31.76%	68.24%	
Kontrol	28.64%	71.36%	
Sütun toplamın yüzdesi	MTHFR T Allel	MTHFR C Allel	
OSB'li	43.25%	39.66%	
Kontrol	56.75%	60.34%	
Genel toplamın yüzdesi	MTHFR T Allel	MTHFR C Allel	
OSB'li	12.94%	27.80%	
Kontrol	16.97%	42.29%	

Tablo 5. Kontrol ve OSB grubunda *MTHFR* C677T genotip dağılımları

P değeri ve istatistiksel önemi			
Test	Ki-kare		
Ki-kare değeri; df (serbestlik derecesi)	1.293; 2		
P değeri	0.5238		
P değeri özeti	Ns (non-significant)		
İstatistiksel olarak anlamlı mı? (P < 0.05)	Anlamsız		
Analiz Edilen Veriler			
Satırların Sayısı	2		
Sütunların Sayısı	3		
MTHFR C677T Genotip Dağılımı	TT	CT	CC
Otizm	20	101	101
Kontrol	23	139	161

Tablo 6. Kontrol ve OSB grubunda *MTHFR* C677T varyantı homozigot/heterozigot toplam genotip dağılımları

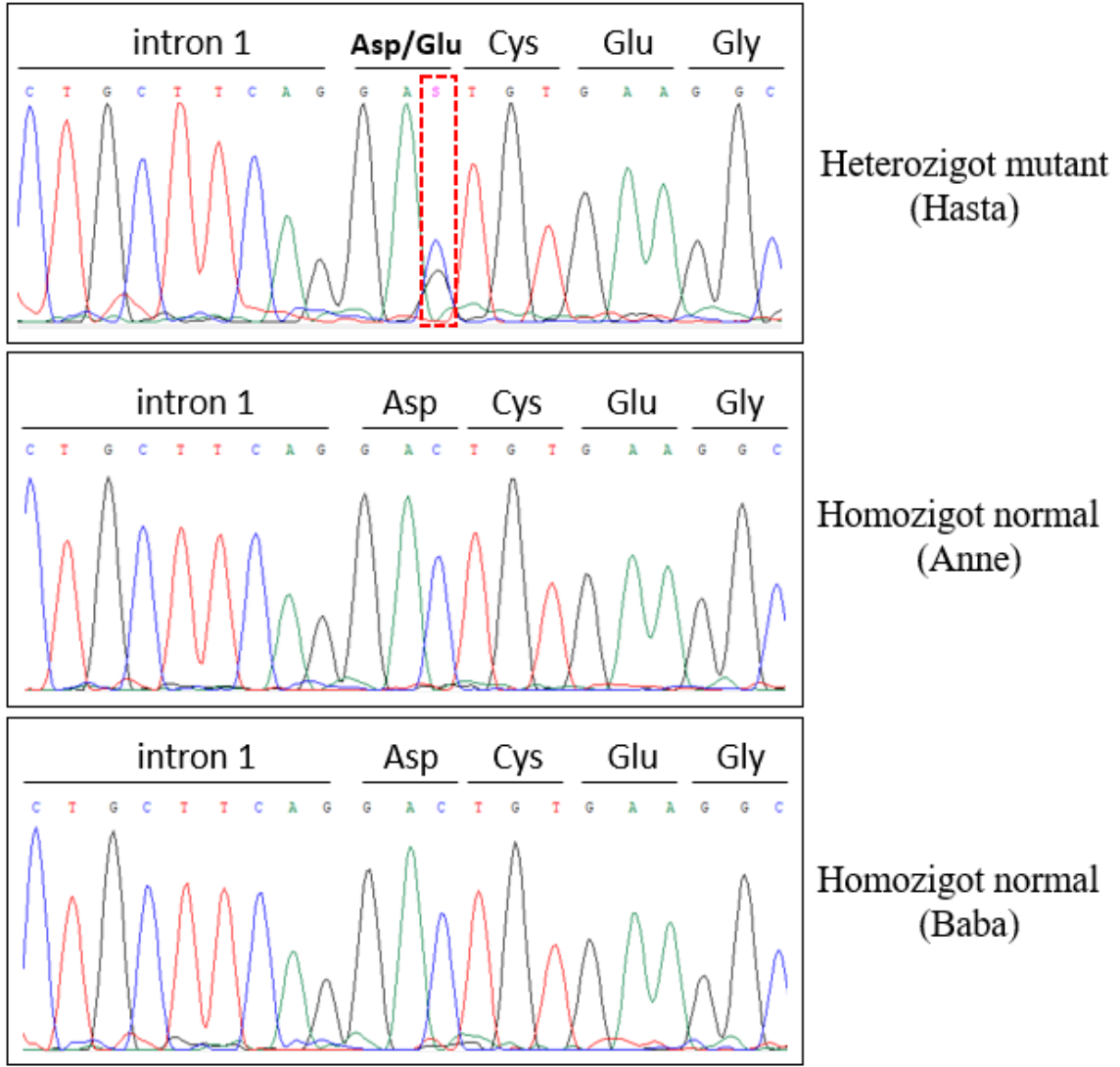
P değeri ve istatistiksel önemi			
Test Türü	Ki-kare		
Ki-kare değeri; df (serbestlik derecesi)	2.13; 1		
z	1.459		
P değeri	0.1444		
P değeri özeti	Ns (non-significant)		
Bir ya da iki-yönlü	İki Yönlü		
İstatistiksel olarak anlamlı mı? (P < 0.05)	Anlamsız		
Analiz Edilen Veriler	TT+CT Hom+Het	CC Normal	Toplam
Otizm	141	81	222
Kontrol	185	138	323
Toplam	326	219	545
Toplam Satır Yüzdesi	TT+CT Hom+Het	CC Normal	
Otizm	63.51%	36.49%	
Kontrol	57.28%	42.72%	
Toplam Sütun Yüzdesi	TT+CT Hom+Het	CC Normal	
Otizm	43.25%	36.99%	
Kontrol	56.75%	63.01%	
Genel Toplam Yüzdesi	TT+CT Hom+Het	CC Normal	
Otizm	25.87%	14.86%	
Kontrol	33.94%	25.32%	

4.3. *PSPH* Geninde Nadir Varyant Taraması

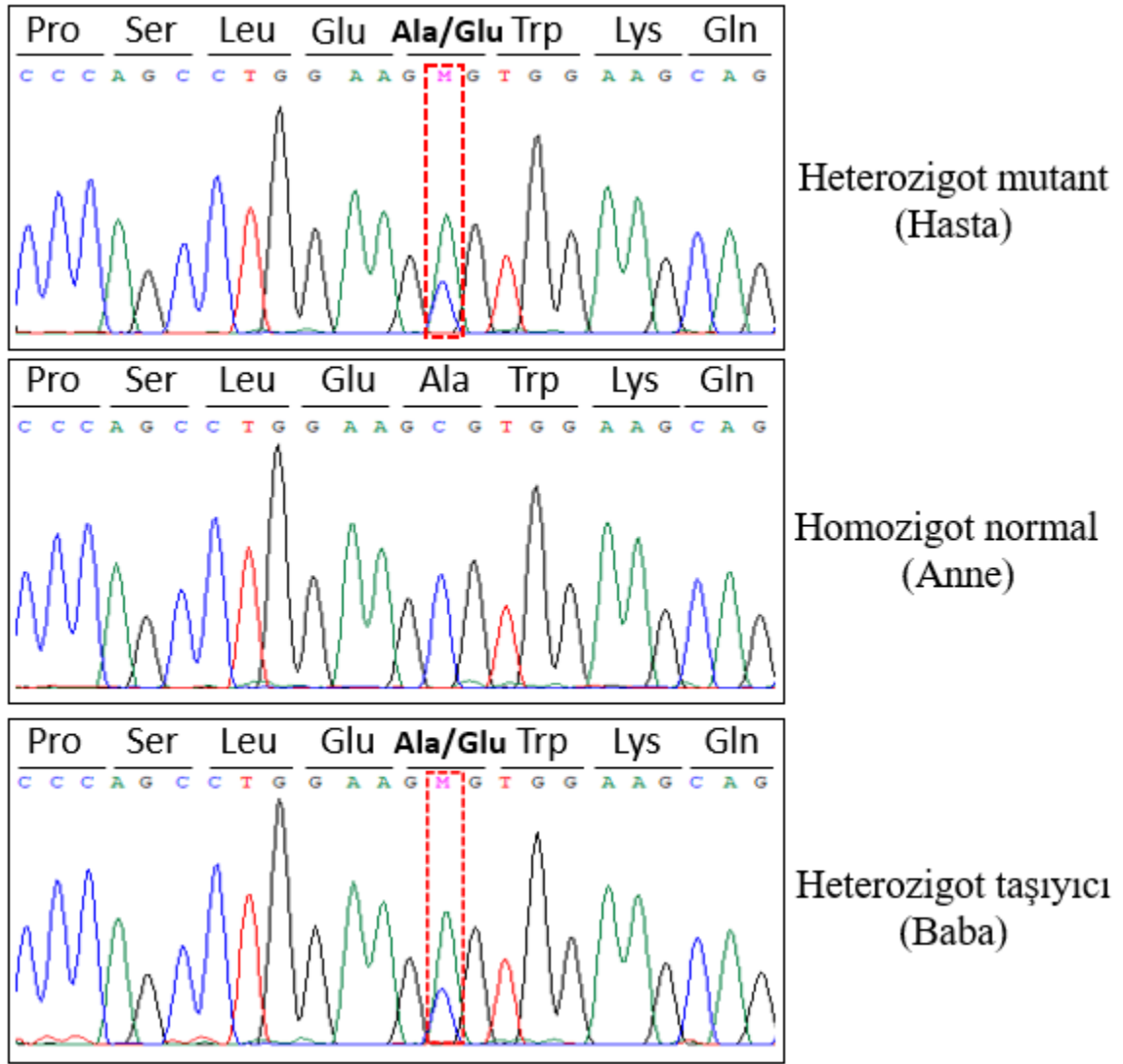
TÜBİTAK 116S301 no'lu proje kapsamında hizmet alımı yoluyla elde edilen veriler doğrultusunda *MTHFR* C677T varyantını homozigot olarak taşıyan 20, heterozigot olarak taşıyan 101 OSB'li birey tespit edildi. Bu homozigot 20 bireyde *PSPH* geninin tüm kodlayan ekzonları Sanger dizilemeyle tarandı. *PSPH* geni üzerinde herhangi bir değişim gözlemlenmedi. *MTHFR* C677T varyantını heterozigot olarak taşıdığı tespit edilen 101 OSB hastasında *PSPH* geninin yalnız 4. ve 5. ekzonları dizilendi. Çünkü bu ekzonlar *PSPH* genindeki en sık gözlenen ($MAF \geq 0,01$) 7 yaygın missens varyantın (rs78067484, rs200442078, rs79321413, rs79451216, rs78599516, rs74445297, rs77329757) bulunduğu ekzonlardı. Bu varyantların 121 OSB ve 125 kontrol grubundaki durumunu belirlemek istedik. Dizileme sonucunda 101 OSB hastamızın bu varyantlar yönünden referans (normal) dizilere sahip oldukları görüldü. Bu nedenle kontrol grubunda dizileme yapılmadı.

