

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

***Cc2d1a* Heterozigot Farelerde *Neurl1* ve *5Htr1a* Genleri ile *miR-19a-1*  
ve *miR-19b-1* Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi**

**Hazırlayan**  
**Fatma ŞİMŞEK**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2018**  
**KAYSERİ**

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

***Cc2d1a* Heterozigot Farelerde *Neurl1* ve *5Htr1a* Genleri ile *miR-19a-1*  
ve *miR-19b-1* Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan**  
**Fatma ŞİMŞEK**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TYL-2015-5998 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2018**  
**KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı Soyadı :** Fatma ŞİMŞEK

**İmza:**

**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL** danışmanlığında **Fatma ŞİMŞEK** tarafından hazırlanan “*Cc2d1a* Heterozigot Farelerde *Neurl1* ve *5Htr1a* Genleri ile *miR-19a-1* ve *miR-19b-1* Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

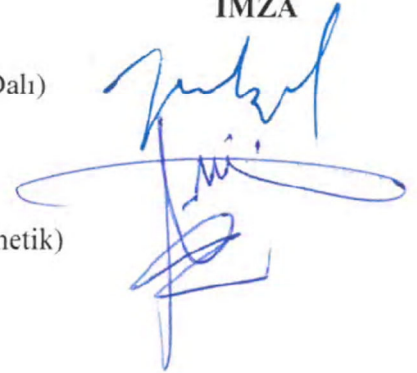
16 /08 /2018

**JÜRİ**

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Çetin SAATÇI (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysun ADAN (Moleküler Biyoloji ve Genetik)

**İMZA****ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve .....

sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ**

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana destek veren bilgi ve birikimiyle bana yardımcı olan ve çalışmalarımı yönlendiren çok değerli hocam ve danışmanım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a ,

Yüksek lisansa ilk başladığım günden beri her türlü beni destekleyen, samimiyetini hep hissettiğim değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Serpil TAHERİ ve Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e ayrıca Prof.Dr. Minoo Rassoulzadegan'a

Bu tezin hazırlanmasında desteklerini gösteren arkadaşlarım Kezban KORKMAZ BAYRAMOV, Müge Gülcihan ÖNAL, Fatma DAL'a, Armağan CANER'e ve tüm GENKÖK ailesine,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, yanımda olduklarını her zaman hissettiren sevgili aileme, her zaman her konuda beni destekleyen sevgili eşim Orbay Çağlayan ŞİMŞEK ve kızım Ayşe Simay ŞİMŞEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

**Fatma ŞİMŞEK**  
**KAYSERİ 2018**

***Cc2d1a* Heterozigot Farelerde *Neurl1* ve *5Htr1a* Genleri ile *miR-19a-1* ve *miR-19b-1* Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi**

**Fatma ŞİMŞEK**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2018**

**Danışman: Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL**

**ÖZET**

Otizm, beyin gelişimi sırasında oluşan bozukluklardan kaynaklanan, erkeklerde, kızlara göre 4-5 kat daha fazla görülen nörolojik bir hastalıktır. Otizmin genel belirtileri; anormal sosyal davranışlar, iletişim eksiklikleri ve tekrarlayan davranışlardır. Otizm hastalarının klinik belirtilerinde bilişsel gerilik (ID)'de gözlenmektedir. *CC2D1A* geninin ID gelişiminde anahtar rol oynadığı gibi, otizmin de aday genlerinden biri olduğu ve buna yönelik fare modelleme çalışmalarının az sayıda olduğu bilinmektedir. Bu nedenlerle otistik *Cc2d1a* geni silinmiş (heterozigot (+/-)) fare modellerinde RNA aracılı kalıtımın jenerasyonlar arasında nasıl geçiş yaptığını araştırmayı amaçladık. Bu nedenle F1, F2 kuşaklarını ürettiğimiz grupların, *Cc2d1a* heterozigot (+/-)ve *Cc2d1a* normal (+/+) genotipteki erkek farelere öğrenme ve hafızayı ölçmeye yönelik davranış testleri (yeni nesne ve delikli tahta) uygulanmış ve hipokampus (öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki rolünü araştırmak için) ile sperm (paternal kalıtımı araştırmak için) örneklerinden RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinden *Cc2d1a* geni ile ilişkili olduğu literatürde bildirilen *5Htr1a*, *Neurl1* genleri ve *miR-19a-1*, *miR-19b-1*'nin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara göre; genlerin ve miRNA'ların ekspresyonlarında farklanma tespit edilmiştir fakat bu farklanma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bilgilerle beraber *5Htr1a* geninin testislerde ekspresyonu olmasına rağmen yaptığımız çalışmada sperm RNA'larında bazı gruplarda ekspresyonunun olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma *Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1* genleri ile *miR-19a* ve *miR-19b-1* arasındaki ilişkiye bakılan literatürdeki ilk çalışmadır. Örnek sayısı artırılarak çalışma yapıldığında bu farklanmaların istatistiksel olarak anlamlı olacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Otizm, miRNA, Hipokampus, Sperm, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, *Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1*, *miR-19a-1*, *miR-19b-1*

**Investigation of Expression Levels of *miR-19a-1* and *miR-19b-1* with Genes of *Neurl1* and *5Htr1a* in Heterozygote Mice of *Cc2d1a***

**Fatma ŞİMŞEK**

**Erciyes University, Institute of Health Science**

**Medical Genetics Dept.**

**Master Thesis, August 2018**

**Supervisor: Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL**

**ABSTRACT**

Autism is a neurological disorder that occurs 4-5 times more frequently in males than in females that occur due to disorders during brain development. Common symptoms of autism are; abnormal social behavior, lack of communication, and repetitive behaviors. Cognitive retardation (ID) is also observed in the clinical manifestations of autism patients. It is known that the *CC2D1A* gene plays a key role in the development of ID as well as that it is one of the candidate genes in autism and there are few mouse modeling studies about it. We therefore aim to investigate how RNA-mediated inheritance transitions between generations in autistic *Cc2d1a* gene deletion (heterozygous (+ / -)) mouse models. For this reason, behavioral tests (novel object and hole board) to measure learning and memory were applied to male mice of groups F1, F2 breeds, with *Cc2d1a* heterozygote (+/-) and *Cc2d1a* normal (+ / +) genotypes and RNA was isolated from hippocampus (to explore its role in learning and memory functions) and sperm (to investigate paternal inheritance) samples. Expression levels of the *5HTR1a*, *Neurl1* genes and *miR-19a-1*, *miR-19b-1* which are reported in the literature to be associated with the *Cc2d1a* gene of the isolated RNA samples have been determined. According to the results obtained in our study; differences in expression of genes and miRNAs were detected, but this difference was not statistically significant. In addition to this information, even though *5HTR1a* gene has expression in the testicles, we have detected that there is no expression in some groups of sperm RNAs in our study. This is the first study in the literature to examine the relationship between *Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1* genes and *miR-19a* and *miR-19b-1*. We think that these differences will be statistically significant when the sample size is increased.

**Keywords:** Autism, miRNA, Hippocampus, Sperm, Real Time Polymerase Chain Reaction, *Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1*, *miR-19a-1*, *miR-19b-1*

## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK .....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK .....	ii
ONAY .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	x
TABLolar LİSTESİ .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1.OTİZM .....	3
2.1.1.OTİZMİN SINIFLANDIRILMASI .....	4
2.1.2.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDAN ETKİLENME DÜZEYLERİ .....	5
2.1.3.EPİDEMİYOLOJİ .....	5
2.1.4.OTİZMİN SEBEPLERİ .....	5
2.1.4.1.GENETİK SEBEPLER .....	5
2.1.4.1.1.RNA KALITIMI ve EPİGENETİK FAKTÖRLER ...	8
2.1.4.1.1.1.Kodlanmayan RNA'lar .....	9
2.1.4.2.GENETİK OLMAYAN SEBEPLER .....	10
2.2.PATERNAL KALITIM .....	10
2.3.ÖĞRENME VE HAFIZADAN SORUMLU BEYNİN BÖLGESİ: HİPOKAMPUS .....	11
2.4.HAYVAN MODELİ BELİRLEME .....	11
2.5.GENLER .....	12
2.5.1.Cc2d1a ve 5Htr1a GENİ .....	12
2.5.2.Neurl1 GENİ .....	14
2.6.MİKRORNA'LAR .....	14
2.6.1.miR-19a-1 ve miR-19b-1 .....	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
3.1.GEREÇLER .....	15



3.1.1.Demirbaş Malzemeler .....	15
3.1.2.Sarf Malzemeler .....	16
3.2.YÖNTEM.....	16
3.2.1.Hayvanların barındırılması ve deney grupları .....	16
3.2.2.deney gruplarının oluşturulması .....	17
3.2.2.1.Grup1 'in Oluşturulması .....	17
3.2.2.2.Grup2 'nin Oluşturulması .....	17
3.2.2.3.Kontrol Grubunun Oluşturulması .....	18
3.2.3.DNA İzolasyonu .....	18
3.2.4.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Jel Elektroforezi .....	19
3.2.5.Davranış Deneyleri .....	19
3.2.5.1.Yeni Nesne (Novel Object) .....	20
3.2.5.2.Delikli Tahta (Hole Board) .....	20
3.2.6. <i>Cc2d1a</i> heterozigot (+/-) ve normal (+/+) farelerden Hipokampus Dokusu ve Sperm Numunelerinin Elde Edilmesi.....	21
3.2.7.RNA İzolasyonu .....	22
3.2.7.1.Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu .....	22
3.2.7.2.Spermden RNA İzolasyonu.....	23
3.2.8.Ekspresyon Çalışmaları.....	24
3.2.8.1.Gen Ekspresyonu .....	24
3.2.8.1.1.cDNA Sentezi.....	24
3.2.8.1.2. <i>ACTB</i> , <i>5Htr1a</i> ve <i>Neurl1</i> Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.8.3.1. <i>Cc2d1a</i> Geni mRNA Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi ..	26
3.2.8.2.miRNA Ekspresyonu .....	27
3.2.8.2.1. DNA SENTEZİ .....	27
3.2.8.2.2. <i>miR-19a-1</i> ve <i>miR-19b-1</i> Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi .....	27
3.2.9.İstatistiksel Analiz.....	28
4.BULGULAR.....	29
4.1.DAVRANIŞ TESTLERİNİN BULGULARI .....	30
4.1.1.DELİKLİ TAHTA (HOLE BOARD) .....	30
4.1.2.YENİ NESNE (NOVEL OBJECT) .....	31
4.2.EKSPRESYON BULGULARI.....	33
4.2.1.Gen Ekspresyonu .....	33

4.2.1.1.Hipokampus Dokusundan <i>Cc2d1a</i> Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri .....	33
4.2.1.2.Hipokampus Dokusundan <i>5Htr1a</i> ve <i>Neurl1</i> Genlerinin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri .....	34
4.2.1.3.Sperm Dokusunda <i>Cc2d1a</i> Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri .....	36
4.2.1.4.Sperm Dokusunda <i>5Htr1a</i> ve <i>Neurl1</i> Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri .....	36
4.2.2.miRNA EKSPRESYONU.....	38
4.2.2.1.Hipokampus Dokusundan <i>miR-19a-1</i> ve <i>miR-19b-1</i> 'nin Ekspresyon Seviyeleri .....	38
4.2.2.2.Sperm Dokusundan <i>miR-19a-1</i> ve <i>miR-19b-1</i> 'nin Ekspresyon Seviyeleri.....	39
5.TARTIŞMA SONUÇ .....	41
6.KAYNAKLAR .....	47
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR VE SİMGELER

<i>5Htr1a</i>	5-hydroxytryptamine receptor 1A
Akt	AKTserine/threonine kinase 1
ASD	Autism Spectrum Disorders
AZF	Azoospermia Faktör
Bp	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
<i>Cc2d1a</i>	coiled-coil and C2 domain containing 1A
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
Dntp	Deoksiribonükleotidtrifosfat
DSM-III	Diagnostic and statistical manual of mental disorders -3
DSM-IV	Diagnostic and statistical manual of mental disorders -3
DSM-V	Diagnostic and statistical manual of mental disorders -3
EÜHADYEK	Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu
ID	Bilişsel Gerilik
MB	Medulloblastoma
<i>miR-19a-1</i>	microRNA 19a
<i>miR-19b-1</i>	microRNA 19b
miRNA	mikroRNA
MR	Mental Retardasyon
ncRNA	Kodlanmayan RNA
<i>Neurl1</i>	Neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
piRNA	piwi-etkileşen RNA
Rpm	Revolutions per Minute
siRNA	Küçük engelleyici RNA
Std	Standart

## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> DSM-III, DSM-IV ve DSM-V arasındaki farklılıklar, (9).....	4
<b>Tablo 2.2:</b> DSM-5'e göre çocukların OSB'dan etkilenme düzeyleri, (6).....	5
<b>Tablo 2.3:</b> Otizm ile ilişkilendirilen genetik sendromlardan bazıları, (26) .....	6
<b>Tablo 2.4:</b> Otizmi etkileyen faktörler, (3,27,28).....	7
<b>Tablo 2.5:</b> Bazı ncRNA'lar ve fonksiyonları, (26) .....	9
<b>Tablo 3.1:</b> Gruplar, Jenerasyonlar ve Çiftleştirme .....	18
<b>Tablo 4.1:</b> Delikli Tahta Davranış Testi Uygulanan Deney Hayvanlarının "Başını Delğe Sokma Sayısı" ve "Defekasyon Sayısı" standart sapma ve p değerleri .....	31
<b>Tablo 4.2:</b> Yeni Nesne Davranış Testi "Merkezde Geçirilen Toplam Yol", "Merkezde Geçirilen Ortalama Hız" ve "Nesneler Etrafında Geçirilen Toplam Zaman" standart sapma ve p değerleri.....	33
<b>Tablo 4.3:</b> Hipokampus dokusunda <i>Cc2d1a</i> , <i>5Htr1a</i> ve <i>Neurl1</i> genlerinin kontrol ve gruplar arasındaki standart sapma ve p değerleri .....	35
<b>Tablo 4.4:</b> Sperm dokusunda <i>Cc2d1a</i> , <i>5Htr1a</i> ve <i>Neurl1</i> genlerinin kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri .....	37
<b>Tablo 4.5:</b> Hipokampus dokusunda <i>miR-19a-1</i> ve <i>miR-19b-1</i> 'nin kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri .....	39
<b>Tablo 4.6:</b> Sperm dokusunda <i>miR-19a-1</i> ve <i>miR-19b-1</i> 'nin kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri.....	42

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> Otizm spektrum bozukluklarının sebepleri, (26) .....	8
<b>Şekil 2.2:</b> Beyin ve Hipokampus, (51).....	11
<b>Şekil 2.3:</b> <i>Cc2d1a</i> proteini, (55).....	12
<b>Şekil 3.1:</b> Yeni Nesne (Novel Object) deney düzeneği .....	20
<b>Şekil 3.2:</b> Delikli Tahta (Hole Board) deney düzeneği.....	21
<b>Şekil 4.1:</b> Deney hayvanları genotipleme agaroz jel görüntüsü *M:Marker .....	29
<b>Şekil 4.2:</b> Delikli tahta davranış testi uygulanan deney hayvanlarının "Başını Deliğe Sokma Sayısı" grafiği .....	30
<b>Şekil 4.3:</b> Delikli tahta davranış testi uygulanan deney hayvanlarının "Defekasyon Sayısı" Grafiği .....	30
<b>Şekil 4.4:</b> Yeni nesne davranış testi "Merkezde Geçirilen Toplam Yol" grafiği.....	32
<b>Şekil 4.5:</b> Yeni Nesne Davranış Testi "Nesnelerin Etrafında Geçirilen Toplam Zaman" Grafiği .....	32
<b>Şekil 4.6:</b> Yeni Nesne Davranış Testi "Merkezde Geçirilen Ortalama Hız" Grafiği.....	32
<b>Şekil 4.7:</b> Hipokampus dokusunda <i>Cc2d1a</i> geninin genotip grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması .....	34
<b>Şekil 4.8:</b> Hipokampus dokusunda <i>5Htr1a</i> geninin genotip grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması .....	35
<b>Şekil 4.9:</b> Hipokampus dokusunda <i>Neurl1</i> geninin genotip grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması .....	35
<b>Şekil 4.10:</b> <i>Cc2d1a</i> , Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği .....	36
<b>Şekil 4.11:</b> <i>5Htr1a</i> Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği .....	37
<b>Şekil 4.12:</b> <i>Neurl1</i> Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği .....	37
<b>Şekil 4.13:</b> <i>miR-19a-1</i> 'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi.....	38
<b>Şekil 4.14:</b> <i>miR-19b-1</i> 'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi.....	38
<b>Şekil 4.15:</b> <i>miR-19a-1</i> 'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi .....	40
<b>Şekil 4.16:</b> <i>miR-19b-1</i> 'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi .....	40

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm ifadesi ilk olarak 1911 yılında İsviçreli psikiyatrist Eogen Bleuler tarafından kullanılmış olup, ilk yıllarında şizofreni ile karıştırılmaktaydı. 1943 yılında Leo Kanner yaptığı çalışmalarda otizmin şizofreniden daha farklı bir yapıda olduğunu tespit etmiş ve otizmi nöro-gelişimsel bir bozukluk olarak tanımlamıştır. Yıllar geçtikçe görülme sıklığının da arttığı gözlemlenen otizm, günümüzde de bireylerin dilsel, bilişsel ve sosyal gelişimlerini etkileyen nöro-gelişimsel bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Otizm, yaşamın ilk üç yılında kendini göstermekte olup, özel eğitim gerektiren bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (1).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) olan çocukların sayısının her geçen gün arttığı gözlemlenmektedir. Ancak bu artışın gerçek bir artış mı olduğu, yoksa farkındalığın ve tanı ölçütlerinin değişkenliğinden mi kaynaklandığı henüz kesinleşmemiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalığın sıklığı 2000 yılında her 150 çocukta 1 olarak tespit edilmiş olup, 2008 yılında her 88 çocuktan birinde OSB olduğu görülmüştür (2). Tohum Otizm Vakfı'nın yapmış olduğu araştırmalara göre ise günümüzde her 68 çocuktan birinde OSB'nin gözlemlendiği açıklanmıştır. OSB'nin erkek çocuklarda kız çocuklara göre 4 kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (3).

Ruhsal bozuklukların tanısal ve istatistiksel el kitabı (DSM) olarak bilinen tanısal kriterlerde 2013 yılında yapılan güncelleme (DSM-5) sonrasında, daha önce “yaygın gelişimsel bozukluk” olarak tanımlanan otizmin tanımı da “Otizm Spektrum Bozukluğu” (OSB) olarak güncellenmiştir (4). Otizmin genel belirtileri; anormal sosyal davranışlar, iletişim eksiklikleri ve tekrarlayan davranışlardır. Genetik açıdan bakıldığında genellikle fonksiyon kaybı gözlenmektedir. Otizmde güçlü etkisi olduğu düşünülen, yolakları birbiri ile ilişkili olan birçok aday gen rapor edilmiştir. Sinaptik

modifikasyon ve nöronal ağların yeniden modellenmesi sosyal ve bilişsel gelişime aracılık etmektedir. Ayrıca otizmde düşünüldüğü gibi psikiyatrik hastalıkların çoğunda epigenetik mekanizmaların rol aldığı düşünülmektedir (5).

Otizmin erken teşhisi, hastalığın tedavisinde yer alan özel eğitimlere ve farmakolojik ilaçlara da erken başlanması açısından önemlidir (7). Bu duruma literatürde örnek bir çalışma olan, Smith ve arkadaşları değinmiştir; OSB'ye sahip olan çocuklarda genellikle duyuşsal algılamalarında problemler olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı anda farklı duyu organlarına gelen sinyaller olması durumunda bu sinyallerin işlenmesinde karışıklık olduğu, bu karışıklık sebebiyle OSB'li çocukların kendilerini kontrol etmekte zorlandıkları gözlemlenmiştir (8). Bu çalışmadan da çıkarılabileceği gibi hastaların bireysel ihtiyaçlarını maksimum düzeyde karşılayabilmeleri için tedaviye erken başlanması önemlidir (9).

Bu tez çalışması *Cc2d1a* geni yönünden susturulmuş (heterozigot (+/-), knock-out) ve normal (+/+) genotipteki Balb-c ırkı erkek fareler üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada; otizmin nesillerarası geçişi (F1 ve F2 kuşağı), paternal kalıtımın otizme olan etkisi ve RNA aracılı epigenetik faktörlerin kalıtılabilirliğinin fare modelinde gösterilmesi hedeflenmiştir.

Otizm hastalarının klinik belirtilerinde bilişsel gerilik (ID) yaygın olarak gözlenmektedir (10). *CC2DIA* geninin MR gelişiminde anahtar rol oynadığı bilinmektedir (11,12). Aynı zamanda *Cc2d1a* geni Notch, Akt ve NF-κB sinyal yollarında da görevlidir (11). NF-κB yolağının öğrenme ve hafızada önemli rol oynadığı bilinmektedir (13).

OSB'u gözlenen bireylerdeki öğrenme ve hafıza bozukluklarını referans alarak, her nesildeki deney hayvanlarına, öğrenme ve hafızayı ölçmeye yönelik davranış deneyleri (yeni nesne, delikli tahta) uygulanmıştır. Deney hayvanlarından elde edilen, hafıza/öğrenmeden sorumlu beyin bölgesi olan hipokampus dokusu otizmin nesillerarası geçişinin yanı sıra paternal kalıtımın rolünü değerlendirebilmek için ise sperm örnekleri alınmıştır. Hipokampus dokusu ve sperm örneklerinde, *Cc2d1a*, *Neurl1* ve *5Htr1a* genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. *Neurl1* geni, hafıza ve öğrenme de görev alan ve Notch sinyal yolağı ile ilişkili bir genidir (14). *5Htr1a* geni ise *Cc2d1a* geninin baskılayıcısıdır (10). Çalışmada belirtilen dokularda gen ekspresyon seviyeleri ile beraber mikroRNA (miRNA) ekspresyon seviyelerine de bakılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.OTİZM

Otizm, Amerikalı bilim adamı Kanner tarafından tanımlanan, nörolojik hastalıklardan olup merkezi sinir sisteminin gelişimsel bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Otizm terim olarak ilk defa Kanner tarafından “Etkili İletişimde Otistik Bozukluk” isimli makalede kullanılmıştır (15). Otizm, Amerikan Psikiyatri Birliği, Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı – Diagnostic and statistical manual of mental disorders - (DSM)’na, ilk defa 1980 yılında yayımlanan DSM-III ile birlikte girmiştir. DSM-IV’te “Yaygın Gelişimsel Bozukluk” başlığı altında yer almıştır. DSM-V Mayıs 2013’te yayımlanırken, otizm gibi genetik temeli birbirine benzer hastalıklar bir arada toplanarak “Yaygın Gelişimsel Bozukluklar” yerine “Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)” adı altında toplanılmasına karar verilmiştir (9).

Yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkan ve genellikle ömür boyu süren bu hastalığın tanısını koyabilmek için, bireylerin fenotipik özelliklerine bakılmaktadır. Otizm, sosyal etkileşim, iletişim eksikliği ve davranış bozuklukları ya da tekrarlayıcı hareketler gösteren, genetik ve klinik heterojeniteye sahip bir hastalıktır (16). Otizmlili hastaların %70’ inde belirtiler yavaş yavaş ortaya çıkarken, %30’unda çocukluk döneminin 18-24. ay aralığında iletişim eksikliği tekrarlayıcı hareketlerle ortaya çıkmaktadır. Bu belirtiler çocukların okul çağına geldiklerinde farklı şekillerde iletişim kurmaları ile devam etmektedir (17).

Otizmin nedeni tam olarak bilinmiyor olsa da, toplum ve sağlık çalışanları tarafından biliniyor olması erken tanı konulabilmesini sağlamaktadır. Erken teşhis, ailelerin kabullenmesi, hekimlerin aileleri yönlendirmesi, büyüme-öğrenme için özel eğitimlere başlanması için zaman kazandırmaktadır (18).

Otizmlili bireylerin başkaları ile iletişim kurmasının zor olduğu, sözcüklere olduğu gibi anlam yüklemeye çalıştıkları, onlar için mecaz anlamlı sözcüklerin ve deyimlerin



anlaşılmaz olduğu, kelime dağarcıklarının sınırlı olduğu, görsel algılamalarının çok iyi olduğu bilinmektedir. Etrafta olup bitenlere çok fazla tepki göstermektedirler. Ellerini çırpma, kulaklarını kapatma, aynı kelimeleri anlamsız da olsa tekrar tekrar söylemek isterler. Öfke nöbetleri geçirdikleri, belli oyuncaklar ile oynadıkları ve her zaman belli program içerisinde yaşamak istedikleri bilinmektedir (4).