4.4. *PHGDH* Geninde Nadir Varyant Taraması

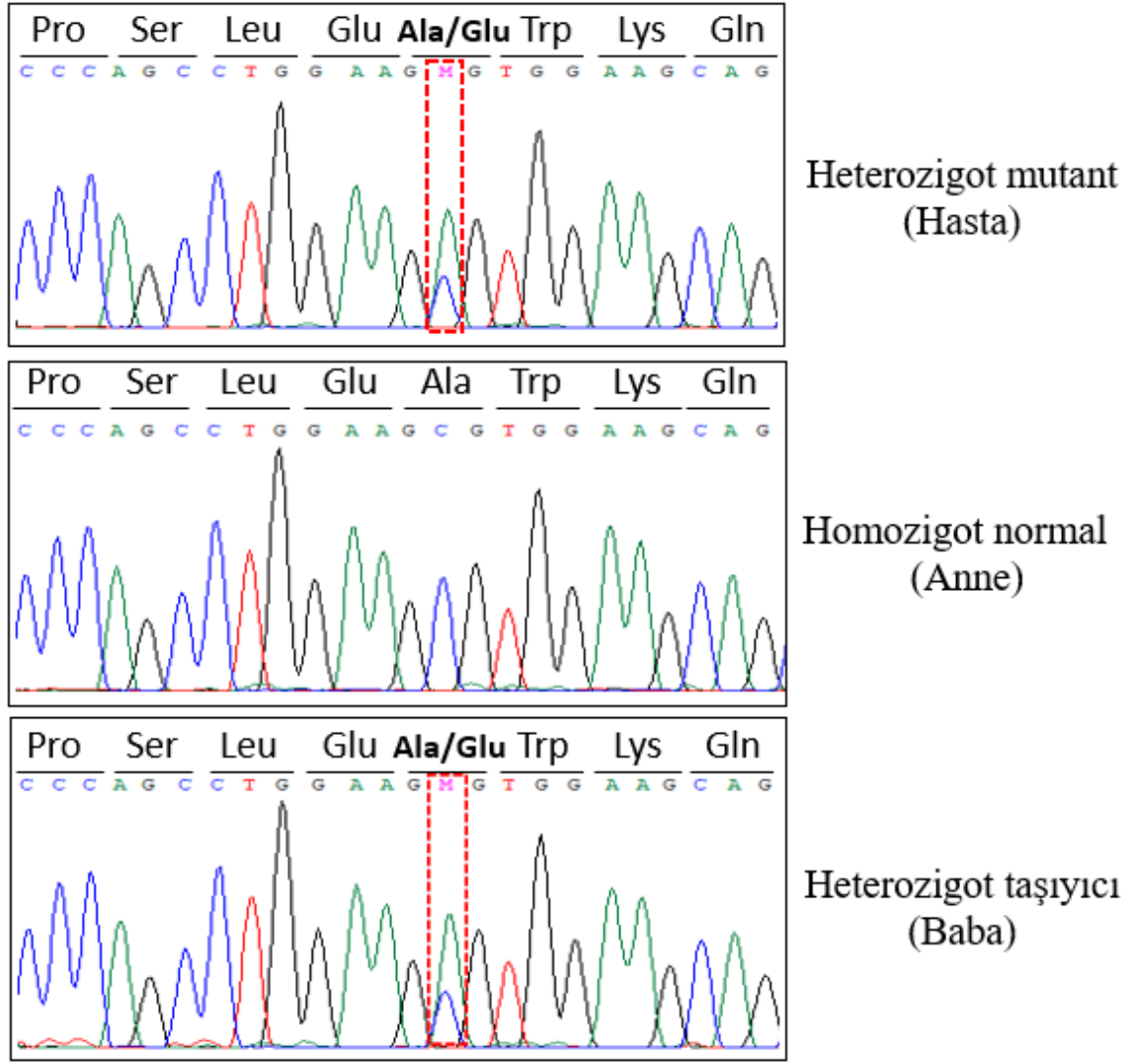
TÜBİTAK projesi kapsamında *PHGDH* geni üzerindeki bütün varyantlar yeni nesil hedefli dizileme yöntemi ile araştırıldı. Üç farklı OSB'li bireyde biri yeni olmak üzere iki farklı SNV tespit edildi. Tespit edilen varyantlar Sanger dizileme metodu ile bu çalışma kapsamında doğrulandı (Şekil 9-11). Bu varyantların ilki (yeni) **c.141C>G; p.D47E** varyantıdır ve bu değişimin *de novo* olarak ortaya çıktığı anlaşılmaktadır (Şekil 9). Diğer iki bireyde ise aynı varyant olan **c.1559C>A; p.A520E** değişimi (rs151275800) gözlemlendi (Şekil 10,11).



Şekil 9. OT_56'nolu ailede *PHGDH* geninde gözlenen **c.141C>G**; **p.D47E** *de novo* değişimin kromatogramı. Üst panel; heterozigot mutant çocuk, orta panel; homozigot normal anne, alt panel; homozigot normal baba



Şekil 10. OT_79'nolu ailede *PHGDH* geninde gözlenen c.1559C>A; p.A520E değişimi kromatogramı. Üst panel; heterozigot çocuk, orta panel; homozigot normal anne, alt panel; heterozigot baba



Şekil 11. OT_143'nolu ailede *PHGDH* geninde gözlenen **c.1559C>A; p.A520E** değişimi kromatogramı. Üst panel; heterozigot çocuk, orta panel; homozigot normal anne, alt panel; heterozigot baba

PHGDH geninde gözlenen bu üç varyantı taşıyan bireylerdeki *MTHFR* C677T ve A1298C varyantlarının durumu Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. *PHGDH* geninde değişim gözlenen hastalarda *MTHFR* varyantları genotip dağılımları

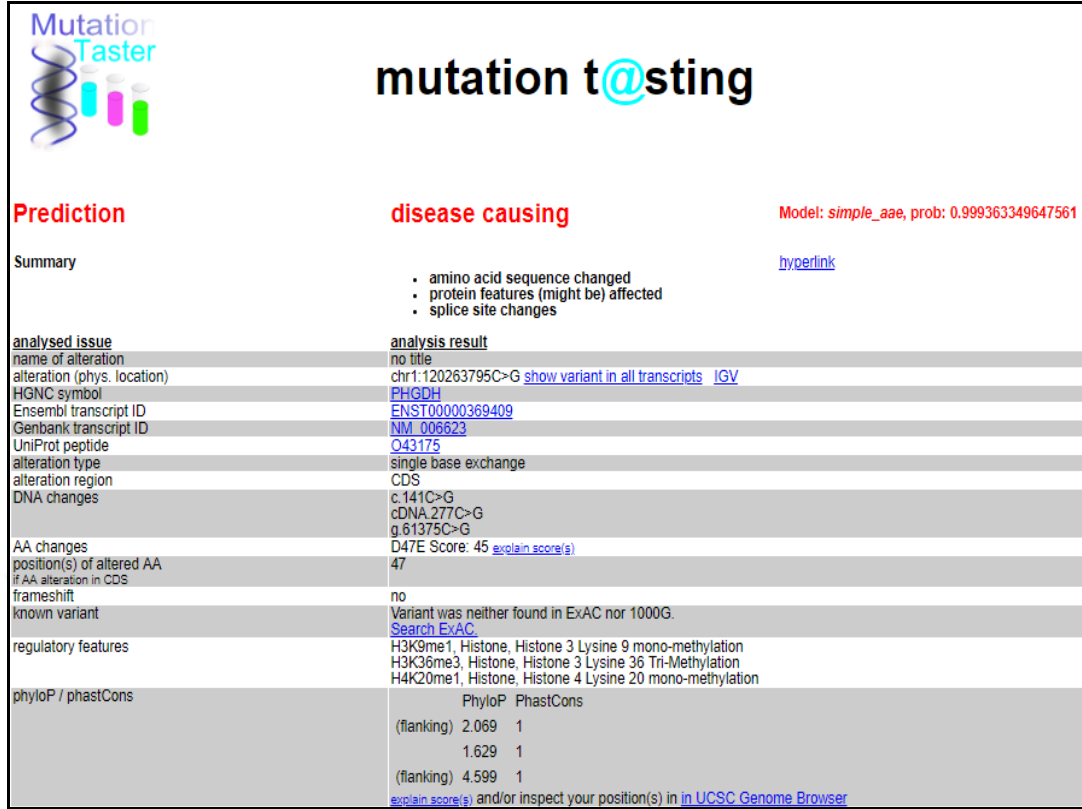
Değişim Gözlenen Aileler	<i>PHGDH</i> ’da Gözlenen Değişim	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C
OT_56/Proband	c.141C>G; p.D47E	Heterozigot Mutant	Normal
OT_143/Proband	c.1559C>A; p.A520E	Homozigot Mutant	Normal
OT_79/Proband	c.1559C>A; p.A520E	Heterozigot Mutant	Homozigot Mutant

4.5. Görülen Değişimlerin *In Silico* Mutasyon Analizleri

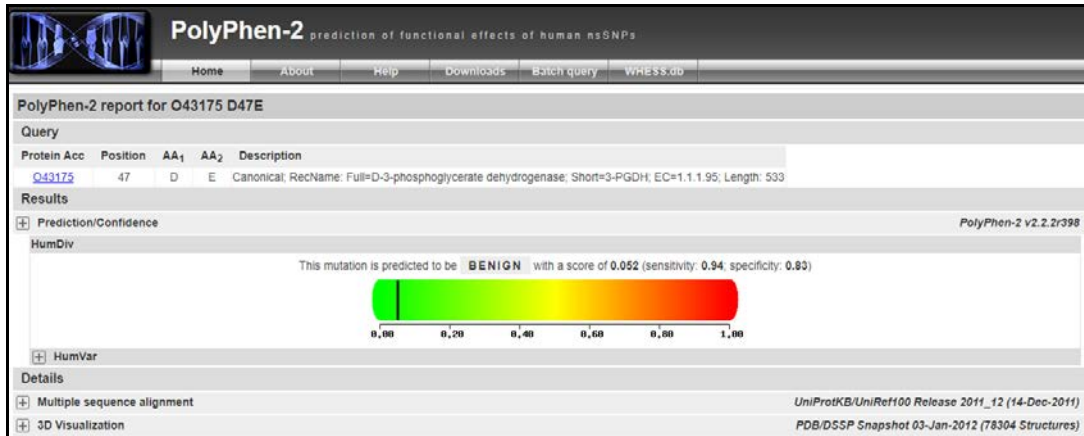
Tanımlanan missens mutasyonların, olası fonksiyonel sonuçlarını tahmin etmek için Mutation Taster, Polyphen-2 ve SIFT programları kullanıldı. Ayrıca, c.141C>G değişimi splice bölgeye çok yakın olduğu için ilgili değişimin pre-mRNA kırılmasına olası potansiyel etkisini tahmin etmek için Human Splicing Finder programı kullanıldı.

4.5.1. c.141C>G; p.D47E Değişiminin Mutation Taster, PolyPhen-2 ve Human Splicing Finder Tahminleri Analizi

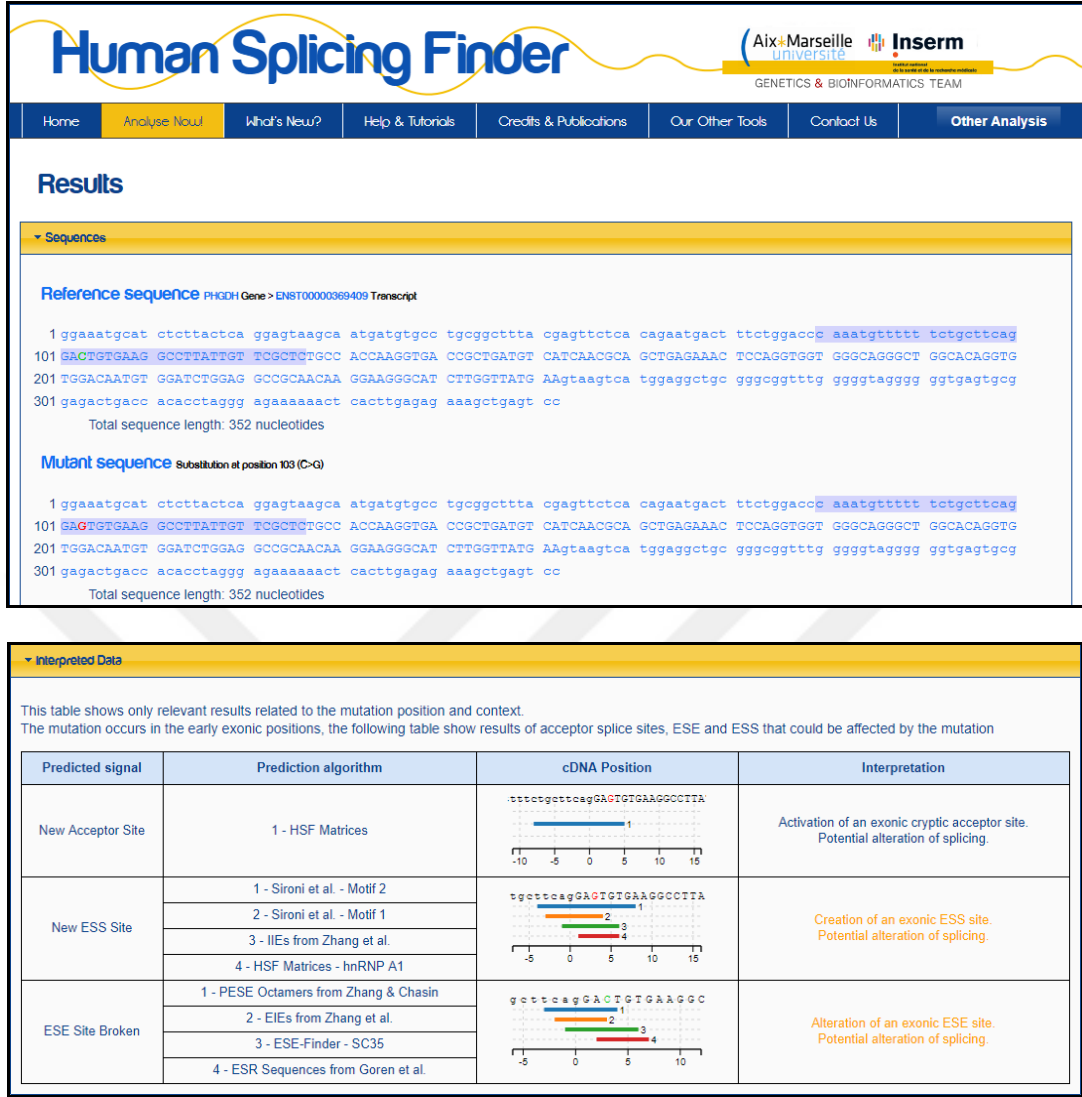
c.141C>G; p.D47E değişiminin analizi için 3 farklı tahmin programı kullanıldı. Mutation Taster programı ilgili değişimi zararlı olarak vermiştir (Şekil 12). PolyPhen-2 programı öncelikle değişen amino asitlerin evrimsel korunmuşluğunu, protein üzerindeki konumunu ve kimyasal özelliklerini dikkate alarak tahminde bulunmaktadır. Buna göre ilgili değişimin zararsız olduğunu tahmin etmiştir (Şekil 13). Human Splicing Finder programı özellikle değişen nükleotidin kriptik (gizli) splicing alıcı veya verici bölge oluşturup oluşturmadığı ve ESS (Exonic Splicing Silencers), ESE (Exonic Splicing Enhancers) şeklindeki korunmuş bölgeleri değiştirip değiştirmediği gibi parametreleri dikkate alan ve buna göre tahmin yapan bir programdır (141). Bu bilgiler ışığında ilgili değişimin büyük ihtimalle gizli kırılma alıcı bölge yaratarak pre-mRNA’nın kırılmasının bozulduğunu tahmin etmiştir (Şekil 14).



Şekil 12. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.141C>G; p.D47E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin Mutation Taster programı ile analizi



Şekil 13. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.141C>G varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin PolyPhen-2 programı ile analizi



Şekil 14. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.141C>G varyasyonunun splicing üzerine olası etkisinin Human Splicing Finder programı ile analizi

4.5.2. c.1559C>A; p.A520E Değişiminin Mutation Taster, PolyPhen-2 ve Human Splicing Finder Tahminleri Analizi

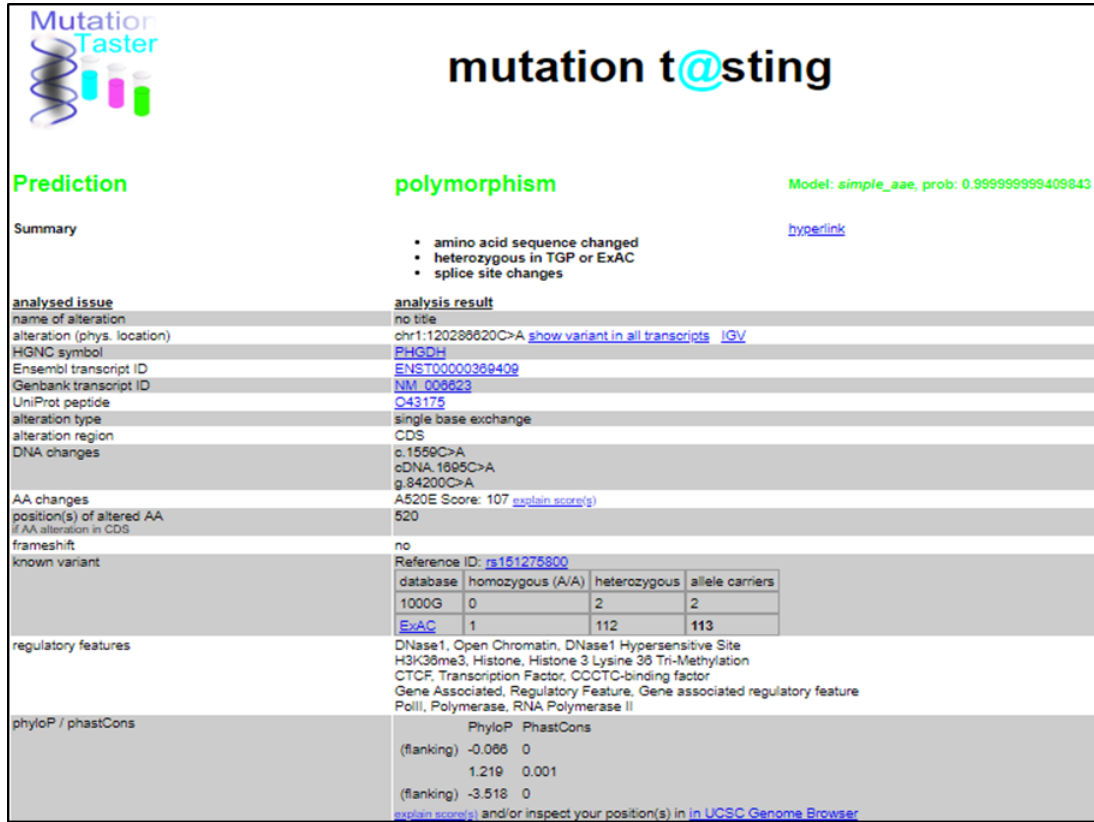
PHGDH üzerinde bulduğumuz c.1559C>A; p.A520E (rs151275800) değişiminin analizi için 3 farklı tahmin programı kullanıldı. Analiz tahmini yapmadan önce ilgili değişimin All-SNP150 (142) veri bankasında olması dolayısıyla görülme sıklığı ve popülasyonlardaki allel frekansları incelenmiştir. Bu amaçla gnomAD (143) veri bankasındaki nörolojik hastalığı olmayan 114.704 bireye ait veriler incelenmiştir (Tablo 8). Tablodan da görüleceği üzere, ilgili varyantın (A alleli) görülme sıklığı toplamda 0.0009 olarak son derece nadir olduğu anlaşılmaktadır. Üstelik Doğu Asyalılar ve Finliler arasında

hiç görülmediği de anlaşılmaktadır. Ülkemize ait veri tabanı bulunmadığı için ülkemizde ne kadar sık görüldüğü hakkında fikrimiz bulunmamaktadır.

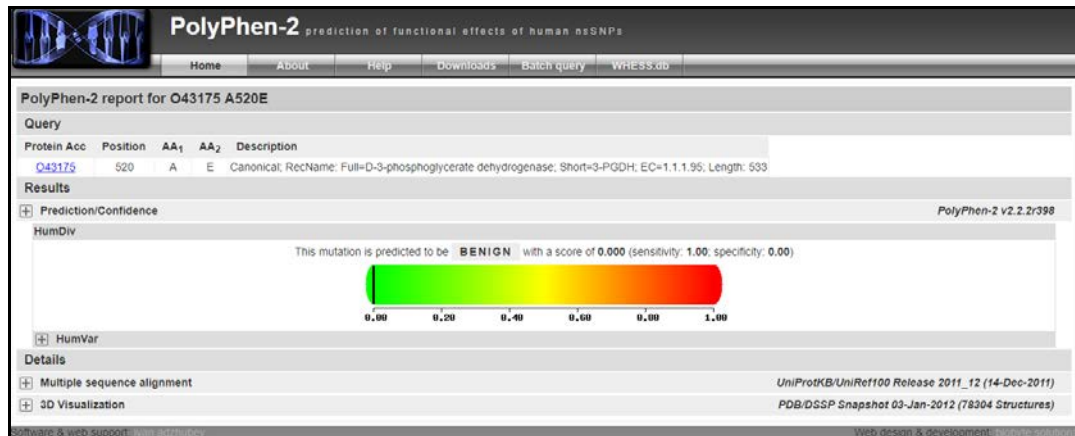
Tablo 8. c.1559C>A değişiminin popülasyon frekansları (A allelinin görülme sıklığı) (143)

Popülasyon	Allel Sayısı	Toplam Allel Sayısı	Homozigot Sayısı	Allel Frekansı
Ashkenazi Jewish	49	6456	0	0.007590
Other	8	5596	0	0.001430
Latino	41	31078	1	0.001319
African	24	19602	0	0.001224
South Asian	30	30608	1	0.0009801
European (non-Finnish)	69	103132	0	0.0006690
East Asian	0	14976	0	0.000
European (Finnish)	0	17898	0	0.000
Toplam	221	229346	2	0.0009636