### 2.1.1. OTİZMİN SINIFLANDIRILMASI

Otizmin sınıflandırılması, tarihindeki kritik bir noktaya gelmiştir. İlk kez DSM-III'te yer alan otizm, DSM-IV'te "Yaygın Gelişimsel Bozukluklar" başlığı altında değerlendirilmesinin ardından DSM-V'te "Otizm Spektrum Bozukluklar" adı altında incelenmeye başlanmıştır (Tablo 2.1). Bireylerdeki sosyal iletişim bozuklukları ve tekrarlayıcı davranışların sınırları hem klinik hem nörobiyolojik yaklaşımlarda daha iyi tanımlanmıştır. OSB, DSM-V kriterlerinde Şubat 2010'da ilk taslağı oluşturulmuş, Ocak 2011'de revize edilmiş ve Mayıs 2013'te yayımlanarak son halini almıştır (19).

**Tablo 2.1:** DSM-III, DSM-IV ve DSM-V arasındaki farklılıklar, (9)

DSM – III	DSM – IV	DSM – V
<p><b>1. Karakteristik Özellikleri:</b></p> <p>a) Diğer insanlara yanıt vermede eksiklik</p> <p>b) İletişim becerilerinde önemli düzeyde bozukluk</p> <p>c) Çevresel faktörlere garip tepkiler verme, verilen tepkilerin ilk 30 aydan önce ortaya çıkması</p>	<p><b>1. Karakteristik Özellikleri:</b></p> <p>Aşağıdaki 3 ana başlıktaki 16 kriterden 8'ini bireyin göstermesi gerekir.</p> <p>a) Sosyal etkileşim</p> <p>b) İletişim</p> <p>c) Sınırlı ilgi ya da etkinlik (Tekrarlayan davranışlar)</p> <p>Aşağıdaki 3 ana başlıktaki 16 kriterden 8'ini bireyin göstermesi gerekir</p> <p>2. Erken çocukluk döneminde oluşmuş olmasına yönelik olan DSM – III'teki şart kaldırılmıştır. 3 yaşından önce ortaya çıkması gerektiği ifade edilir.</p> <p>3. 'Yaygın gelişimsel bozukluk' başlığı altında toplanmıştır.</p> <p><u>Altbaşlıkları:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Otistik bozukluk</li> <li>- Asperger Sendromu</li> <li>- Rett Sendromu</li> <li>- Çocukluk Designatif Bozukluk</li> <li>- Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk</li> </ul> <p>4. 12 tanılayıcı kriter bulunur</p> <p>5. Etkilenme düzeyi ile ilgili bir kavram yoktur</p>	<p><b>1. Karakteristik Özellikleri:</b></p> <p>a) Sosyal iletişim ve etkileşimde süregelen bozukluk</p> <p>b) Sınırlı ve tekrarlayıcı davranıştır</p> <p>2. Erken çocukluk döneminde ortaya çıkması gerekir</p> <p>3. YGB'deki alt başlıklar kaldırılmış olup, bunlar 'Otizm Spektrum Bozukluğu' başlığı altında toplanmıştır</p> <p>4. 7 tanılayıcı kriter vardır</p> <p>5. Birinci düzey, ikinci düzey ve üçüncü düzey şeklinde adlandırılan 3 düzey vardır</p> <p>6. Tanı koyulurken retardasyon ve dil bozukluğu ile tıbbi ya da genetik bozuklukların dikkate alınmasına önem verilmiştir.</p>

### 2.1.2.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDAN ETKİLENME DÜZEYLERİ

OSB tanısı alan çocuklardan bazıları çok fazla etkilenirken, bazıları çok az, bazıları ise ne çok ne az olacak seviyede etkilenirler. DSM-5 kriterlerine göre etkilenme düzeyleri ve oluşumlarından bazılarına örnekler Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2:** DSM-5’e göre çocukların OSB’den etkilenme düzeyleri, (6)

Etkilenme Seviyesi	Açıklama
Düzyey 3: “Ağır düzey destek gereksinimi”	-Anlaşılabilir birkaç kelime konuşabilen, -Nadiren iletişim başlatan, başlattığında sadece ihtiyaçlarını anormal tavırlar ile ifade eden, -Sadece sosyal yaklaşımlara tepki veren -Davranışlarda esnekliğin olmaması tüm ortamlarda fark edilen grup
Düzyey 2: “Orta düzey destek gereksinimi”	-Basit cümleler kurabilen, -Özel ilgi alanları ile sınırlı kalan, -İletişime sahip olan, - Davranışlarda esnekliğin olmaması açıkça görülebilecek farklı ortamlarda fark edilen grup
Düzyey 1: “Hafif düzey destek gereksinimi”	-Tam cümle kurabilen, -Etkileşim oluşturabilen, -Sohbet etmede ve arkadaşlık kurmada başarısız olan, - Davranışlarda esnekliğin olmaması bir ya da daha fazla ortamda fark edilen grup

### 2.1.3.EPİDEMİYOLOJİ

Son yapılan çalışmalara bakıldığında, OSB olan çocukların sayısında artış gözlemlenmiştir. Amerikan Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi’nin 2016 yılı sonuçlarında otizmin her 68 çocuktan birinde görüldüğü ifade edilmektedir (20). Erkeklerde kızlara göre 4-5 kat daha fazla gözlenmektedir (3,4,9). OSB yaygınlık düzeyi, gelişimsel bozukluklar arasında en hızlı artış gösteren hastalıktır. 2000-2014 yılları arasında her yıl otizim tanısı alan bireylerin sayısı %6-%15 arasında artış göstermiştir (21).

### 2.1.4.OTİZMİN SEBEPLERİ

#### 2.1.4.1.GENETİK SEBEPLER

Otizim, beyin gelişimi sırasında oluşan bozukluklardan kaynaklanan nörolojik hastalıktır (22). OSB’nin gerçek anlamda sebebi henüz bilinmemekle beraber; genetik, nöroanatomi, çevresel faktörler ve biyokimyasal faktörler gibi etkenlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çoğu araştırmacı tarafından düşünülen teori; OSB’nin genetik

bir hastalık olduğu, genetik yatkınlığı olan bireylerin çevresel faktörlerden etkilenmesi sonucunda hastalığın tetiklendiği yönündedir (4,22). Bazı tiplerinde Fragile X, Tuberoskleroz, Angelman Sendromu gibi genetik hastalıklara yatkınlık görülürken (Tablo 2.3), bazılarında çevresel faktörler ile hastalığın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Fenotipik bulguların beraberinde otistik bireylerde epilepsi, ID gibi başka sağlık problemleri de gözlenmektedir (23), (Tablo 2.4).

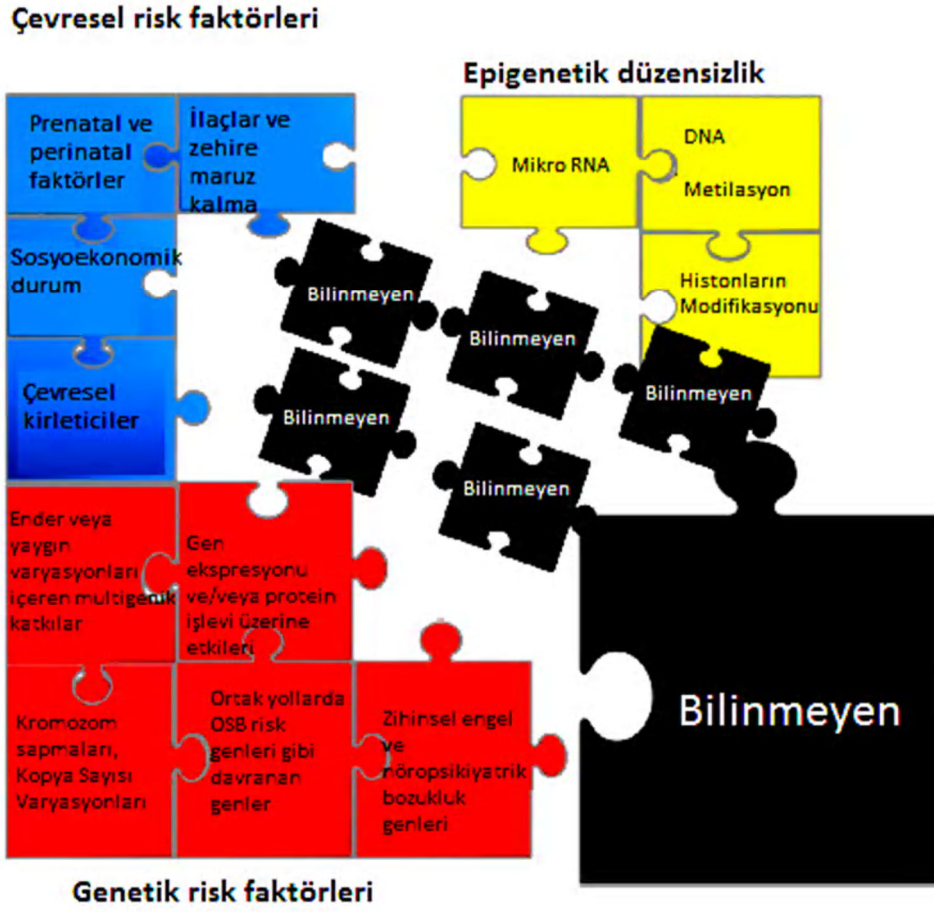
**Tablo 2.3:** Otizm ile ilişkilendirilen genetik sendromlardan bazıları, (24)

Spesifik genetik hastalık	İlişkili olduğu kromozom/gen bölgesi	Otistik belirtiler	Hastalıkta otizmin görülme yüzdesi	Otizimde hastalığın beklenme oranı	Bilişsel Gerilik
Frajil X Sendromu	FMR1	Zayıf göz teması, Sosyal anksiyete, dil engeli, klişeleşmiş davranışlar	% 18 - 33	% 1-3	Değişken
Tüberoz sükleroz	TSC1, TSC2	Öğrenme zorlukları, davranışsal problemler	% 25-60	% 1-4 (hastalık nöbetleri mevcutsa %8-14 )	Değişken
Rett sendromu	MECP2	Tekrarlı davranışlar, dil engeli, sosyal ilişkiden rahatsızlık, göz temasının kaybı	% 80-100	< % 5	Şiddetli
Prader – Willi sendromu	15q11-q13'te Del Paternal allel	Tekrarlı davranış ve sosyal noksanlıklar	%19-36.5	%1-3	Şiddetli
Angelman sendromu	Maternal UBE3A'da Del/mut	Şiddetli dil engeli, klişeleşmiş davranışlar, değişmezlik	%50-81	≤ %1	Şiddetli

**Tablo 2.4:** Otizmi etkileyen faktörler (3,25,26)

Genetik faktörler
Medikal hastalıklar
Prenatal ve Postnatal faktörler
Beyin hasarı veya beynin fonksiyon bozuklukları
Nörobiyokimyasal bozukluklar (Özellikle dopaminerjik, serotonerjik ve ayrıca peptiderjik, noradrenerjik sistemler ile ilgili)
Nörobiyolojik faktörler
Nöroanatomik faktörler
Emosyonel gelişim anomalileri (Empati bozuklukları, nörosensoryel anomaliler)
Kognitif süreçler ile dil ve konuşma gelişimi bozukluğu

Otizmin klinik olarak değerlendirmenin yanı sıra genetik çalışmalara bakıldığında da multifaktöriyel kalıtım kalıbına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden tek bir genin sorumlu olduğu söylenememektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda ise, genetik, epigenetik, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, paternal kalıtım, beyin fonksiyonları, nörokimyasal etkenler üzerine yoğunlaştığı gözlenmektedir (Şekil 2.1). İkiz çalışmalarında monozigot ve dizigot ikizler arasında otizmin görülme sıklığı değişirken, kardeşler arasında görülme sıklığının da topluma kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır (3,27). Yapılan araştırmalara göre; tek yumurta ikizlerinden birinde OSB olması durumunda diğerinde de olma oranının %60 - %90 aralığında olduğu bilinirken, çift yumurta ikizlerinde ise bu oranın %3- %10 aralığında olduğu tespit edilmiştir. OSB'li bir bireyin kardeşinde de OSB görülmesi oranının ise %2- %6 arasında olduğu tespit edilmiştir (4). Kalıtım kalıbına bakıldığında, paternal kalıtım daha çok gözlemlenmektedir. Genlerin aktivitesinin ve penetransının önemli olduğu bu hastalıkta birçok genin ve çevresel faktörlerin birlikte etkisi sonucu otizm ortaya çıktığı genel olarak araştırmacılar tarafından kabul görmektedir (28).