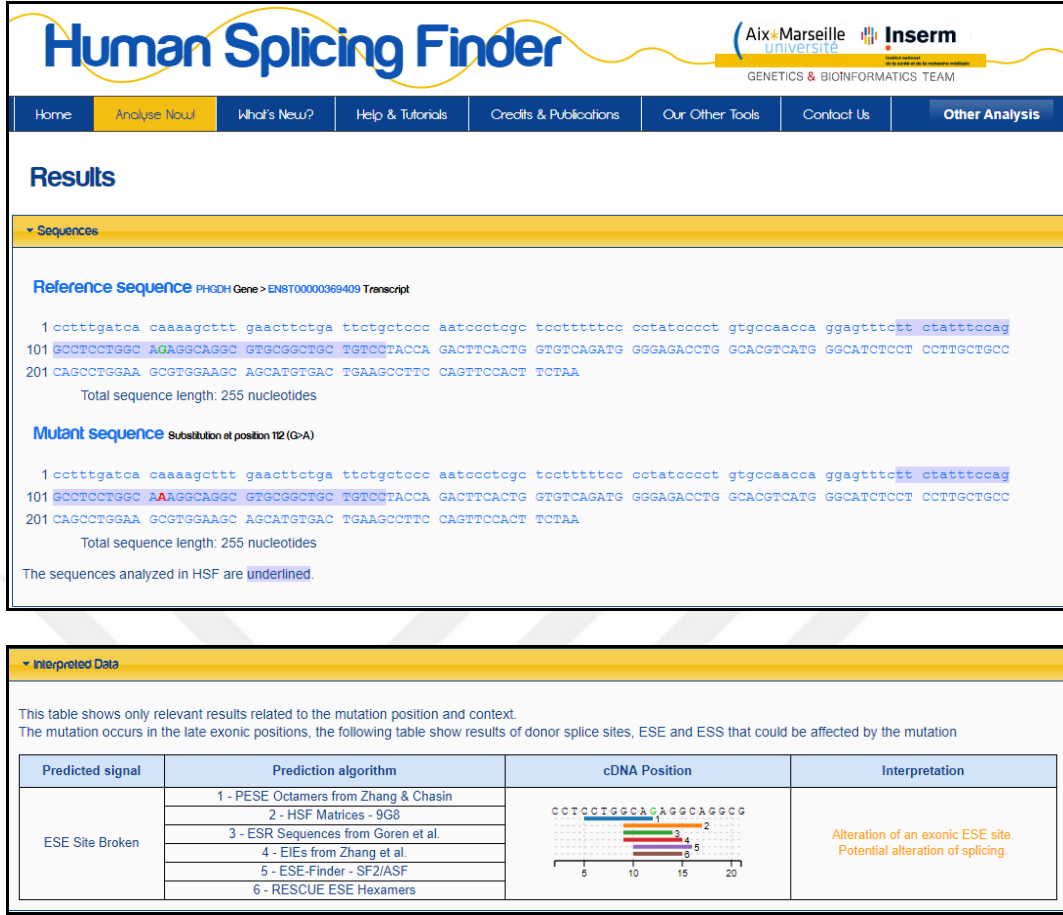
Yapılan analizlerde Mutation Taster ve PolyPhen-2 ilgili değişimi zararsız verirken, Human Splicing Finder programı pre-mRNA kırılmasının bozulabileceğine yönelik tahminlerde bulunmuşlardır (Şekil 15-17).



Şekil 15. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin Mutation Taster programı ile analizi



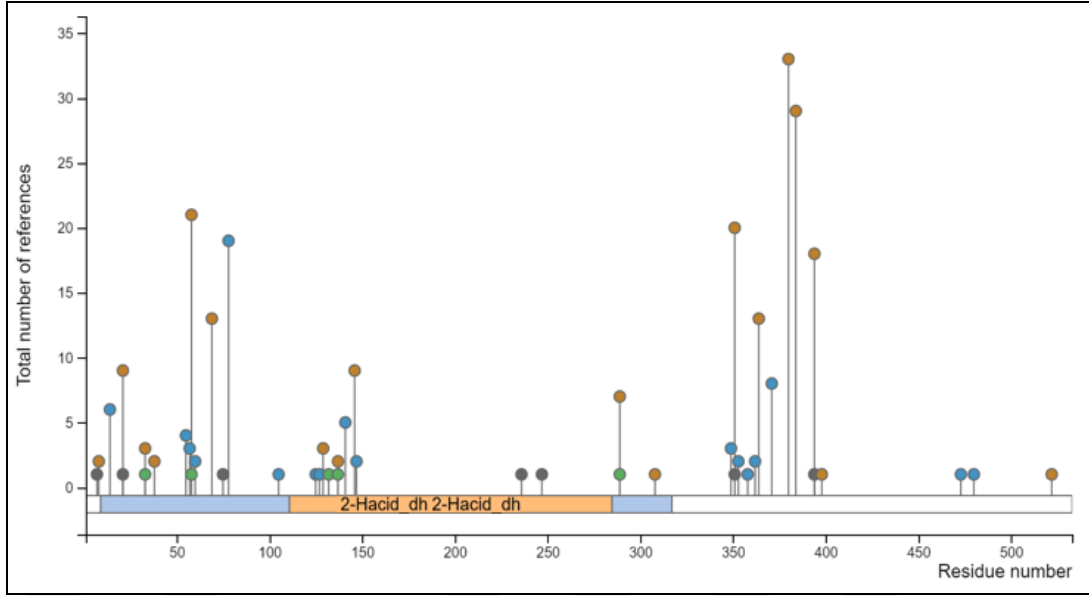
Şekil 16. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun olası fonksiyonel etkisinin PolyPhen-2 programı ile analizi



Şekil 17. *PHGDH* geni üzerinde tespit edilen c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun splicing üzerine olası etkisinin Human Splicing Finder programı ile analizi

4.5.3. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (*PHGDH*) proteinini üzerindeki post translasyonel modifikasyonlar

PHGDH geni c.1559C>A; p.A520E varyasyonunun proteinin PTM'ye uğrayan amino asit rezidülerinden biri üzerinde olup olmadığını tespit etmek için ilgili proteinin protein data bank (PDP) veri bankasındaki (144) PTM verileri incelenmiştir (Şekil 18, 19). Buna göre, 522. pozisyonundaki lizin (K) rezidüsünün ubiquitinasyona uğradığı görülmektedir (Şekil 19). İlgili rezidüden 2 amino asit önce bulunan ve değişime uğramış olan alanin (A) rezidüsü ubiquitinasyon motifi üzerinde yer aldığı için önemli olabilir.



Şekil 18. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (PHGDH) proteini üzerindeki post translasyonel modifikasyonlar (PTM). Mavi renk fosforilasyon, yeşil asetilasyon, kahverengi ubiquitinasyon ve gri renk diğer PTM'leri göstermektedir (145)

K522	
PTM class:	UBIQUITYLATION
#HTP/LTP references:	1/0
Flanking sequence:	LPSLEAWkQHVTEAF
#Somatic Mutations on Residue (Total):	Less than 3

Şekil 19. D-3-fosfoglisarat dehidrojenaz (PHGDH) protein sekansında 522. pozisyonundaki Lizin amino asitinin ubiquitinasyonu (145)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Otizm Spektrum Bozukluğu çocukluk çağının başlarında ortaya çıkan, bir grup nörogelişimsel bozukluktur. OSB her ne kadar geniş bir semptom dizisiyle ilişkilendirilebilse de OSB tanısı için iki ana kriter esas alınmıştır. Bu kriterlerden ilki sosyal iletişim ve etkileşimde yetersizlik, diğeri ise sınırlı ve tekrarlayan davranışların gözlemlenmesidir (1). ABD Hastalık Kontrol Merkezi'nin 2014 yılı raporunda 1/68 olarak verdiği tahmini OSB prevalansını (146) 2018 yılı raporuna göre %15 artışla 1/59'a çıkardığı görülmektedir (2). OSB prevalansındaki bu dramatik artışın nedenleri araştırmacılar tarafından yoğun şekilde tartışılmaktadır. Bu tartışmalar çocuk sahibi olma yaşının gittikçe artmasından (özellikle baba yaşı) çevresel kirleticilere maruz kalmaya ve OSB tanı kriterlerinin geniş bir skalaya çekilmesinden toplumsal farkındalığın artışına kadar geniş bir nedenler zincirini kapsamaktadır (147–149).

OSB'nin etiyolojisi ile ilgili bilimsel görüşler başlıca iki konu üzerine yoğunlaşmaktadır. Bunlardan biri çevresel faktörler (hamilelikte beslenme, geçirilmiş enfeksiyonlar, kimyasallara maruziyet, kullanılan ilaçlar, vb.) diğeri ise genetik nedenler olarak göze çarpmaktadır (150, 151). Bununla birlikte OSB'nin etiyolojisinin anlaşılmasındaki en büyük engellerden biri, hastalığın yüksek oranda klinik ve genetik heterojenite göstermesi ve buna bağlı olarak güvenilir biyolojik (radyolojik, biyokimyasal, genetik, vb.) belirteçlerin olmamasıdır (152, 153). OSB'nin tanısında ve takibinde kullanılabilecek biyolojik belirteçlerin araştırılmasında özellikle hastaların serum, beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve idrar gibi vücut sıvılarına yönelik biyokimyasal analizler başta gelmektedir. Hastalar ve eşlenmiş kontrollerde yapılan biyokimyasal analizlerde birtakım metabolitlerin OSB'lilerde kontrollere göre serum düzeylerinin anlamlı derecede farklı olduğunu belirten araştırmalar bulunmaktadır (111, 154, 155). Bu araştırmalarda özellikle TKM'nin ara ürünlerinin (Hcy, folat, SAM, sistasyonin, redükte glutatyon, vb.) farklılığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle özellikle tek karbon reaksiyonları dizisinde görevli enzimler/genler üzerindeki varyasyonların OSB etiyolojisindeki rolü yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (75, 111, 153–157). MTHFR enzimi, TKM'deki üç reaksiyon dizisinin (folat-metiyonin döngüsü, transsülfürasyon ve transmetilasyon) odağında yer alan kritik bir enzimdir (118). Folat, aminoasit metabolizması, DNA metilasyonu, pürin ve pirimidin sentezi ve trans-sülfürilasyon yolağı gibi birçok biyokimyasal işlemde önemli bir moleküldür (158, 159). *MTHFR* C677T varyantının, başta nöral tüp defekti olmak üzere

(160), kardiyovasküler hastalıklar (161), kanser (162) ve OSB'nin de içinde olduğu birçok nöro-gelişimsel/nöro-dejeneratif hastalıkta (163, 164) bir risk faktörü olduğu çok sayıda araştırmada belirtilmektedir (165). Ancak, OSB için bir risk faktörü olup olmadığı konusunda birbirinden farklı sonuçlar göze çarpmaktadır. Bazı çalışmalarda risk faktörü olduğu belirtilirken (80, 114, 115), bizim ülkemizin de aralarında olduğu (117) diğer çalışmalarda ise kontrol grubuyla anlamlı bir fark olmadığı belirtilmektedir (75, 116, 166).

MTHFR C677T varyantına bağlı olarak enziminin azalmış aktivitesi, düşük 5-metil THF seviyesine ve böylece Hcy'nin daha az 5-metil THF ile reaksiyona girmesine, dolayısıyla da plazma Hcy düzeyinin artışına neden olduğu düşünülmektedir (Şekil 2, 3 ve 5) (75, 167). Yüksek plazma Hcy seviyeleri diğer hastalıkların yanında, OSB de dahil birçok nörogelişimsel/nörodejeneratif hastalığın patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir (168, 169). Bu çalışmada, *MTHFR* C677T varyantının tek başına ve L-serin biyosentezinde görev alan iki kritik genle (*PHGDH* ve *PSPH*) birlikte OSB için bir risk faktörü olup olmadığı sorusuna cevap aranmıştır. Buna göre, OSB ve kontrol grubu arasında *MTHFR* C677T allel dağılımı ve genotip dağılımları bakımından anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4, 5 ve 6). *MTHFR* C677T alleli bakımından bizim bulduğumuz sonuçlar Romanya, Güney Brezilya, İran ve ülkemizde yapılan çalışmaların (75, 116, 117, 166) sonuçları ile uyumludur. *MTHFR* C677T varyantını homozigot olarak taşıyan 20 OSB'li bireyde *PSPH* geninin tüm kodlayan ekzonları, heterozigot olarak taşıyan 121 OSB'lide yaygın (MAF>0,01) missense 7 varyantın bulunduğu 4. ve 5. ekzonları Sanger dizilemeyle araştırıldı. Veri bankalarında bu varyantların MAF değerleri 0,04-0,20 aralığında verilmektedir. İlginç bir şekilde taranan OSB'lilerin tamamında varyantların olduğu pozisyonlarda referans alleller bulunmaktaydı. Buradaki amacımız OSB'li bireylerde tespit edeceğimiz ilgili varyantların frekansının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı olup olmadığını tespit etmektir. Böylece bu allellerin OSB'ye bir etkisinin olup olmadığını test etmeyi düşünmekte idik. Bütün taranan OSB'lilerde referans alleller olduğu için kontrol grubu çalışılmamıştır.

De novo L-serin biyosentezinde ilk basamakta yer alan *PHGDH* geninin tüm kodlayan ekzonları hizmet alımı yöntemiyle yeni nesil hedefli dizileme ile çalışıldı. Üç OSB hastasında bu gen üzerinde patolojik olabilecek iki adet nadir SNV tespit edilmiştir. Bu varyantlardan ilki hasta bireyde heterozigot olarak bulunan c.141C>G; p.D47E değişimi idi (Şekil 9). Diğer iki bireyde aynı c.1559C>A; p.A520E değişimi (Şekil 10-11)

heterozigot olarak görülmüştür. *PHGDH* geni üzerinde bulduğumuz yeni ve nadir DNA varyantlarının olası fonksiyonel etkileri Mutation Taster, PolyPhen-2 ve Human Splicing Finder gibi tahmin programları kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre *de novo* olarak oluşan ve literatürlerde olmayan p.D47E varyantı büyük ihtimalle zararlı (fonksiyon kaybettirici) bir değişim olarak değerlendirilmiştir. Çünkü ilgili varyant intron/ekzon sınırındaki ilk kodonun üçüncü nükleotidini değiştirmekteydi. Human Splicing Finder programı bu değişimin splicingi büyük ihtimalle bozduğu tahmininde bulunmaktadır (Şekil 14). Ayrıca, Mutation Taster programı da patolojik olarak skorlamıştır (Şekil 12). Ancak, ilgili değişimin net bir şekilde değerlendirilebilmesi için hastaya ait mRNA üzerinde çalışılması gerekmektedir. Diğer bir alternatif de mini-gen yöntemiyle ilgili değişimin analiz edilmesidir (170–172). Ancak bu çalışmaları, kontrol grubunda *PHGDH* geni tüm ekzon dizilemelerinin sonucunda patolojik olabilecek DNA varyantları görmediğimizde yapmayı düşünmekteyiz. Çünkü, ancak o zaman ilgili varyantın OSB patolojisinde bir etkisinin olma ihtimali ortaya çıkacaktır. Diğer değişim (c.1559C>A; p.A520E) için de mutasyon tahmin araçlarının verdiği skorlar analiz edilmiştir (Şekil 15-17). Buna göre, Mutation Taster ve PolyPhen-2 ilgili değişimi nötral olarak skorlarken, Human Splicing Finder splicingi bozabileceği yönünde tahminde bulunmuştur (Şekil 17). Veri bankalarından (173) ilgili değişimin proteininin (PGDH) hangi bölgesine geldiğini araştırdığımızda, değişimin karboksi (COO⁻) ucunda yer aldığını görmekteyiz (Şekil 18). Bu bölge proteinin katalitik domeininin dışında yer almakta ve proteinin katalitik aktivitesinde bir değişime neden olması beklenmemektedir. Ancak, ilgili değişimin proteinin stabilitesine ve protein-protein etkileşimine olası etkisini araştırdığımızda değişen aminoasidin (A) ubiquitinasyona uğrayan K rezidüsüne çok yakın olması, ubiquitinasyon yapan protein makinesinin (E2 ve E3 ubiquitin ligaz sistemi) tanıma motifinin bozulmasına ve proteinin stabilitesi ve turn-overına etkisi olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 19). Nitekim, Fosfogliserat Dehidrojenaz defektine neden olduğu gösterilmiş olan V490M (rs121907987) missens değişimi de katalitik bölge dışında ve proteinin karboksi COO⁻ ucuna yakın bir yerde yerleşiktir (174–176). Biz p.A520E değişiminin tek başına homozigot ya da heterozigot olarak patolojik olduğunu düşünmemekteyiz. Nitekim Tablo 8'den de görüleceği üzere nörolojik hastalığı bulunmayan iki bireyde ilgili değişimin homozigot olarak bulunduğu anlaşılmaktadır. Ancak, bu bireylerde *MTHFR* geni C677T ve A1298C değişimlerinin ne durumda olduğuyla ilgili bir veri bulunmamaktadır. Bu değişimi taşıyan OSB hastalarında aynı zamanda *MTHFR* C677T ve A1298C

varyantlarının homozigot mutant olmalarının (Tablo 7) kombine etkiyle OSB'ye yatkınlık meydana gelmiş olabilir. Bizim sağlıklı popülasyonumuza ait DNA referans verilerimiz olmadığı için bu değişimin epidemiyolojik olarak sıklığını bilmemekteyiz. Veri bankalarında verildiği üzere çok nadir bir değişim olması (Tablo 7) görece yeni oluşan bir varyant olduğunu göstermektedir. Bu şekildeki çok nadir varyantların görülme sıklığı toplumlar arasında çok farklı olabilmekte ve bu da veri bankalarındaki değişimlerin olası etkilerini tahmin etmede zorluklara neden olmaktadır (177–180). Biz de bu nedenle hipotezimizi test etmek için *MTHFR* C677T varyantını homozigot/heterozigot taşıdığını tespit ettiğimiz 125 kontrol grubunda *PHGDH* geni varyantlarını yeni nesil hedefli dizileme ile taramaya karar verdik. Otizm Spektrum Bozukluğu hastaları için dizi hizmeti aldığımız firmaya 125 kontrole ait DNA örnekleri gönderilmiştir. Ancak, bu tez yazım aşamasında olduğundan ve henüz sonuçlar tamamlanmadığı için değerlendirme yapılamamıştır.

OSB tek bir hastalık değil semptomlar ve sendromlar yelpazesinin bir arada olduğu oldukça heterojen bir grup bozukluğa verilen ortak tanımlama/sınıflandırmadır (181). Dolayısıyla genetik ve klinik olarak çok farklı alt grupları olması doğal ve beklenen bir durumdur. OSB ile ilgili genetik/biyokimyasal çalışmalar ilerledikçe ve daha fazla genetik etiyojoloji tanımlandıkça, daha önce aynı şemsiye altında değerlendirilen Rett sendromunun (*MECP2*) bu gruptan ayrılmasında olduğu gibi diğer alt tiplerin tanımlanması ve ayrı bir grup olarak değerlendirilmesi büyük bir ihtimal olarak görülmektedir (17, 182–184). Dolayısıyla, OSB'ye yatkınlık sağlayan (yakalanma riskini önemli oranda artıran) nadir ya da yaygın genetik varyantların veya bunların kombinasyonlarının, ortaya koyulması kanımızca oldukça yararlı bilgilerin bu alana kazandırılmasına vesile olacaktır. Bu çalışmada, bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk kez, L-serin biyosentezinde fonksiyon yapan *PSPH* ve *PHGDH* genlerindeki nadir/yaygın DNA varyantlarının *MTHFR* C677T varyantı ile kombine etkisinin OSB'nin genetik etiyojijisi üzerindeki olası rolü epidemiyolojik olarak araştırılmıştır. Referans veri bankalarında (UCSC gibi) *PHGDH* geni üzerinde frekansı 0.01'den fazla olan yaygın missens değişimlere rastlanmamıştır. *PSPH* geni üzerinde bu veri bankalarında verilmiş olan yaygın değişimler de bizim OSB grubumuzda (*MTHFR* C677T alleli ile) bulunamamıştır ve dolayısıyla etkileri kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilememiştir. Yalnız, *PHGDH* geni üzerinde hedefli yeni nesil dizilemeyle bulunan ve bizim çalışmamızda Sanger dizilemeyle doğrulanan, ebeveynlerdeki durumu analiz edilen yeni ve nadir DNA varyantları oldukça dikkat çekici

bulunmuştur. Bu çalışmanın başlamasına vesile olan OT_49 ailesindeki *PHGDH* geninde kırık tespit ettiğimiz OSB'li bireyi de dahil edersek (bu bireyde *MTHFR* C677T varyantı homozigot idi) toplam 4 OSB hastasında *MTHFR* C677T ve A1298C varyantlarının kombinasyonu (Tablo 7) oldukça ilginç görülmektedir. Bu durumun tamamen şans faktörleriyle de olabileceği göz önüne alınırsa, biyoistatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için kontrol grubumuzdaki bu değişimlerin niteliği önem arz etmektedir. Kontrol grubundan alacağımız veriler çalışmamızın bundan sonraki sürecini etkileyecektir. Anlamlı sonuçlara ulaşmamız durumunda daha fazla OSB ve kontrol gruplarıyla, öncelikle epidemiyolojik olarak çalışmayı ilerletmeyi düşünmekteyiz. Bağımsız gruplarda anlamlı sonuçların alınması ilgili genlerle fonksiyonel çalışmalar yapmamızın da kapısını aralayacaktır.

Sonuç olarak *MTHFR*, *PHGDH* ve *PSPH* genleri üzerindeki nadir /yaygın DNA varyantlarının OSB'nin etiyolojisinde bir risk faktörü olup olmadığını araştırdığımız bu çalışmada, *MTHFR* C677T varyantının OSB ve kontrol grubu arasında hem allel frekansı hem de genotip dağılımları yönünden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığını tespit ettik. Bu sonuç *MTHFR* C677T varyantının tek başına OSB riskini arttırmadığını belirten çalışmalarla uyumludur. Bununla birlikte, toplam 4 OSB hastasında *PHGDH* geni varyasyonları ve *MTHFR* C677T/A1298C varyantlarının kombinasyonu oldukça ilginç ve önemli olabilecek veriler sunmaktadır. Bu kombinasyonun istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için kontrol grubunda yapacağımız dizileme çalışmasının sonuçları önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Battle DE (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). Cudas 25: 191–2.
2. CDC increases estimate of autism's prevalence by 15 percent, to 1 in 59 children Autism Speaks (2018). Available from: <https://www.autismspeaks.org/science-news/cdc-increases-estimate-autisms-prevalence-15-percent-1-59-children>. [Accessed 1 May 2018].
3. Williams SCP (2012). Genetics: Searching for answers. Nature 491: S4–S6.
4. Monaco AP, Bailey AJ (2001). The search for susceptibility genes. The Lancet 358: S3.
5. Berg JM, Geschwind DH (2012). Autism genetics: searching for specificity and convergence. Genome Biology 13: 247.
6. Miles JH (2011). Autism spectrum disorders—A genetics review. Genetics in Medicine 13: 278–294.
7. Codina-Solà M, Rodríguez-Santiago B, Homs A, Santoyo J, Rigau M, Aznar-Lain G, del Campo M, Gener B, Gabau E, Botella MP, Gutiérrez-Arumí A, Antiñolo G, Pérez-Jurado LA, Cuscó I (2015). Integrated analysis of whole-exome sequencing and transcriptome profiling in males with autism spectrum disorders. Molecular Autism 6: 21.
8. Chapman NH, Nato AQ, Bernier R, Ankenman K, Sohi H, Munson J, Patowary A, Archer M, Blue EM, Webb SJ, Coon H, Raskind WH, Brkanac Z, Wijsman EM (2015). Whole exome sequencing in extended families with autism spectrum disorder implicates four candidate genes. Human Genetics 134: 1055–1068.
9. Crooks PA, Tribé MJ, Pinney RJ (1984). Inhibition of bacterial DNA cytosine-5-methyltransferase by S-adenosyl-L-homocysteine and some related compounds. The Journal of Pharmacy and Pharmacology 36: 85–9.
10. Patowary A, Nesbitt R, Archer M, Bernier R, Brkanac Z (2017). Next Generation Sequencing Mitochondrial DNA Analysis in Autism Spectrum Disorder. Autism Research 10: 1338–1343.
11. C Yuen RK, Merico D, Bookman M, L Howe J, Thiruvahindrapuram B, Patel R V., Whitney J, Deflaux N, Bingham J, Wang Z, Pellecchia G, Buchanan JA, Walker S, Marshall CR, Uddin M, Zarrei M, Deneault E, D'Abate L, Chan AJ, Koyanagi S, Paton T, Pereira SL, Hoang N, Engchuan W, Higginbotham EJ, Ho K, Lamoureux S, Li W, MacDonald JR, Nalpathamkalam T, Sung WW, Tsoi FJ, Wei J, Xu L, Tasse