Şekil 2.1: Otizm spektrum bozukluklarının sebepleri, (24)

#### 2.1.4.1.1.RNA KALITIMI ve EPİGENETİK FAKTÖRLER

Epigenetik; genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan, fenotipik değişikliklerden kaynaklanan gen ekspresyonundaki farklılıkları inceler. Epigenetik değişimin en karakteristik özelliği, kodlanmayan gametik RNA'ların embriyoya aktarılması ile kalıtım modeli oluşmasıdır (29). Bazı genlerin aktivasyonunun nasıl ve nerede gerçekleşmesi gerektiğini düzenler. Bu düzenleme sırasında DNA metilasyonu, X inaktivasyonu, genomik baskılama, genlerin regülasyonu gibi olaylar gerçekleşir ve bu olayların gerçekleşme sürecinde meydana gelen aksamalar nörolojik hastalıklar, kanser, obezite gibi rahatsızlıklara yol açar (6,30).

Nöronal sistemin epigenetik mekanizmalarla düzenlenmesi, sinir sisteminin işleyişinde kritik bir rol oynadığı literatürde yer almaktadır. Epigenetik anormalliklerin sebep olduğu düşünülen nörolojik hastalıklardan biri de OSB'dır. *BCL-2*, *SHANK3*, *SMCX* genleri otizm ile ilişkilendirilen ve epigenetik mekanizmaların etkisinin olduğu bilinen

genlerden bazılarıdır. Örneğin; *SMCX* geni, histon proteinlerinden birisini kodlar ve OSB ile bilişsel işlev bozukluğuyla bağlantılı olan histonların diğer genlerinin (*BDNF*, *SLC18A1*, *SCN2A*, *CACNA1H*) demetilasyonunu düzenler (24). Bu bilgilerin yanı sıra epigenetik faktörlerin otizm gibi nörolojik hastalıklarda etkisi olduğu gibi öğrenmede ve hafıza oluşumunda da rol aldığı bilinmektedir (31).

#### 2.1.4.1.1.1.Kodlanmayan RNA'lar

Son zamanlarda, genom analizi için büyük ölçekli teknolojiler, gen düzenlemesi konusunda çok sayıda kodlamayan RNA'nın (ncRNA) tanımlanmasına izin vermiştir. ncRNA'lar birçok biyolojik süreçte bulunur ve farklı sınıflarda gruplandırılabilir: küçük engelleyici RNA'lar (siRNA'lar), piwi-etkileşen RNA'lar (piRNA'lar), uzun lncRNA'lar ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) - (Tablo 2.5) (32).

**Tablo 2.5:** Bazı ncRNA'lar ve fonksiyonları (24)

<b>Kısa ncRNA</b>	
miRNA	Translasyon baskılanması, pek çok genin translasyon sonrasında düzenlenmesi, gelişim, apoptoz ve hücre farklılaşmasında görev alır.
siRNA	Transkripsiyon sonrası regülasyon, histon/DNA modifikasyonu ile heterokromatin yapının oluşumunda görev alır.
piRNA	Memelilerin eşey hücrelerinde transpozon ve retro elementlerin baskılanması ve DNA metilasyonunda görev alır.
tiRNA	Transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alır.
shRNA	Genomik baskılanmada görev alır.
<b>Uzun ncRNA</b>	
Lnc RNA	X inaktivasyonu, imprintig, transkripsiyonda aktif genlerin regülasyonu, embriyonik pluripotent hücrelerinin üreme hücrelerine farklılaşmasında görev alır.
Tsix RNA	X kromozomu inaktivasyonunda görev alır.
Xist RNA	X kromozomu inaktivasyonunda, histon deasetilasyonu ve metilasyonunda görev alır.

- **miRNA'lar**

miRNA'lar, 19-25 nükleotid uzunluğunda kısa RNA molekülleri olup, mRNA bozunumu veya translasyonel baskılama yoluyla gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak çalışırlar. İnsan genlerinin yaklaşık üçte ikisinin, miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir. Moleküler çalışmalara olan ilgi, insan genomunda giderek artan sayıdaki miRNA genlerinin tanımlanmasına imkân sağlamıştır (33). OSB hastalarında, sağlıklı kontroller ile karşılaştırılan miRNA gen düzeylerinin analiz edildiği çok az çalışma vardır (34). Bu çalışmaların çoğunda farklı ifade edilen miRNA'lar ve tahmin edilen hedef genler arasındaki ilişkiler bulunmuştur. Böylece OSB etiolojisinde miRNA'ların rol oynayabileceğini göstermişlerdir. OSB'de epigenetiğin rolü son yıllarda ortaya çıkmış ve giderek artan bir araştırma konusu olmuştur.

#### **2.1.4.2.GENETİK OLMAYAN SEBEPLER**

Otizmin, kalıtsal olmayan faktörler ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, hastalığın prevalansında artış gözlenmektedir. Bu faktörlerin büyük bir kısmında prenatal dönemdeki; maternal enfeksiyon, ilaç kullanımı olduğunu ve postnatal dönemdeki; kafa travmaları, beyin hasarı, enfeksiyon oluşumu, bazı aşular gibi etkenlerin olduğu düşünülmektedir (9). Ayrıca immünolojik faktörler, serotonin, dopamin, nöropeptin ve norötropin seviyelerindeki farklılıklar, beyindeki amigdala, serebellum, hipokampus, beyin sapı, talamus gibi beyin kısımlarındaki değişiklikler de otizmin oluşmasında önem taşımaktadır (35). Otizmin sebeplerinin neler olduğunu net olarak ortaya koymak mümkün değil fakat çocukluk döneminde anne-çocuk ilişkilerinin olumsuz olması ya da çocukluk dönemindeki aşuların sebep olduğu düşüncelerinin bir etkisi olmadığı günümüzde bilinmektedir (9).

#### **2.2.PATERNAL KALITIM**

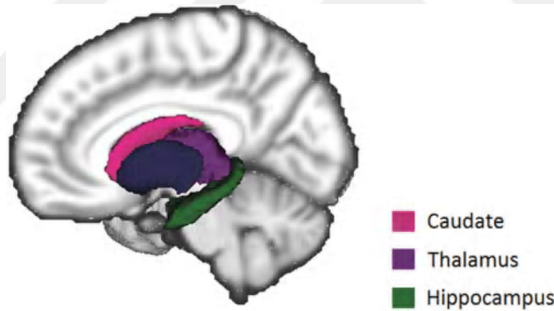
Paternal kalıtım, babadan bir sonraki kuşağa özelliklerin geçişidir. Paternal epigenetik modifikasyonlar sadece sperm aracılığıyla kalıtılmaktadır (30). Cinsiyet belirlemede görevli olan Y kromozomu üzerinde bulunan bazı genler sperm üretimi ve gelişiminden sorumludur. Bu genlerin bulunduğu bölge Azoospermia Faktör (AZF) bölgesi olarak adlandırılmakta ve Y kromozomunun p kolu üzerinde bulunmaktadır. Otizm, erkeklerde kızlara göre daha fazla gözlenmekte ve hastalığın şiddeti daha ağır seyretmektedir (36). Bunun sebebi net olarak bilinmiyor olsa da bu durum, seks kromozomlarının otizm

üzerine etkisi olduğunu ve paternal kalıtımın yer aldığını düşündürmektedir. Bazı çalışmalarda bu durum, kızlarda çift X kromozomu ve erkeklerde tek X kromozomu bulunması ile ilişkilendirilmektedir. Bozuk X kromozomu, erkeklerde özelliği ortaya çıkarabilirken kızlarda inaktive edilebilmektedir (3). Ebeveyn genotipinin veya ebeveyn soyunun genetik etkileşiminin etkileri çeşitli model organizmalarda araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, bu transgenerasyonel genetik modellerin insanlarda nadiren incelendiği bilinmektedir (27). Literatüre bakıldığında, baba spermindeki epigenetik farklılıkların, yavrularda otizm riskine katkıda bulunabileceğini ve potansiyel olarak ilişkili epigenetik mekanizmaların otistik bireylerin serebellumunda çalıştığını göstermişlerdir (38,39).

### 2.3.ÖĞRENME VE HAFIZADAN SORUMLU BEYNİN BÖLGESİ:

#### HIPOKAMPUS

Hipokampus, üzerine en çok araştırma yapılan beyin kısımlarından birisidir. Beyin kısımlarının en eski keşfedilen bölgelerindedir ve anatomik olarak “C” harfine benzer (40), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Beyin ve Hipokampus, (41)

Hipokampus, limbik sistemde rol alan, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinde role sahip olan, uzun süreli hafıza ve uzaysal yön bulmada görev alan beyin bölümüdür (42). Kısa süreli bilginin uzun süreli bilgiye dönüşmesine aracı olmaktadır. Hipokampusün zarar görmesi durumunda yeni hafıza oluşumunda aksamalar meydana geldiği ve eski bilgilerinde zarar gördüğü bilinmektedir (43). Bunların yanı sıra nörolojik hastalıkların bazılarında hipokampus ile ilgili bozukluklara rastlanırken, otizm hastalarında da hipokampal bozukluklara rastlanıldığı bilinen bir gerçektir (44).

#### 2.4.HAYVAN MODELİ BELİRLEME

Klinik araştırmanın her açıdan önemli olmasına rağmen, otizm gibi etiyojisinde birden fazla genetik ve çevresel faktörler bulunduran hastalıklara yönelik hipotezlerin insanlarda test edilmesi zordur (45). Bu tip hastalıkların altında yatan biyolojik

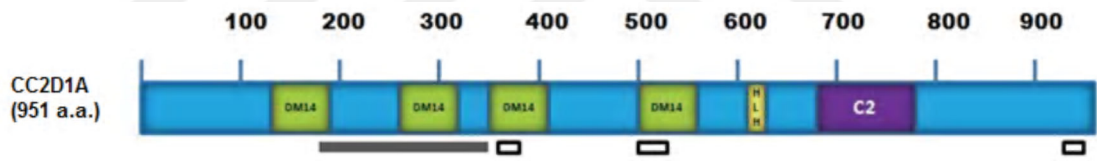


mekanizmalarla bağlantılı davranış temelli araştırmalarda hayvan modelleri önemli bir yere sahiptir (46). Literatürde otizm fare modellerinde üç geniş yaklaşım türü kullanıldığı yer almaktadır. Bunlardan birincisi, Frajil X sendromu ile ilişkili *Fmr1* geni gibi OSB'ye duyarlı olduğu bilinen genlerin kullanılması (47), ikincisi serotonin sinyal yolları ile ilişkili hayvan modeli çalışmalarının yapılması (48), üçüncüsü ise ileri baba yaşı gibi bilinen risk faktörleri ile yapılan çalışmalardır (49). Bunların dışında valproik asit kullanılarak otistik fare modeli oluşturulan çalışmalarda literatür de yer almaktadır.

## 2.5.GENLER

### 2.5.1.CC2D1A VE 5HT1A GENİ

*CC2D1A* geni insanda 19p13.12 kromozomu üzerinde, 29 ekzondan oluşan, 24.640 baz çifti uzunluğundadır. *Cc2d1a*, NH<sub>2</sub>-ucu, *Drosophila melanogaster* 14 ve COOH ucu, C2 domaini bileşenlerinden oluşan ve evrimsel olarak korunan bir proteindir, (Şekil: 2.3.), (50). *CC2D1* geni, *CC2D1A* ve *CC2D1B* olmak üzere iki homolog genden oluşur (51).



Şekil 2.3: *Cc2d1a* proteini (55)

*CC2D1A*, fonksiyonuna bağlı olarak literatürde *FREUD-1*, *Akil* ve *Tape* olarak da adlandırılmıştır. Yapılan bir çalışmada, *Cc2d1a* homozigot mutant (-/-) farelerinin doğumdan sonra nefes alamadıkları için öldükleri bildirilmiştir ve *Cc2d1a* geninin, farelerin hayatta kalması için gerekli olduğu ve sinapsların fonksiyonel olgunlaşmasının kontrolü için gerekli işlevi yerine getirdiği belirlenmiştir (51). Bu gende homozigotik mutasyon taşıyan hastalar nonsendromik mental retardasyon sahiptirler, bu da *Cc2d1a*'nın merkezi sinir sisteminde rol oynadığını göstermektedir (51). *Cc2d1a* geninin Notch, Akt ve NF-κB sinyal yollarında olduğu gibi transkripsiyonun düzenlenmesinde de görev almaktadır (11). *Cc2d1a* başlangıçta NF-κB promotorunun bir aktivatörü olarak tanımlanmıştır ve *Cc2d1a*, NF-κB aktivasyon yolağının çeşitli bileşenleri aracılığıyla NF-κB transkripsiyon faktörünü güçlü bir şekilde harekete geçirmektedir. NF-κB'nin bellek ve nöronal plastisitede çok önemli olduğu

bilinmektedir (52). Bununla birlikte, *Cc2d1a*'nın fizyolojik fonksiyonu bilinmemektedir (51). Transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonun yanı sıra bahsedilen sinyal yollarının her biri gelişim süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynadığından, nöronal gelişimi etkileyen *CC2D1A* geni aktivasyonunun aksaması ile *CC2D1A* geninin kontrolündeki bu yollardan bazılarının bozulduğu düşünülmektedir. Muhtemelen bu sistemlerden birinin veya daha fazlasının düzensizleşmesinin sonucunda MR'ye yol açan gelişimsel anormalliklerin ortaya çıkması söz konusu olmaktadır (50). *Cc2d1a* mRNA'sı, embriyonik ventriküler bölgede aşırı derecede eksprese edilir ve fare embriyolarında kortikal plakayı geliştirir, serebral kortekste ve hipokampusta yüksek ekspresyon gözlenir ve yetişkinliğe kadar devam eder (12). Literatürde yapılan çalışmalarda korteks, amigdala, hipokampus, talamustaki *Cc2d1a* mRNA varlığı gösterilmiştir (35,53).

*CC2D1A*'nın kaybı, adenil siklazı inaktive edebilen ve cAMP yolağının inaktivasyonuna sebep olan *5HT1A* reseptörünün yüksek ekspresyon seviyeleri ile sonuçlanabilir (11,13). Bir sinir iletici olarak serotonin, sinaptojenez ve nöronal göçte önemli bir rol oynamaktadır (54,55). Serotonin sistemindeki anormallikler, otizm gibi çeşitli psikiyatrik hastalıklarda gösterilmiştir (53,56,57). *CC2D1A* geni, transkripsiyonel bir baskılayıcıyı kodlar. Bu baskılayıcı, nöronal hücrelerdeki 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (*5HT1A*) geninin ekspresyonunu düzenler (58) ve *5HT1A*'nın 5' ucunda 14 bp'lik bir bölgesinden bağlanır. Proteinin transkripsiyonel baskılama aktivitesi kalsiyum (Ca) tarafından inhibe edilir (10,59). *CC2D1A* geni, *5HT1A* geninin baskılayıcı geni olarak tanımlanmıştır. *CC2D1A* geni, *5HT1A* geninin baskılayıcı elementine bağlandığında, *5-HT1A* geninin ekspresyonunu negatif bir şekilde düzenler (58). Bu baskılama mekanizması, protein kinaz aracılığıyla fosforilasyon, Ca'a bağlı olarak inaktive edilir. Bu yüzden, *CC2D1A* geninin baskılanması ile *5HT1A*'nın ekspresyonunun yüksek regülasyonuna sebep olması beklenmektedir (10). *5HT1A* geni, 5-hydroxytryptamine reseptör ailesinin alt birimidir. Serotonin'in, patolojik şartlar ve fizyolojik sürecin birkaçı ile ilişkisi olduğu gözlenmiştir. Farede *5HT1A* geninin inaktivasyonu, stres ve anksiyeteye duyarlılığı artıran davranışları tetiklemektedir (60–63). Yapılan çalışmalar ile *5HT1A* geni yetişkin nörogenezin kontrolünde, hipokampüste dendritik olgunlaşmada, öğrenme ve hafızada önemli rolünün olduğu gösterilmiştir (50). Literatüre bakıldığında *CC2D1A* ve *5HT1A* genleri arasında ilişki olduğu görülmektedir (10,11,13,59).

### 2.5.2.NEURLI GENİ

Neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1 (*NEURL1*) geni, insanda 10q25.1 kromozomu üzerindedir ve hipokampus bağımlı sinaptik plastisite ve öğrenme ve hafızada rol oynar. *NEURL1* geni 12 ekzondan oluşmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada serebral korteks, amigdala, striatum ve hipokampüste eksprese olduğu gözlemlenmiştir. *NEURL1* protein kodlayıcı bir genidir. Notch sinyal yolağı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (14) ve *Cc2d1a* geninde “ölümcül (2) dev diskler ( L(2)gd )” olarak tanımlanan mutasyonların etkilerinin Notch sinyal yolağının güçlü aktivasyonunu aracılığıyla sağlandığı bilinmektedir (51). L(2)gd, Notch reseptörünün endositozu sırasında Notch aktivitesini kısıtlamaktadır. Notch yolağının organ gelişiminde önemli bir yeri olduğu için L(2)gd mutasyonlarını kanatlarda, gözlerde ve kanat tüylerini içeren çeşitli organlarda defekt oluşturmaktadır (64–67). *Neurl1* geni, hipokampusa bağlı sinaptik plastisite, öğrenme ve bellekte rol oynar (68). Bu gen tümör baskılayıcısı gibi davranır; Notch sinyal yolunu inhibe ederek medulloblastoma (MB) hücrelerinin habis (malign) hücre transformasyonunu inhibe etmektedir (14).

### 2.6.MİKRORNA'LAR

#### 2.6.1.miR-19a-1 VE miR-19b-1

*microRNA 19 (miR-19)* ailesinde bilinen 89 sekans vardır, ancak yeni yapılan araştırmalar neticesinde bu sayı hızla değişmektedir. *MiR-19* miRNA öncüsü, gen ifadesini düzenleyen küçük, kodlamayan bir RNA molekülüdür. İnsan ve fare genomu içerisinde, bu miRNA'nın, üç kopyası bulunur. İnsanda; *miR-19a-1*, kromozom 13'de, *miR-19b-1* kromozom 13'de ve *miR-19b-2* X kromozomu üzerinde bulunur. Farede ise; *miR-19a-1*, kromozom 14'de, *miR-19b-1* kromozom 14'de ve *miR-19b-2* X kromozomu üzerinde bulunur (mirbase.net).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu proje, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi tarafından ortaklaşa yürütülmüştür. Çalışma örneklerinin genetik analizi ve deney hayvanları ile ilgili çalışmalar “Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi”, “Genom ve Transgenik” birimlerinde mevcut olan ve aşağıda belirtilen cihazlar ve sarf malzemeler kullanılarak yapılmıştır.

#### **3.1.GEREÇLER**

##### **3.1.1.DEMİRBAŞ MALZEMELER**

- Termal Cycler PZR Cihazı (SensoQuest)
- Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma)
- Vortex Cihazı (Heidolph)
- Isıtıcı Blok TH2 (HLC Biotech)
- Mikropipet (Gilson)
- Shaker (Eppendorf)
- BioSpec Nano (Shimadzu)
- Rotor-Gene Q (Qiagen)
- LightCycler 480 II (Roche)
- Buzdolabı (+4 ve -20)
- Dolap (-80°C ve -20°C)
- Kafes sistemi (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık zaman periyoduna uygun)
- Mikro Dalga Fırın
- Mini Plate Perfect Spin (Peqlab)

- Hassas terazi

### 3.1.2.SARF MALZEMELER

- 0,1 ml Tüp
- 0,2 ml Tüp
- 1,5 ml Tüp
- Pipet Uçları (10µl, 100 µl, 1000 µl)
- 1,5 ml eppendorf tüp
- 0,2 ml PCR tüp
- 0,1 ml strip tüp (Qiagen)
- Transgenik laboratuvar ünitesi cerrahi set (Pens, Portekü, Buldog Pensi, İnsülin Enjektörü, 2.5ml Enjektör)
- cDNA sentez kiti (Genler için; Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - ROCHE ve mikro RNA'lar için; miScript II RT Kit - Qiagen)
- Primer ve Problar (Genler için; RealTime ready Designer Assays & RealTime ready Katalog Assays ACTB – ROCHE ve mikro RNA'lar için; miScript Primer Assay - Qiagen)
- Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu için mix kit (Genler için; LightCycler 480 Probes Master Kit -ROCHE ve mikro RNA'lar için; miScript SYBR Green PCR Kit - Qiagen)
- Rotor-Gene Q (Qiagen)'e uyumlu strip tüp, 0,1ml
- LightCycler 480 II (Roche) 'e uyumlu LightCycler 480 Multiwell Plate

## 3.2.YÖNTEM

### 3.2.1.HAYVANLARIN BARINDIRILMASI VE DENEY GRUPLARI

*Cc2d1a* geni susturulmuş heterozigot (+/-) deney hayvanları ve kontrol grubu hayvanları, Erciyes Üniversitesi, Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Transgenik Laboratuvarında muhafaza edilmiştir. Tez çalışması için “Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (EÜHADYEK)” tarafından “14/166” karar numarası ile izin alınmıştır. Deney hayvanları etik kurallarına uygun bir şekilde 12

saat aydınlık 12 saat karanlık ışık periyodunda barındırılmıştır. Çalışma için gerekli olan *Cc2d1a* gen ifadesi silinmiş heterozigot (+/-) genotipe sahip ve *Cc2d1a* geni yönünden normal (+/+) genotipe sahip Balb-c fareler bu laboratuvarında mevcut olup gerekli izin yazıları dahilinde kullanılmıştır.

### **3.2.2.DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI**

Bu tez projesinde; Grup 1, Grup2 ve Kontrol grubu olmak üzere 3 grup ile çalışılmıştır.

#### **3.2.2.1.Grup1 ‘in Oluşturulması**

Grup1 oluşturulurken elimizde bulunan deney hayvanları F0 kabul edildi ve aralarından *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C ile Balb-C normal (+/+) erkek ve dişi fareler alınarak çiftleştirmeye bırakıldı. Çiftleştirmeden elde edilen yavrular, ilk nesil olan “F1 jenerasyonu” olarak kabul edildi (n=12, 8erkek/4dişi). F1 jenerasyonundaki fareler 21 günlük olduklarında anne sütü ihtiyaçlarını tamamlamış ve anneden, erkek/dişi kafesi ayrımı yapılarak ayrılmıştır. Yavru farelerin tırnaklarından DNA izolasyonunu yapmak için ufak bir kesit alındı. DNA izolasyonu yapılan örneklerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanılarak Agaroz Jel Elektroforezinde *Cc2d1a* geni yönünden genotipi belirlendi. Genotipi belirlenen F1 jenerasyonu yavrulardan, heterozigot (+/-) ve normal (+/+) genotipteki fareler arasında, F2 jenerasyonunu elde etmek için yeni bir çiftleştirme başlatıldı. F2 jenerasyonundan elde edilen yavrulara da (n=17, 8erkek/9dişi) F1 jenerasyonundaki yavrulara uygulanan işlemlerin aynısı uygulandı (Tablo 3.1).

#### **3.2.2.2.Grup2 ‘nin Oluşturulması**

Grup2 oluşturulurken elimizde bulunan deney hayvanları F0 kabul edildi ve aralarından *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C ile *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C erkek ve dişi fareler alınarak çiftleştirmeye bırakıldı. Çiftleştirmeden elde edilen yavrular, ilk nesil olan “F1 jenerasyonu” olarak kabul edildi (n=20, 12erkek/8dişi). F1 jenerasyonundaki fareler 21 günlük olduklarında anne sütü ihtiyaçlarını tamamlamış ve anneden, erkek/dişi kafesi ayrımı yapılarak ayrılmıştır. Yavru farelerin tırnaklarından DNA izolasyonunu yapmak için ufak bir kesit alındı. DNA izolasyonu yapılan örneklerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanılarak Agaroz Jel Elektroforezinde *Cc2d1a* geni yönünden genotipi belirlendi. Genotipi belirlenen F1 jenerasyonu yavrulardan, heterozigot (+/-) ve normal (+/+) genotipteki fareler arasında, F2 jenerasyonunu elde etmek için yeni bir çiftleştirme başlatıldı. F2 jenerasyonundan elde edilen yavrulara da

(n=10, 4erkek/6dişi) F1 jenerasyonundaki yavrulara uygulanan işlemlerin aynı uygulandı (Tablo 3.1).