- AM, Kirby E, Van Etten W, Twigger S, Roberts W, Drmic I, Jilderda S, Modi BM, Kellam B, Szego M, Cytrynbaum C, Weksberg R, Zwaigenbaum L, Woodbury-Smith M, Brian J, Senman L, Iaboni A, Doyle-Thomas K, Thompson A, Chrysler C, Leef J, Savion-Lemieux T, Smith IM, Liu X, Nicolson R, Seifer V, Fedele A, Cook EH, Dager S, Estes A, Gallagher L, Malow BA, Parr JR, Spence SJ, Vorstman J, Frey BJ, Robinson JT, Strug LJ, Fernandez BA, Elsabbagh M, Carter MT, Hallmayer J, Knoppers BM, Anagnostou, Szatmari, Ring RH, Glazer D, Pletcher MT, Scherer SW (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience* 20: 602–611.
12. Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium (2017). Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Molecular Autism* 8: 21.
 13. Liu X, Shimada T, Otowa T, Wu YY, Kawamura Y, Tochigi M, Iwata Y, Umekage T, Toyota T, Maekawa M, Iwayama Y, Suzuki K, Kakiuchi C, Kuwabara H, Kano Y, Nishida H, Sugiyama T, Kato N, Chen CH, Mori N, Yamada K, Yoshikawa T, Kasai K, Tokunaga K, Sasaki T, Gau SS (2016). Genome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder in the East Asian Populations. *Autism Research* 9: 340–349.
 14. Besag FMC (2004). Behavioral aspects of pediatric epilepsy syndromes. *Epilepsy & Behavior* 5: 3–13.
 15. White JF (2003). Intestinal Pathophysiology in Autism. *Experimental Biology and Medicine* 228: 639–649.
 16. Ashwood P, Van de Water J (2004). Is autism an autoimmune disease? *Autoimmunity Reviews* 3: 557–562.
 17. Grzadzinski R, Huerta M, Lord C (2013). DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Molecular Autism* 4: 12.
 18. Coury DL (2013). DSM-5 and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* 34: 494–496.
 19. Ma DQ, Rabionet R, Konidari I, Jaworski J, Cukier HN, Wright HH, Abramson RK, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Martin ER (2010). Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B: 477–483.
 20. Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE,

- Farmer JE (2005). Essential versus complex autism: Definition of fundamental prognostic subtypes. *American Journal of Medical Genetics Part A* 135A: 171–180.
21. Miles JH, Takahashi TN, Hong J, Munden N, Flourney N, Braddock SR, Martin RA, Spence MA, Hillman RE, Farmer JE (2008). Development and validation of a measure of dysmorphology: Useful for autism subgroup classification. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A: 1101–1116.
 22. Doshi-Velez F, Ge Y, Kohane I (2014). Comorbidity Clusters in Autism Spectrum Disorders: An Electronic Health Record Time-Series Analysis. *Pediatrics* 133: e54–e63.
 23. Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K, Hutman T, Iverson JM, Landa R, Rogers SJ, Sigman M, Stone WL (2011). Recurrence Risk for Autism Spectrum Disorders: A Baby Siblings Research Consortium Study. *Pediatrics* 128: e488–e495.
 24. Muhle R, Trentacoste S V, Rapin I (2004). The genetics of autism. [Review]. *Pediatrics* 113: e472–e486.
 25. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA (2009). Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 163: 907.
 26. Hallmayer J (2011). Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Archives of General Psychiatry* 68: 1095.
 27. Szatmari P (2003). The causes of autism spectrum disorders. *Bmj* 326: 173–174.
 28. Rapin I, Tuchman RF (2008). Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatric Clinics of North America* 55: 1129–1146.
 29. Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky V-A, Waly M (2008). How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *NeuroToxicology* 29: 190–201.
 30. Sanders SJ (2019). Next-Generation Sequencing in Autism Spectrum Disorder. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 9: a026872.
 31. Guinchat V, Thorsen P, Laurent C, Cans C, Bodeau N, Cohen D (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 91: 287–300.
 32. Kolevzon A, Gross R, Reichenberg A (2007). Prenatal and perinatal risk factors for autism: A review and integration of findings. *Archives of Pediatrics and Adolescent*

Medicine 161: 326-33.

33. Shelton JF, Tancredi DJ, Hertz-Picciotto I (2010). Independent and dependent contributions of advanced maternal and paternal ages to autism risk. *Autism Research* 3: 30–39.
34. Lee BK, Magnusson C, Gardner RM, Blomström Å, Newschaffer CJ, Burstyn I, Karlsson H, Dalman C (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 44: 100–105.
35. Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M (2013). Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *Jama* 309: 1696.
36. Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-Smith J, García-Fiñana M, Kneen R, Lucas SB, Shallcross R, Baker GA, Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 84: 637–643.
37. Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, Park BY, Snyder NW, Schendel D, Volk H, Windham GC, Newschaffer C (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health* 38: 81–102.
38. Croen LA, Zerbo O, Qian Y, Massolo ML, Rich S, Sidney S, Kripke C (2015). The health status of adults on the autism spectrum. *Autism* 19: 814–823.
39. Matson JL, Cervantes PE (2014). Commonly studied comorbid psychopathologies among persons with autism spectrum disorder. *Research in Developmental Disabilities* 35: 952–962.
40. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tancredi DJ, Tassone F, Hertz-Picciotto I (2011). Prenatal Vitamins, One-carbon Metabolism Gene Variants, and Risk for Autism. *Epidemiology* 22: 476–485.
41. Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, Lie KK, Lipkin WI, Magnus P, Reichborn-Kjennerud T, Schjølberg S, Davey Smith G, Øyen AS, Susser E, Stoltenberg C (2013). Association Between Maternal Use of Folic Acid Supplements and Risk of Autism Spectrum Disorders in Children. *JAMA* 309: 570.
42. Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC,

- Tassone F, Hertz-Picciotto I (2012). Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the charge (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96: 80–89.
43. Sfari Gene (2019). Available from: <https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/>. [Accessed 7 May 2019].
 44. Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA (2019). Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. *Journal of Applied Genetics* 60: 37–47.
 45. Wang P, Zhao D, Lachman HM, Zheng D (2018). Enriched expression of genes associated with autism spectrum disorders in human inhibitory neurons. *Translational Psychiatry* 8: 13.
 46. Guo H, Duyzend MH, Coe BP, Baker C, Hoekzema K, Gerds J, Turner TN, Zody MC, Beighley JS, Murali SC, Nelson BJ; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Bamshad MJ, Nickerson DA, Bernier RA, Eichler EE (2019). Genome sequencing identifies multiple deleterious variants in autism patients with more severe phenotypes. *Genetics in Medicine* 21: 1611–1620.
 47. Sanders SJ, Neale BM, Huang H, Werling DM, An JY, Dong S; Whole Genome Sequencing for Psychiatric Disorders (WGSPD), Abecasis G, Arguello PA, Blangero J, Boehnke M, Daly MJ, Eggan K, Geschwind DH, Glahn DC, Goldstein DB, Gur RE, Handsaker RE, McCarroll SA, Ophoff RA, Palotie A, Pato CN, Sabatti C, State MW, Willsey AJ, Hyman SE, Addington AM, Lehner T, Freimer NB (2017). Whole genome sequencing in psychiatric disorders: the WGSPD consortium. *Nature Neuroscience* 20: 1661–1668.
 48. Robert C, Pasquier L, Cohen D, Fradin M, Canitano R, Damaj L, Odent S, Tordjman S (2017). Role of Genetics in the Etiology of Autistic Spectrum Disorder: Towards a Hierarchical Diagnostic Strategy. *International Journal of Molecular Sciences* 18: 618.
 49. Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A, Kendall J, Grabowska E, Ma B, Marks S, Rodgers L, Stepansky A, Troge J, Andrews P, Bekritsky M, Pradhan K, Ghiban E, Kramer M, Parla J, Demeter R, Fulton LL, Fulton RS, Magrini VJ, Ye K, Darnell JC, Darnell RB, Mardis ER, Wilson RK, Schatz MC, McCombie WR, Wigler M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* 74: 285–299.

50. Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE, Smith JD, Paeper B, Nickerson DA, Dea J, Dong S, Gonzalez LE, Mandell JD, Mane SM, Murtha MT, Sullivan CA, Walker MF, Waqar Z, Wei L, Willsey AJ, Yamrom B, Lee YH, Grabowska E, Dalkic E, Wang Z, Marks S, Andrews P, Leotta A, Kendall J, Hakker I, Rosenbaum J, Ma B, Rodgers L, Troge J, Narzisi G, Yoon S, Schatz MC, Ye K, McCombie WR, Shendure J, Eichler EE, State MW, Wigler M (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515: 216–221.
51. Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, Witherspoon K, Gerdts J, Baker C, Vulto-van Silfhout AT, Schuurs-Hoeijmakers JH, Fichera M, Bosco P, Buono S, Alberti A, Failla P, Peeters H, Steyaert J, Vissers LELM, Francescatto L, Mefford HC, Rosenfeld JA, Bakken T, O'Roak BJ, Pawlus M, Moon R, Shendure J, Amaral DG, Lein E, Rankin J, Romano C, de Vries BBA, Katsanis N, Eichler EE (2014). Disruptive CHD8 Mutations Define a Subtype of Autism Early in Development. *Cell* 158: 263–276.
52. Fischbach GD, Lord C (2010). The Simons Simplex Collection: A Resource for Identification of Autism Genetic Risk Factors. *Neuron* 68: 192–195.
53. Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y, Gazzellone MJ, D'Abate L, Deneault E, Howe JL, Liu RS, Thompson A, Zarrei M, Uddin M, Marshall CR, Ring RH, Zwaigenbaum L, Ray PN, Weksberg R, Carter MT, Fernandez BA, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW (2015). Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature Medicine* 21: 185–191.
54. Ji X, Kember RL, Brown CD, Bućan M (2016). Increased burden of deleterious variants in essential genes in autism spectrum disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 15054–15059.
55. Luo W, Zhang C, Jiang Y, Brouwer CR (2018). Systematic reconstruction of autism biology from massive genetic mutation profiles. *Science Advances* 4: e1701799.
56. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z, Vorstman JA, Thompson A, Regan R, Pilorge M, Pellecchia G, Pagnamenta AT, Oliveira B, Marshall CR, Magalhaes TR, Lowe JK, Howe JL, Griswold AJ, Gilbert J, Duketis E, Dombroski BA, De Jonge MV, Cuccaro M, Crawford EL, Correia CT, Conroy J, Conceição IC, Chiacchetti AG, Casey JP, Cai

- G, Cabrol C, Bolshakova N, Bacchelli E, Anney R, Gallinger S, Cotterchio M, Casey G, Zwaigenbaum L, Wittemeyer K, Wing K, Wallace S, van Engeland H, Tryfon A, Thomson S, Soorya L, Rogé B, Roberts W, Poustka F, Mouga S, Minshew N, McInnes LA, McGrew SG, Lord C, Leboyer M, Le Couteur AS, Kolevzon A, Jiménez González P, Jacob S, Holt R, Guter S, Green J, Green A, Gillberg C, Fernandez BA, Duque F, Delorme R, Dawson G, Chaste P, Café C, Brennan S, Bourgeron T, Bolton PF, Bölte S, Bernier R, Baird G, Bailey AJ, Anagnostou E, Almeida J, Wijsman EM, Vieland VJ, Vicente AM, Schellenberg GD, Pericak-Vance M, Paterson AD, Parr JR, Oliveira G, Nurnberger JI, Monaco AP, Maestrini E, Klauck SM, Hakonarson H, Haines JL, Geschwind DH, Freitag CM, Folstein SE, Ennis S, Coon H, Battaglia A, Szatmari P, Sutcliffe JS, Hallmayer J, Gill M, Cook EH, Buxbaum JD, Devlin B, Gallagher L, Betancur C, Scherer SW (2014). Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *The American Journal of Human Genetics* 94: 677–694.
57. Krumm N, O’Roak BJ, Shendure J, Eichler EE (2014). A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends in Neurosciences* 37: 95–105.
 58. Wong CCY, Smith RG, Hannon E, Ramaswami G, Parikshak NN, Assary E, Troakes C, Poschmann J, Schalkwyk LC, Sun W, Prabhakar S, Geschwind DH, Mill J (2019). Genome-wide DNA methylation profiling identifies convergent molecular signatures associated with idiopathic and syndromic autism in post-mortem human brain tissue. *Human Molecular Genetics* 28: 2201–2211.
 59. DeRosa BA, El Hokayem J, Artimovich E, Garcia-Serje C, Phillips AW, Van Booven D, Nestor JE, Wang L, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA, Cukier HN, Nestor MW, Dykxhoorn DM (2018). Convergent Pathways in Idiopathic Autism Revealed by Time Course Transcriptomic Analysis of Patient-Derived Neurons. *Scientific Reports* 8: 8423.
 60. Quesnel-Vallièrès M, Weatheritt RJ, Cordes SP, Blencowe BJ (2019). Autism spectrum disorder: insights into convergent mechanisms from transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 20: 51–63.
 61. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 474: 380–384.
 62. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, Mahajan M, Manaa

- D, Pawitan Y, Reichert J, Ripke S, Sandin S, Sklar P, Svantesson O, Reichenberg A, Hultman CM, Devlin B, Roeder K, Buxbaum JD (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics* 46: 881–885.
63. Database of Genomic Variants (2019). Available from: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. [Accessed 15 May 2019].
 64. Clinical Genome Resource (2019). Available from: <https://clinicalgenome.org/>. [Accessed 17 May 2019].
 65. Database Of Genomic Variation And Phenotype In Humans Using Ensembl Resources (Decipher) (2019). Available from: <https://decipher.sanger.ac.uk/>. [Accessed 17 May 2019].
 66. Sfarī Gene/Cnv (2019). Available from: <https://gene.sfari.org/database/cnv/>. [Accessed 7 May 2019].
 67. Takumi T, Tamada K (2018). CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 48: 183–192.
 68. Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Tucker E, Turner L, Marshall CR, Scherer SW (2010). Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics* 47: 195–203.
 69. Velinov M (2019). Genomic Copy Number Variations in the Autism Clinic—Work in Progress. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13: 57.
 70. Schaevitz LR, Berger-Sweeney JE (2012). Gene-Environment Interactions and Epigenetic Pathways in Autism: The Importance of One-Carbon Metabolism. *Ilar Journal* 53: 322–340.
 71. Schaevitz L, Berger-Sweeney J, Ricceri L (2014). One-carbon metabolism in neurodevelopmental disorders: Using broad-based nutraceuticals to treat cognitive deficits in complex spectrum disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 46: 270–284.
 72. James SJ (2013). Autism and Folate-dependent One-carbon Metabolism: Serendipity and Critical Branch-point Decisions in Science. *Global Advances in Health and Medicine* 2: 48–51.
 73. Howsmon DP, Kruger U, Melnyk S, James SJ, Hahn J (2017). Classification and

- adaptive behavior prediction of children with autism spectrum disorder based upon multivariate data analysis of markers of oxidative stress and DNA methylation. (C. A. Ouzounis, editor) *Plos Computational Biology* 13: e1005385.
74. Ducker GS, Rabinowitz JD (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism* 25: 27–42.
 75. Paşca SP, Dronca E, Kaucsár T, Craciun EC, Endreffy E, Ferencz BK, Iftene F, Benga I, Cornean R, Banerjee R, Dronca M (2009). One carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13: 4229–4238.
 76. Neggers Y (2014). The Relationship between Folic Acid and Risk of Autism Spectrum Disorders. *Healthcare* 2: 429–444.
 77. Frye RE, James SJ (2014). Metabolic pathology of autism in relation to redox metabolism. *Biomarkers in Medicine* 8: 321–330.
 78. Frye RE, Slattery JC, Quadros E V. (2017). Folate metabolism abnormalities in autism: potential biomarkers. *Biomarkers in Medicine* 11: 687–699.
 79. Gu F, Chauhan V, Chauhan A (2015). Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18: 89–95.
 80. Pu D, Shen Y, Wu J (2013). Association between MTHFR Gene Polymorphisms and the Risk of Autism Spectrum Disorders: A Meta-Analysis. *Autism Research* 6: 384–392.
 81. Goin-Kochel RP, Porter AE, Peters SU, Shinawi M, Sahoo T, Beaudet AL (2009). The MTHFR 677 C→T polymorphism and behaviors in children with autism: exploratory genotype-phenotype correlations. *Autism Research* 2: 98–108.
 82. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R (2018). Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational Psychiatry* 8: 242.
 83. Desai A, Sequeira JM, Quadros E V. (2016). The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* 126: 31–42.
 84. Pérez-Dueñas B, Ormazábal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano M, Sierra C, De Grandis E, Marfa MP, García-Cazorla A, Campistol J, Pascual JM, Artuch R (2011). Cerebral folate deficiency syndromes in childhood: Clinical, analytical, and etiologic aspects. *Archives of Neurology* 68: 5
 85. Ramaekers V, Sequeira JM, Quadros E V. (2013). Clinical recognition and aspects of the cerebral folate deficiency syndromes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

51: 3.

86. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM (2015). Spina bifida. *Nature Reviews Disease Primers* 1: 15007.
87. Hiraoka M, Kagawa Y (2017). Genetic polymorphisms and folate status. *Congenital Anomalies* 57: 142–149.
88. Chandler CJ, Harrison DA, Buffington CA, Santiago NA, Halsted CH (1991). Functional specificity of jejunal brush-border pteroylpolyglutamate hydrolase in pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 260: G865–G872.
89. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006). Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* 127: 917–928.
90. Xin W, Feng S, Freisheim JH, Gentry LE, Ratnam M (1992). Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates. *Biochemical Pharmacology* 44: 1898–1901.
91. Kamen B (2004). A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 1085–1097.
92. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE (1988). Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 263: 15946–15950.
93. Chen Y, Han M, Matsumoto A, Wang Y, Thompson DC, Vasiliou V (2018). Glutathione and Transsulfuration in Alcohol-Associated Tissue Injury and Carcinogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* ss 37–53.
94. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R (2000). The Quantitatively Important Relationship between Homocysteine Metabolism and Glutathione Synthesis by the Transsulfuration Pathway and Its Regulation by Redox Changes *Biochemistry* 39: 13005–13011.
95. Ganguly P, Alam SF (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* 14: 6.
96. Schwahn B, Rozen R (2001). Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *American Journal of Pharmacogenomics* 1: 189–201.

97. Main PA, Angley MT, Thomas P, O'Doherty CE, Fenech M (2010). Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1598–1620.
98. Das SK, Kunkel TA, Loeb LA (1985). Effects of Altered Nucleotide Concentrations on the Fidelity of DNA Replication. *Genetic Consequences of Nucleotide Pool Imbalance* Boston, MA: Springer US, ss 117–126.
99. Solomons NW (1997). Present Knowledge in Nutrition, 7th ed. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 1575–1576.
100. Barbato JC, Catanescu O, Murray K, DiBello PM, Jacobsen DW (2007). Targeting of Metallothionein by L-Homocysteine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27: 49–54.
101. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics* 7: 195–200.
102. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG (2000). Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *European Journal of Human Genetics* 8: 725–729.
103. Bagley PJ, Selhub J (1998). A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 13217–13220.
104. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, vd. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10: 111–113.
105. Santos MERC, das C. L. e Silva F, Gomes KB, Fernandes APM, Freitas FR, Faria MC, Mota APL, Carvalho MG (2011). Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase and in cystathionine beta synthase: is there a link to homocysteine levels in peripheral arterial disease? *Molecular Biology Reports* 38: 3361–3366.
106. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G (1988). Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *American journal of human genetics* 43: 414–21.
107. Pereira AC, Schetttert IT, Morandini Filho AAF, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE

- (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clinica Chimica Acta* 340: 99–105.
108. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998). A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics and Metabolism* 64: 169–172.
 109. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993). Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clinical Chemistry* 39: 1764–1779.
 110. Villagonzalo K-A, Dodd S, Dean O, Gray K, Tonge B, Berk M (2010). Oxidative pathways as a drug target for the treatment of autism. *Expert opinion on therapeutic targets* 14: 1301–1310.
 111. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, Cutler P, Bock K, Boris M, Bradstreet JJ, Baker SM, Gaylor DW (2006). Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B: 947–956.
 112. Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, Gehn E, Loresto M, Mitchell J, Atwood S, Barnhouse S, Lee W (2011). Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutrition & Metabolism* 8: 34.
 113. Melnyk S, Fuchs GJ, Schulz E, Lopez M, Kahler SG, Fussell JJ, Bellando J, Pavliv O, Rose S, Seidel L, Gaylor DW, James SJ (2012). Metabolic imbalance associated with methylation dysregulation and oxidative damage in children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 42: 367–377.
 114. Guo T, Chen H, Liu B, Ji W, Yang C (2012). Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms C677T and Risk of Autism in the Chinese Han Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 16: 968–973.
 115. Park J, Ro M, Pyun J-A, Nam M, Bang HJ, Yang JW, Choi K-S, Kim SK, Chung J-H, Kwack K (2014). MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Research* 215: 258–259.
 116. Santos PAC Dos, Longo D, Brandalize APC, Schüler-Faccini L (2010). MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. *Psychiatric*

Genetics 20: 187–189.

117. Sener EF, Oztop DB, Ozkul Y (2014). MTHFR Gene C677T Polymorphism in Autism Spectrum Disorders. *Genetics Research International* 2014: 1–5.
118. Rai V (2016). Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility. *Metabolic Brain Disease* 31: 727–735.
119. Locasale JW (2013). Serine, glycine and the one-carbon cycle: cancer metabolism is full circle. *Nature Reviews Cancer* 13: 572–583.
120. Furuya S, Watanabe M (2003). Novel neuroglial and glioglia relationships mediated by L-serine metabolism. *Archives of Histology and Cytology* 66: 109–121.
121. Tabatabaie L, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ (2010). l-Serine synthesis in the central nervous system: A review on serine deficiency disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* 99: 256–262.
122. Jaeken J, Häberle J, Dulac O (2016). Disorders of Glutamine, Serine and Asparagine Metabolism. *Inborn Metabolic Diseases Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*, ss 357–362.
123. van der Crabben SN, Verhoeven-Duif NM, Brilstra EH, Van Maldergem L, Coskun T, Rubio-Gozalbo E, Berger R, de Koning TJ (2013). An update on serine deficiency disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36: 613–619.
124. De Koning Tj, Snell K, Duran M, Berger R, Poll-The B-T, Surtees R (2003). l-Serine in disease and development. *Biochemical Journal* 371: 653–661.
125. El-Hattab AW, Shaheen R, Hertecant J, Galadari HI, Albaqawi BS, Nabil A, Alkuraya FS (2016). On the phenotypic spectrum of serine biosynthesis defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 39: 373–381.
126. Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka H, Hashikawa T, Itohara S, Hirabayashi Y (2004). Targeted Disruption of the Mouse 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Gene Causes Severe Neurodevelopmental Defects and Results in Embryonic Lethality. *Journal of Biological Chemistry* 279: 3573–3577.
127. Takeichi T, Okuno Y, Kawamoto A, Inoue T, Nagamoto E, Murase C, Shimizu E, Tanaka K, Kageshita Y, Fukushima S, Kono M, Ishikawa J, Ihn H, Takahashi Y, Akiyama M (2018). Reduction of stratum corneum ceramides in Neu-Laxova syndrome caused by phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *Journal of Lipid*

Research 59: 2413–2420.