### 3.2.2.3.Kontrol Grubunun Oluşturulması

*Cc2d1a* geni için “normal (+/+)” genotipe sahip normal (+/+) Balb-C ırkı fareler kullanıldı (n=9, 9erkek). Bu grupta nesil takibi yapılmadı (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1:** Gruplar, Jenerasyonlar ve Çiftleştirme

Gruplar	Jenerasyon	Çiftleştirme
Grup1	F0:	<i>Cc2d1a</i> heterozigot (+/-) Balb-C X Normal Balb-C
	F1:	
	F2:	
Grup2	F0:	<i>Cc2d1a</i> het (+/-) Balb-C X <i>Cc2d1a</i> het (+/-) Balb-C
	F1:	
	F2:	
Kontrol Grubu	F0:	Normal Balb-C X Normal Balb-C

### 3.2.3.DNA İZOLASYONU

Deney Hayvanlarından genotipleme için alınan tırnak dokusu örnekleri ile aşağıdaki protokole göre DNA izolasyonları yapılmıştır.

- DNA izolasyonu için Sigma - Aldrich DNA izolasyon kiti (Sigma-Aldrich, Germany) kullanıldı.
- Farelerden kesit alınan tırnak dokusu örnekleri, 0.5 µl'lik ependorf tüplere bırakıldı.
- Dokuların üzerine 25 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. Vorteks yapıldı.
- 6.5 µl Tissue Buffer eklendi. Vortekslenir ve spin yapıldı.
- Oda ısısında 10 dk bekletildi.
- Daha sonra ısıtıcı blok üzerinde 95°C 'de 3 dk bekletildi.
- Isıtıcı bloktan alınan örneklere 25 µl Nötralizasyon Solüsyonu eklendi.
- Vorteks yapıldı.
- DNA miktarları Nanodrop cihazında ölçülür ve diğer işlemler uygulanana kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE JEL ELEKTROFOREZİ

DNA izolasyonu yapılan örnekler ile aşağıdaki PCR programı çalışıldı:

Gen Adı	ASSAY ID
CCD1A-M1	73078280
CCD1A-M2	73078313
CCD1A-M3	73078315

Buffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Dntp	3 µl
Primer1 ( <i>Cc2d1a</i> )	2 µl
Primer2 ( <i>Cc2d1a</i> )	2 µl
Primer3 ( <i>Cc2d1a</i> )	2 µl
Taq DNA polimeraz	1 µl
dH <sub>2</sub> O	30 µl
DNA	2 µl

#### PCR Basamakları

94°C	3 dk	} 30 Döngü
94°C	45 saniye	
58°C	45 saniye	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	
+4°C	∞	

%2 lik agaroz jelde görüntülendi. 10 µl örnek üzerine 3µl loading buffer eklendi ve jele yüklendi. 90 V'da 45 dakika koşuruldu. UV görüntüleme ile analiz edildi. (Normal Genotip: 200 bp, Heterozigot Genotip: 400 bp – 200 bp), (Şekil 4.1).

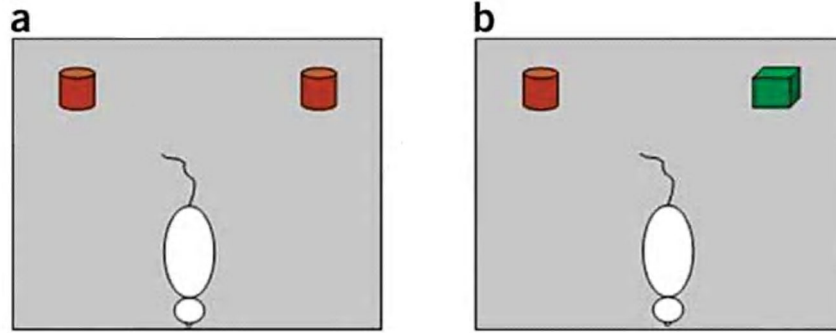
### 3.2.5.DAVRANIŞ DENEYLERİ

Çalışmada kullanılan erkek *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fareler ve kontrol grubu hayvanlarına davranış deneyleri (Yeni nesne ve Delikli tahta) uygulandı. G1F1 (n=8 erkek), G1F2 (n=8 erkek), G2F1 (n=12erkek), G2F2 (n=4 erkek) ve kontrol (n=9 erkek). Heterozigot (+/-) ve Normal (+/+) genotipe sahip erkek fareler kullanıldı.



### 3.2.5.1.Yeni Nesne (Novel Object)

Yeni nesne deneyi, 60cm x 60cm x 36cm'lik hazneden oluşan kutu içerisinde yapılır (Şekil 3.1).

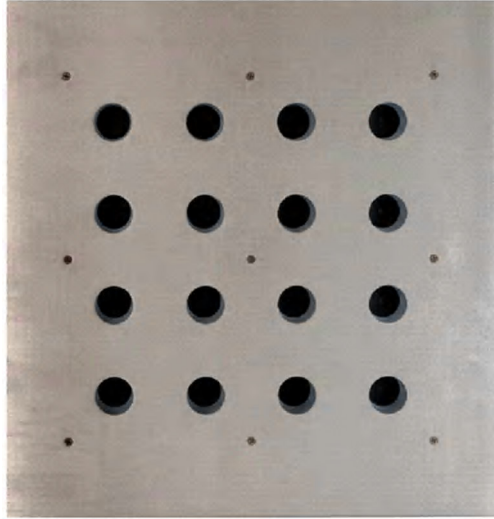


**Şekil 3.1:** Yeni Nesne (Novel Object) deney düzeneği. (a) İlk önce farenin bir obje ile birlikte deney kutusunun içinde 10 dakika zaman geçirerek objeyi öğrenmesine izin verilir. 10 dakikanın sonunda fare kutudan çıkarılarak kutuya eski objenin yanına yeni ve özgün (novel) başka bir obje (yeşil obje) daha koyulur. (b) Fare kutuya ikinci kez yerleştirildiğinde farenin yeni koyulan objeye (yeşil nesneye) daha fazla ilgi duyması beklenilir. Sensörlerin tespit ettiği veriler doğrudan yazılıma aktarılarak analizler yapılır. İkinci objeye daha fazla ilgi duyması farenin ilk objeyi daha önceden hatırladığı için yeni objeye yönelmesi olarak değerlendirilmekte olup farenin öğrenme ve hafıza yetenekleri “normal” olarak belirlenir.

Novel obje davranış deneyi farelerin öğrenme, hafıza ve nesnelere karşılaştırma yeteneklerini gözlemlemek için kullanılan basit bir davranışsal deneydir. Yeni nesne deneyinde 11 – 12 haftalık hayvanlar kullanılmaktadır. Bu davranış deneyi her laboratuvar da yapılabileceğinden ve yüksek bir maliyeti olmadığından çok kullanışlı bir davranış deneyi olarak görülmektedir.

### 3.2.5.2.Delikli Tahta (Hole Board)

Hole-board deney seti 40cm x 40cm x 16cm'lik hazneden oluşmaktadır. Haznenin dip kısmınının 3 cm yukarısında saydam olmayan ve 16 adet 2,2 cm çapındaki deliklerden oluşan yüzey bulunur (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2:** Delikli Tahta (Hole Board) deney düzeneği. Bu deneyde, deney hayvanı düzeneğin orta kısmına bırakılarak 5 dakika boyunca hazneyi keşfetmesine izin verilir. Kemirgenin kafasını daldırarak incelediği delikler tespit edilerek bu delikler keşfedilen delikler olarak kabul edilir. Delik sayısı ile birlikte deney hayvanı düzenekten aldıktan sonra zemin üzerindeki defekasyon sayıları da bizim için önemli oldu. Tespit edilen veriler not alınarak istatistiksel analiz ile değerlendirme yapıldı. Delikli tahta deneyinde, zeminde bulunan çukurlara deney hayvanının kafasını daldırması deneyeğin anksiyete ölçümüne yardımcı olmaktadır. Deliğe başını sokma sayısındaki azalma, artmış anksiyete olarak kabul edilmekte ve deliğe başını sokma sayısındaki azalma ya da az defekasyon yapma emosyonel, stresli ve artmış anksiyete olarak yorumlanır (72-74).

Davranışsal farmakoloji konusundaki çeşitli alanlarda laboratuvar kemirgenlerine eksploratori (keşifçi) davranış deneyidir. Laboratuvar kemirgenlerinde keşifçi davranışlarla ilgili ölçümlerin en iyi nasıl yapılabileceği süregelen bir tartışma olmuştur. Açık alan testleri gibi koşulsuz yapılan pek çok testte keşif sırasındaki lokomotor aktivitelerinde kafa karışıklığı potansiyeli bulunmaktadır. Hole-board deneyi bu kafa karışıklığı potansiyelinin üstesinden gelmek için tasarlanmıştır ve deney hayvanlarının emosyonel durumunu analiz etmek için kullanılan testtir. Hole-board deneyinde 11 – 12 haftalık hayvanlar kullanılmaktadır.

### **3.2.6.CC2D1A HETEROZİGOT (+/-) VE NORMAL (+/+) FARELERDEN HİPOKAMPUS DOKUSU VE SPERM NUMUNELERİNİN ELDE EDİLMESİ**

Çalışma kapsamında istatistiksel olarak uygun (minimum n=5) olacak şekilde *Cc2d1a* heterozigot (+/-) ve Normal (+/+) fareler G1F1-G1F2-G2F1 ve G2F2 'den rastgele seçilmiştir. Seçilen hayvanların davranış testleri tamamlandıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Cerrahi işlemler sırasında tüm aletler %70'lik etanol ile kısa süreli dezenfekte edilerek kullanıldı. Sakrifiye edilen fare tabla üzerine alındı ve steril havlu kapatılarak yumuşak beyin dokusu ile buz üzerine çalışıldı. İki yarım küreye ayrılan beyin dokusundan dikkatli ve hızlı bir şekilde bileteral bölgedeki

hipokampus dokuları alınarak 1ml trizol dolu ependorf tüpe bırakıldı. RNA izolasyonu işlemi ile devam edildi. Hipokampus RNA örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$  derecede dondurularak saklandı.

Sperm örnekleri ise farenin epididimis ve testisleri alınarak elde edildi. PBS dolu petride pens yardımı ile sağılarak 15ml'lik falkon tüplere aktarıldı ve RNA izolasyonu yapıldı. Sperm RNA örnekleri  $-80^{\circ}\text{C}$  derecede dondurularak saklandı.

### 3.2.7.RNA İZOLASYONU

#### 3.2.7.1.Hipokampus Dokusundan RNA İzolasyonu

- Fareden çıkarılan hipokampus dokusu 1ml trizol içine alınıp enjektör ile homojenize edilip  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklandı.
- Çalışacağımız zaman örnekler oda ısısında çözünmeye bırakıldı.
- Yaklaşık 10 kez enjektör ile al ver yapıp iyice homojenize edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 200  $\mu\text{l}$  kloroform eklenir. 15 sn vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
- 12000 g'de 15 dk  $+4^{\circ}\text{C}$  santrifüj edildi.
- Aköz faz yeni tüpe ependorf alındı.
- 500  $\mu\text{l}$  izopropanol eklendi.(Aköz faz miktarına bağlı, 1:1 oranında)
- Birkaç kez alt üst edildi.
- Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 12000 g'de 15 dk  $+4^{\circ}\text{C}$  santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım atıldı.
- 1 ml % 75 etanol eklenip, vortekslendi.
- 7500 g'de 5 dk  $+4^{\circ}\text{C}$  santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım atıldı.
- Pellet etrafındaki etanol pipetle alınıp temizlendi.
- 5-10 dk oda ısısında kurutuldu.
- 30  $\mu\text{l}$  Nuclease Free Water ile pellet resüspanse edildi.
- $+4^{\circ}\text{C}$  buzdolabında 10-15 dk bekletildi.
- Biospec Nano (Shimadzu) ile ölçümü yapıldı.

### 3.2.7.2.Spermden RNA İzolasyonu

- PBS bulunan petride, epididimisten sperm sağılıp, 15'lik falkon tüpe alındı.
- 600 rpm'de 1 dk falkon tüp santrifüj edildi (Sperm süpernatant kısmında, dipte somatik hücreler vardır).
- Süpernatant yeni falkona taşındı.
- 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı (Spermler pellette).
- Yaklaşık 500 µl dH<sub>2</sub>O eklenip pellet resüspanse edildi.
- 2 dk oda sıcaklığında beklendi (pellet şeffaf renk alıncaya kadar süre uzatılabilir).
- Falkon tüp PBS ile 15 cc'ye tamamlandı.
- 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantı atıldı.
- Not: Eğer pellet beyaz ise protokolda bir sonraki basamaktan devam edilir. Değil ise falkon tüp tekrardan PBS ile dolduruldu ve santrifüj edildi, adım tekrarlanmış oldu (pellet şeffaflığa ulaşınca -80°C de bekletilip, daha sonra diğer adımlara devam edilebilir).
- Pellete 20 µl. 5M NaCl eklendi ve resüspanse edildi.
- 3 µl DTT eklendi ve vortekslendi.
- 80 µl double distile su eklendi ve vortekslendi. Ependorf tüpe alındı.
- 400 µl trizol eklendi ve iyice vortekslendi.
- 5 dk buz üzerinde bekletildi.
- 100 µl kloroform eklendi ve vortekslendi.
- Buz üstünde, oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 12.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Aköz fazı yeni tüpe alındı.
- 1:1 oranında izopropanol eklendi.
- Bir gece -20°C 'de bekletildi.
- 14.000 rpm' de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü.
- Tüpü ağzına kadar %70'lik etanol ile dolduruldu.
- 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü.
- 500µl double distile su eklendi ve vortekslendi.
- 25 µl 5M NaCl eklendi ve vortekslendi.
- 1000 µl absolute etanol eklendi ve alt üst edildi.
- Bir gece -20°C 'de bekletildi.

- 14.000 rpm 'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü.
- Tüp ağzına kadar %70'lik etanol ile dolduruldu.
- 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantı döküldü.
- Ependorf tüplerin buz üzerinde kapakları açık bırakılarak etanolün uzaklaşması sağlandı.
- Pellet üzerine 30 µl nükleaz free water eklendi. Pellet çözüldükten sonra Biospec-nano (Shimadzu, ) ile ölçümü yapıldı.
- -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.8.EKSPRESYON ÇALIŞMALARI

#### 3.2.8.1.Gen Ekspresyonu

Çalışmada kullanılan erkek *Cc2d1a* Heterozigot (+/-) fareler ve kontrol grubu hayvanlarına RT-PZR çalışıldı. Gen (*Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1* ve *ACTB*) ve miRNA'lar (*miR-19a-1* ve *miR19-b*) için aynı hayvanların hipokampus dokusu ve sperm RNA örnekleri kullanıldı, G1F1 (n=5 erkek), G1F2 (n=5 erkek), G2F1 (n=5 erkek), G2F2 (n=2 erkek) ve kontrol (n=9 erkek).

- n=5 için; n=3 *Cc2d1a* Heterozigot (+/-), n=2 normal (+/+),
- n=2 için; n=1 *Cc2d1a* Heterozigot (+/-), n=1 normal (+/+),
- n=9 için; n=9 normal (+/+) 'dir.

#### 3.2.8.1.1.cDNA Sentezi

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) kullanılarak cDNA sentezlendi. Aşağıdaki protokol takip edildi.

- 0,2 ml'lik tüpe 1 µl Random Primer eklendi.
- Üzerine 1 µl Oligo Primer eklendi.
- Üzerine 4,4 µl dH<sub>2</sub>O eklendi.
- Üzerine 5 µl RNA eklendi.
- 65°C sıcaklıkta 10 dk inkübe edildi.
- Üzerine 4 µl Reaction Buffer eklendi.
- Üzerine 0,5 µl Protector RNase İnhibitör eklendi.
- Üzerine 2 µl Deoxnucleotid mix eklendi.
- Üzerine 1 µl DTT eklendi.
- Üzerine 1,1 µl Reverse Transkriptase eklendi.

- Aşağıdaki program yapıp PZR cihazına alındı.

29°C            10 dk

48°C            60 dk

85°C            5 dk

- Elde edilen cDNA'lar -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.8.1.2. *ACTB*, *5Htr1a* ve *Neurl1* Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

mRNA ekspresyonlarını belirlemek için LightCycler 480 II (Roche, Germany) Real-Time PZR cihazı kullanıldı.

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

2X Probe Master Mix	10 µl
Primer/Probe	1 µl
Nuclease Free Water	4 µl
cDNA	5 µl

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

95°C            10 dk

95°C            10 saniye

60°C            30 saniye

72°C            1 dk

40°C            30 saniye

} 45 Döngü

- Her bir örnek tek çalışıldı.
- Housekeeping gen olarak beta-actin kullanıldı.
- Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

Gen Adı	Assay ID
<i>Actb</i>	300236
<i>Htr1a</i>	318344
<i>Neurl1</i>	318348

- Veriler  $2^{\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak normalize edildi.

### 3.2.8.3.1. *Cc2d1a* Geni mRNA Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazı kullanıldı.

- cDNA örnekleri 1/5 oranında Nuclease free water ile seyreltildi.
- Aşağıdaki miktarlarda reaksiyon plate (Roche) üzerine dağıtıldı.

2X Probe Master Miks	10 $\mu$ l
Primer Forward	0,4 $\mu$ l
Primer Reverse	0,4 $\mu$ l
UPL Probe	0,4 $\mu$ l
Nükleazfree water	3,8 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l

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

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

- Her bir örnek tek çalışıldı.
- Housekeeping gen olarak beta-actin kullanıldı.
- Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

Gen Adı	Use probe #7
<i>Cc2d1a</i>	Cat.No. 04685059001

- Veriler  $2^{\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak normalize edildi.

### 3.2.8.2.miRNA Ekspresyonu

#### 3.2.8.2.1. DNA SENTEZİ

miScript II RT Kit (Qiagen) kullanılarak cDNA sentezlendi.

Karışım hazırlanışı;

5X miScript RT Buffer (HiSpec)	2µl
RNase free water	1 µl
miScript Reverse Transcriptaz Miks	1 µl
10X Nucleics Miks	1 µl
Template RNA*	5 µl

\* Template RNA 10ng-100ng olmalı. Bu sebeple Template RNA 20ng/ µl olacak şekilde seyreltildi.

- Tüplere 5'er µl karışım dağıtılır. 5 µl RNA eklendi.
- 60 dk 37°C 'de inkübe edildi.
- 5 dk 95°C'de inkübe edildi.
- cDNA -20'ye alındı.

#### 3.2.8.2.2.miR-19a-1 ve miR-19b-1 Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

• cDNA'lar 1/5 oranında sulandırılır. Bunun için sentezlettiğimiz 10 µl cDNA üzerine 40 µl Nucleaz free water eklenip vortekslenildi.

- Her bir reaksiyonda 1-3 ng cDNA olmalı.

Karışım hazırlanışı:

2X miScript SYBR Green Miks	12,5 µl
10X miScript Universal Primer	2,5 µl
10X miScript Primer Assay	2,5 µl
RNase free water	5 µl

- 22,5 µl karışım üzerine 2,5 µl cDNA dağıtıldı.
- Her bir örnek çift çalışılmıştır. House keeping olarak RNU6-2-11 kullanıldı.



- Veriler  $2^{\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak normalize edildi.

Çalışılan miRNA'lar, primer dizileri ve MIMAT kodları aşağıdaki gibidir.

miRNA Adı	Dizisi	MIMAT
mmu-miR-19b-3p	ugugcaaaucgaugcaaaacuga	MIMAT0000513
mmu-miR-19a-3p	ugugcaaaucgaugcaaaacuga	MIMAT0000651

### 3.2.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

#### Davranış Testlerinin İstatistiksel Analizleri

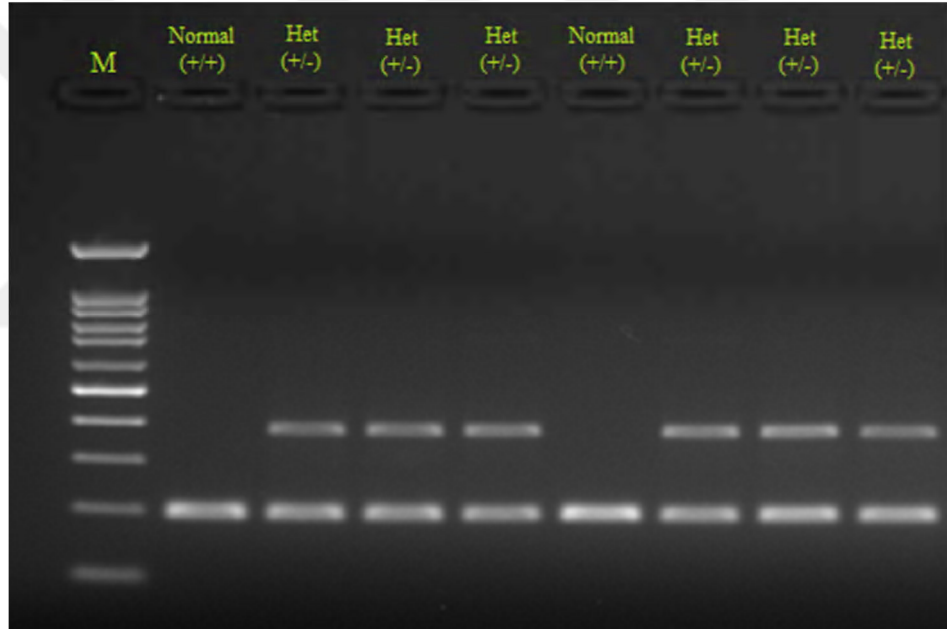
Delikli Tahta ve Yeni Nesne Davranış Testlerinden elde edilen verilerin ortalamaları arasındaki farkların %95'lik güvenilirlik düzeyinde ( $p < 0,05$ ), gruplara (Kontrol, G1F1 Heterozigot, G1F1 Normal, G1F2 Heterozigot, G1F2 Normal, G2F1 Heterozigot, G2F1 Normal, G2F2 Heterozigot ve G2F2 Normal) göre anlamlı olup olmadığının anlaşılması için Graphpad programı One-way ANOVA, Tukey testi kullanılmıştır.

#### mRNA Ekspresyonu ve miRNA Ekspresyonunun İstatistiksel Analizleri

Hipokampus ve Sperm dokularındaki gen ekspresyonlarından elde edilen verilerin ortalamaları arasındaki farkların %95'lik güvenilirlik düzeyinde ( $p < 0,05$ ), gruplara (Kontrol, G1F1 Heterozigot, G1F1 Normal, G1F2 Heterozigot, G1F2 Normal, G2F1 Heterozigot, G2F1 Normal, G2F2 Heterozigot ve G2F2 Normal) göre anlamlı olup olmadığının anlaşılması için Graphpad programı One-way ANOVA, Tukey testi kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR

Bu çalışmada, *Cc2d1a* Heterozigot (+/-) ve kontrol grubu normal (+/+) genotipe sahip Balb-C türündeki erkek ve dişi fareler kullanıldı. Kontrol, Grup 1 (G1) ve Grup 2 (G2) olmak üzere 3 grupta araştırma yapıldı. Gruplardaki deney hayvanlarının genotipleri belirlendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1:** Deney hayvanları genotipleme agaroz jel görüntüsü \*M: Marker

Gruplardaki deney hayvanlarının genotipleri belirlendi. *Cc2d1a* homozigot mutant (-/-) genotipine sahip farelerde, literatür ile uyumlu bir şekilde doğum gözlenmedi. Genotipleri belirlenen *Cc2d1a* Heterozigot (+/-) (n=22) ve normal (+/+) (n=18) farelere davranış testleri uygulandı ve dokular (hipokampus ve sperm) çıkartılarak ekspresyon çalışmaları (n=26) tamamlandı.

## 4.1.DAVRANIŞ TESTLERİNİN BULGULARI

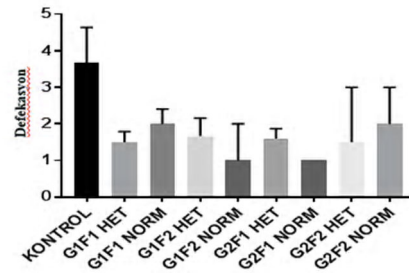
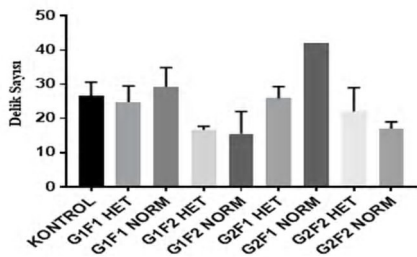
### 4.1.1.DELİKLİ TAHTA (HOLE BOARD)

Delikli tahta deneyinde G1F1 (n=8 erkek), G1F2 (n=8 erkek), G2F1 (n=11 erkek), G2F2 (n=4 erkek) ve kontrol (n=9 erkek) ile çalışma yapıldı. Heterozigot (+/-) ve Normal (+/+) genotipe sahip erkek fareler kullanıldı.

Delikli tahta davranış deneyi "Delik Sayısı" grafiğinde (Şekil 4.2), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; G1F2 Het, G1F2 Norm ve G2F2 Norm, kontrole göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Delikli tahta davranış deneyi "Defekasyon Sayısı" grafiğinde (Şekil 4.3), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; tüm gruplar kontrole göre düşük olmasına rağmen bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışmada "Başını deliğe sokma sayısı" (Şekil 4.2) ve "Defekasyon sayısı" (Şekil 4.3) üzerine yapılan analizler, standart sapma ve p değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2:** Delikli tahta davranış testi uygulanan deney hayvanlarının "Başını Deliğe Sokma Sayısı" grafiği

**Şekil 4.3:** Delikli tahta davranış testi uygulanan deney hayvanlarının "Defekasyon Sayısı" Grafiği

(p>0,05

Heterozigot: Het

Normal: Norm

Grup1 (G1): *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C X Balb-C normal (+/+)

Grup2 (G2): *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C X *Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C)

**Tablo 4.1:** Delikli Tahta Davranış Testi Uygulanan Deney Hayvanlarının "Başını Deliğe Sokma Sayısı" ve "Defekasyon Sayısı" standart sapma ve p değerleri

Çoklu Karşılaştırmalar	Delik Sayısı			Defekasyon Sayısı		
	n =	Ort.±Std. Sapma	P Değeri	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	26,67 ± 11,82		9	3,667 ± 2,915	
G1F1 HET	4	24,75 ± 9,43	>0,9999	4	1,5 ± 0,5774	0,5044
G1F1 NORM	4	29,25 ± 11,24	>0,9999	4	2 ± 0,8165	0,798
G1F2 HET	6	16,67 ± 2,503	0,6102	6	1,667 ± 1,211	0,4372
G1F2 NORM	2	15,5 ± 9,192	0,8731	2	1 ± 1,414	0,5758
G2F1 HET	10	25,9 ± 10,87	>0,9999	10	1,6 ± 0,8433	0,2298
G2F1 NORM	1	42 ± 0	0,8619	1	1 ± 0	0,8654
G2F2 HET	2	22 ± 9,899	0,9995	2	1,5 ± 2,121	0,7985
G2F2 NORM	2	17 ± 2,828	0,9389	2	2 ± 1,414	0,9434

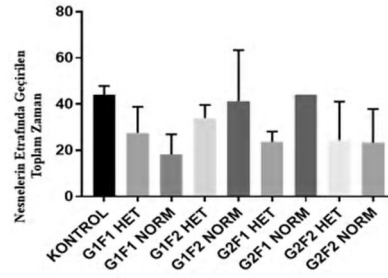
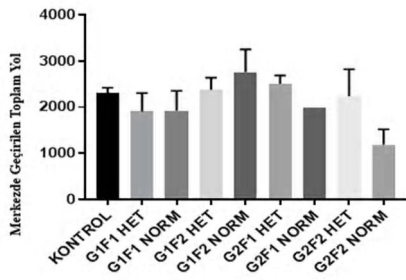
\*Std: Standart \*Het: Heterozigot \*Norm: Normal

#### 4.1.2.YENİ NESNE (NOVEL OBJECT)

Yeni nesne davranış deneyinde G1F1 (n=8 erkek), G1F2 (n=8 erkek), G2F1 (n=12erkek), G2F2 (n=4 erkek) ve kontrol (n=9 erkek) ile çalışma yapıldı. Heterozigot (+/-) ve Normal (+/+) genotipe sahip erkek fareler kullanıldı.

Yeni nesne davranış deneyi “*merkezde geçirilen toplam yol*” grafiğinde (Şekil 4.4), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre değerler birbirine yakın olup, G2F2 Norm’da düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

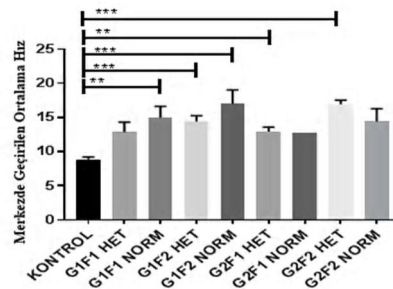
Yeni nesne davranış deneyi “*nesnelerin etrafında geçirilen toplam zaman*” grafiğinde (Şekil 4.5), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; G1F1 Het/Norm ve G2F1 Het, kontrole göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



**Şekil 4.4:** Yeni nesne davranış testi "Merkezde Geçirilen Toplam Yol" grafiği

**Şekil 4.5:** Yeni Nesne Davranış Testi "Nesnelerin Etrafında Geçirilen Toplam Zaman" Grafiği

Yeni nesne davranış deneyi "*merkezde geçirilen ortalama hız*" grafiğinde (Şekil 4.6), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F1 Norm ve G2F1 Het gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, G1F2 Het, G1F2 Norm ve G2F2 Het gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış tespit edilmiştir. G1F1 Het, G2F1 Norm ve G2F2 Norm'de ise kontrole göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışmada "*Merkezde Geçirilen Toplam Yol*" (Şekil 4.4), "*Merkezde Geçirilen Ortalama Hız*" (Şekil 4.6) ve "*Nesnelerin Etrafında Geçirilen Toplam Zaman*" (Şekil 4.5) üzerine yapılan analizler ve p değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** Yeni Nesne Davranış Testi "Merkezde Geçirilen Ortalama Hız" Grafiği

**Tablo 4.2:** Yeni Nesne Davranış Testi "Merkezde Geçirilen Toplam Yol", "Merkezde Geçirilen Ortalama Hız" ve "Nesneler Etrafında Geçirilen Toplam Zaman" standart sapma ve p değerleri

Çoklu Karşılaştırma	Merkezde Geçirilen Toplam Yol			Merkezde Geçirilen Ortalama Hız			Nesneler Etrafında Geçirilen Toplam Zaman		
	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	2307 ± 342,8		9	8,883 ± 1,009		9	44,12 ± 11,4	
G1F1 HET	4	1905 ± 799,5	0,9702	4	12,9 ± 2,842	0,078	4	27,64 ± 22,58	0,7519
G1F1 NORM	4	1924 ± 856,6	0,9778	4	14,98 ± 3,36	0,0013	4	18,3 ± 17,36	0,2126
G1F2 HET	6	2379 ± 632,1	>0,9999	6	14,4 ± 2,097	0,0008	6	34,06 ± 13,66	0,9568
G1F2 NORM	2	2755 ± 702,9	0,9883	2	17,03 ± 2,865	0,0009	2	41,32 ± 31,23	>0,9999
G2F1 HET	10	2506 ± 580,6	0,9982	10	12,96 ± 2,014	0,0062	10	23,6 ± 14,4	0,1751
G2F1 NORM	1	1989 ± 0	0,9999	1	12,76 ± 0	0,7268	1	44,2 ± 0	>0,9999
G2F2 HET	2	2234 ± 824,5	>0,9999	2	16,96 ± 0,841	0,001	2	24,42 ± 23,56	0,825
G2F2 NORM	2	1188 ± 466,4	0,3448	2	14,41 ± 2,673	0,0516	2	23,28 ± 20,7	0,7783

## 4.2.EKSPRESYON BULGULARI

Çalışmada kullanılan erkek *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fareler ve kontrol grubu hayvanlarına RT-PZR çalışıldı. Gen (*Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1* ve *ACTB*) ve miRNA'lar (*miR-19a-1* ve *miR-19b-1*) için aynı hayvanların hipokampus dokusu ve sperm RNA örnekleri kullanıldı (G1F1 (n=5 erkek), G1F2 (n=5 erkek), G2F1 (n=5 erkek), G2F2 (n=2 erkek) ve kontrol (n=9 erkek)).

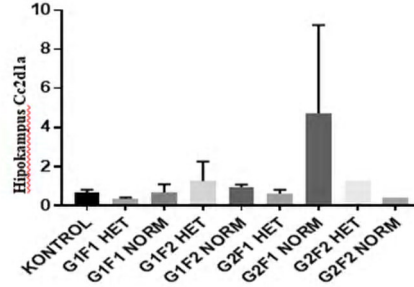
- n=5 için; n=3 *Cc2d1a* Heterozigot (+/-), n=2 normal (+/+),
- n=2 için; n=1 *Cc2d1a* Heterozigot (+/-), n=1 normal (+/+),
- n=9 için; n=9 normal (+/+) 'dir.

### 4.2.1.GEN EKSPRESYONU

#### 4.2.1.1.Hipokampus Dokusundan *Cc2d1a* Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Hipokampus dokusunda *Cc2d1a* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.7), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre değerler birbirine yakın olup, G2F1 Norm'da yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak

anlamli bulunmadi. Hipokampus dokusunda *Cc2d1a* geninin genotip gruplari ve kontrol grubunun standart sapma ve p degerleri Tablo 4.3'te gosterilmistir.



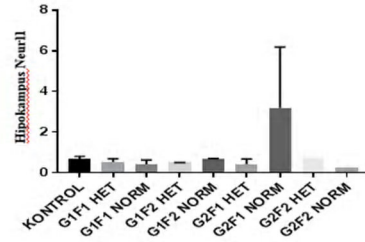
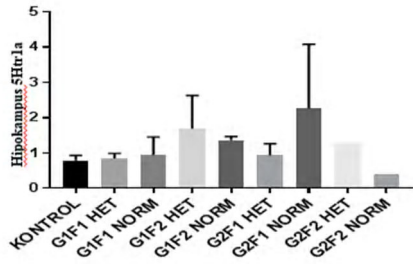
**Şekil 4.7:** Hipokampus dokusunda *Cc2d1a* geninin genotip gruplari ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

#### 4.2.1.2. Hipokampus Dokusundan *5Htr1a* ve *Neurl1* Genlerinin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Hipokampus dokusunda *5Htr1a* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.8), kontrol ve deney gruplari (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F2 Het, G1F2 Norm ve G2F1 Norm yüksek, G2F2 Norm düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadi.

Hipokampus dokusunda *Neurl1* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.9), kontrol ve deney gruplari (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre degerler birbirine yakin olup, G2F1 Norm'da yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadi.

Hipokampus dokusunda *5Htr1a* ve *Neurl1* genlerinin genotip gruplari ve kontrol grubunun standart sapma ve p degerleri Tablo 4.3'te gosterilmistir.



**Şekil 4.8:** Hipokampus dokusunda *5Htr1a* geninin genotip grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

**Şekil 4.9:** Hipokampus dokusunda *Neur1l* geninin genotip grupları ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

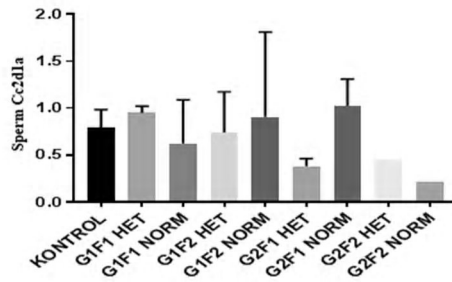
**Tablo 4.3:** Hipokampus dokusunda *Cc2d1a*, *5Htr1a* ve *Neur1l* genlerinin kontrol ve gruplar arasındaki standart sapma ve p değerleri

Hipokampus Dokusu Çoklu Karşılaştırma	<i>Cc2d1a</i> Geni			<i>5Htr1a</i> Geni			<i>Neur1l</i> Geni		
	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	0,6685 ± 0,4386		9	0