128. Yang JH, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita MO, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitzu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y, Furuya S (2010). Brain-specific Phgdh Deletion Reveals a Pivotal Role for l-Serine Biosynthesis in Controlling the Level of d-Serine, an N - methyl-d-aspartate Receptor Co-agonist, in Adult Brain. *Journal of Biological Chemistry* 285: 41380–41390.
129. Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M (2001). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 7691–704.
130. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115–e115.
131. UCSC Genome Browser Home (2019). Available from: <https://genome.ucsc.edu/>. [Accessed 12 May 2019].
132. National Center for Biotechnology Information (2019). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Accessed 26 June 2019].
133. The European Bioinformatics Institute < Embl-Ebi (2019). Available from: <https://www.ebi.ac.uk/>. [Accessed 08 June 2019].
134. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods* 11: 361–362.
135. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7: 248–249.
136. Ng PC, Henikoff S (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* 31: 3812–4.
137. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research* 37: e67–e67.
138. OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies (2019). Available from: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>. [Accessed 9 July 2019]

139. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2009). Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* 169: 505–514.
140. Sen S, Burmeister M (2008). Hardy-Weinberg analysis of a large set of published association studies reveals genotyping error and a deficit of heterozygotes across multiple loci. *Human genomics* 3: 36–52.
141. Human Splicing Finder - Version 3.1 (2019). Available from: <http://www.umd.be/HSF/>. [Accessed 5 June 2019].
142. Sherry ST (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* 29: 308–311.
143. gnomAD (2019). Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>. [Accessed 9 June 2019].
144. The Worldwide PDB (wwPDB) (2019). Available from: <http://www.wwpdb.org/>. [Accessed 7 June 2019].
145. PHGDH (human) (2019). Available from: <http://www.wwpdb.org/>. [Accessed 9 June 2019].
146. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* (Washington, DC : 2002) 63: 1–21.
147. Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research* 5: 160–179.
148. Hansen SN, Schendel DE, Parner ET (2015). Explaining the Increase in the Prevalence of Autism Spectrum Disorders. *Jama Pediatrics* 169: 56.
149. King M, Bearman P (2009). Diagnostic change and the increased prevalence of autism. *International Journal of Epidemiology* 38: 1224–1234.
150. Chaste P, Leboyer M (2012). Autism risk factors: Genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 14: 281–292.
151. Santangelo SL, Tsatsanis K (2005). What is Known About Autism. *American Journal of Pharmacogenomics* 5: 71–92.

152. Ali A, Waly MI, Al-Farsi YM, Essa MM, Al-Sharbati MM, Deth RC (2011). Hyperhomocysteinemia among Omani autistic children: a case-control study. *Acta Biochimica Polonica* 58: 547–551.
153. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla Bernardina B, Bonassi S (2012). Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 2128–2141.
154. El-Ansary A, Bjørklund G, Chirumbolo S, Alnakhli OM (2017). Predictive value of selected biomarkers related to metabolism and oxidative stress in children with autism spectrum disorder. *Metabolic Brain Disease* 32: 1209–1221.
155. James SJ, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv O, Hubanks A, Gaylor DW (2009). Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89: 425–430.
156. Frye RE, DeLaTorre R, Taylor H, Slattery J, Melnyk S, Chowdhury N, James SJ (2013). Redox metabolism abnormalities in autistic children associated with mitochondrial disease. *Translational Psychiatry* 3: e273–e273.
157. Frye RE, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv O, Hubanks A, Gaylor DW, Walters L, James SJ (2013). Effectiveness of Methylcobalamin and Folinic Acid Treatment on Adaptive Behavior in Children with Autistic Disorder Is Related to Glutathione Redox Status. *Autism Research and Treatment* 2013: 1–9.
158. Carr DF, Whiteley G, Alfirovic A, Pirmohamed M (2009). Investigation of inter-individual variability of the one-carbon folate pathway: a bioinformatic and genetic review. *The Pharmacogenomics Journal* 9: 291–305.
159. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL (2007). Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction Update* 13: 225–238.
160. Yang Y, Chen J, Wang B, Ding C, Liu H (2015). Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 103: 488–500.
161. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, and the MTHFR Studies Collaboration Group (2002). MTHFR 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease. *Jama* 288: 2023.

162. Xie S-Z, Liu Z-Z, Yu J, Liu L, Wang W, Xie D-L, Qin J-B (2015). Association between the MTHFR C677T polymorphism and risk of cancer: evidence from 446 case–control studies. *Tumor Biology* 36: 8953–8972.
163. Rai V (2017). Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Alzheimer Disease Risk: a Meta-Analysis. *Molecular Neurobiology* 54: 1173–1186.
164. Yadav U, Kumar P, Gupta S, Rai V (2016). Role of MTHFR C677T gene polymorphism in the susceptibility of schizophrenia: An updated meta-analysis. *Asian Journal of Psychiatry* 20: 41–51.
165. Liew S-C, Gupta E, Das (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics* 58: 1–10.
166. Delshadpour M, Mashayekhi F, Bidabadi E, Salehi Z (2017). MTHFR rs1801133 Gene Polymorphism and Autism Susceptibility. *Caspian Journal of Neurological Sciences* 3: 39–45.
167. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA (2004). Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1611–1617.
168. Suh JH, Walsh WJ, McGinnis WR, Lewis A, Ames BN (2008). Altered Sulfur Amino Acid Metabolism In Immune Cells of Children Diagnosed With Autism. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4: 105–113.
169. Tu M-C, Huang C-W, Chen N-C, Chang W-N, Lui C-C, Chen C-F, Chen C, Wang Y-L, Lin Y-T, Chang C-C (2010). Hyperhomocysteinemia in Alzheimer dementia patients and cognitive decline after 6 months follow-up period. *Acta neurologica Taiwanica* 19: 168–77.
170. Álvarez-Satta M, Castro-Sánchez S, Pousada G, Valverde D (2017). Functional analysis by minigene assay of putative splicing variants found in Bardet-Biedl syndrome patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21: 2268–2275.
171. Kallel-Bouattour R, Belguith-Maalej S, Zouari-Bradai E, Mnif M, Abid M, Hadj Kacem H (2017). Intronic variants of SLC26A4 gene enhance splicing efficiency in hybrid minigene assay. *Gene* 620: 10–14.
172. Yan X-B, Tang C-H, Huang Y, Fang H, Yu Z-Q, Wu L-M, Liu R-Y (2010).

Alternative splicing in exon 9 of glucocorticoid receptor pre-mRNA is regulated by SRp40. *Molecular Biology Reports* 37: 1427–1433.

173. UniProtKB - P78330 (Serb_Human) (2019). Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P78330>. [Accessed 2 June 2019].
174. Klomp LW, de Koning TJ, Malingré HE, van Beurden EA, Brink M, Opdam FL, Duran M, Jaeken J, Pineda M, Van Maldergem L, Poll-The BT, van den Berg IE, Berger R (2000). Molecular Characterization of 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Deficiency—a Neurometabolic Disorder Associated with Reduced L-Serine Biosynthesis. *The American Journal of Human Genetics* 67: 1389–1399.
175. Pind S, Slominski E, Mauthe J, Pearlman K, Swoboda KJ, Wilkins JA, Sauder P, Natowicz MR (2002). V490M, a Common Mutation in 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Deficiency, Causes Enzyme Deficiency by Decreasing the Yield of Mature Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 277: 7136–7143.
176. Tabatabaie L, de Koning TJ, Geboers AJJM, van den Berg IET, Berger R, Klomp LWJ (2009). Novel mutations in 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) are distributed throughout the protein and result in altered enzyme kinetics. *Human Mutation* 30: 749–756.
177. Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Arcos-Burgos M, Zhao Q, Matthews N, Newman DP, Johnson B, Vance A, Heussler HS, Levy F, Easteal S, Wray NR, Kenny E, Morris D, Kent L, Gill M, Bellgrove MA (2017). Rare DNA variants in the brain-derived neurotrophic factor gene increase risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a next-generation sequencing study. *Molecular Psychiatry* 22: 580–584.
178. Asimit J, Zeggini E (2010). Rare Variant Association Analysis Methods for Complex Traits. *Annual Review of Genetics* 44: 293–308.
179. Martin Ar, Tse G, Bustamante Cd, Kenny Ee (2013). Imputation-Based Assessment Of Next Generation Rare Exome Variant Arrays. *Biocomputing 2014 World Scientific*, Ss 241–252.
180. Bomba L, Walter K, Soranzo N (2017). The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biology* 18: 77.
181. Fung LK, Hardan AY (2014). Autism in DSM-5 under the microscope: Implications to patients, families, clinicians, and researchers. *Asian Journal of Psychiatry* 11: 93–97.
182. Wen Y, Alshikho MJ, Herbert MR (2016). Pathway Network Analyses for Autism

Reveal Multisystem Involvement, Major Overlaps with Other Diseases and Convergence upon MAPK and Calcium Signaling. (V. W. Hu, editor) Plos One 11: e0153329.

183. Geurts H, Sinzig J, Booth R, Happé F (2014). Neuropsychological heterogeneity in executive functioning in autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Disabilities* 60: 155–162.
184. Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, Orteschi D, Collins JS, Zollino M, Visconti P, Dupont B, Tiziano D, Schroer RJ, Neri G, Stevenson RE, Gurrieri F, Schwartz CE (2013). Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European Journal of Human Genetics* 21: 310–316.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

 **T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI**

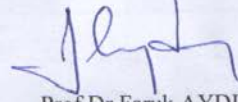
Sayı : 24237859- 106
Konu: Etik kurul onay belgesi

24/02/2016

Sayın; Y.Doç.Dr.Bayram TORAMAN
Tıbbi Biyoloji ABD.

“Resiprokal Kromozomal Translokasyon Görülen Otizm Spektrum Bozukluğu Hastalarında Genetik Etiyolojinin Araştırılması” başlıklı etik kurul 2016/24 no.lu çalışması raporör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61080 – Trabzon / TÜRKİYE

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat
Şerafettin YILMAZ
@nneta

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Resiprokal Kromozomal Translokasyon Görülen Otizm Spektrum Bozukluğunda Hastalarında Genetik Etiyolojinin Araştırılması"		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2016/24		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Y.Doç.Dr.Bayram TORAMAN		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ersan KALAY, Prof.Dr.Sema TANRIÖVER KANDİL		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☒		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

ETİĞİTİM NİTELİĞİ	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
ETİĞİTİM KURULU NİTELİĞİ	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	MÜHÜR	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	TEAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐		

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2	Tarih: 22/02/2016
	Y.Doç.Dr.Bayram TORAMAN'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan "Resiprokal Kromozomal Translokasyon Görülen Otizm Spektrum Bozukluğu Hastalarında Genetik Etiyolojinin Araştırılması" başlıklı 2016/24 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLİ
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Evrim Ö. KARAGÜZEL Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLİ
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı Burak Kaan KASAP
Uyruğu T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri 02.06.1991 TRABZON
Telefon 0546 274 99 61
E-Posta hucredoktoru@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji AbD.	2017- Devam
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi/Fen Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2014
Lise	Beşikdüzü İMKB Fen Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce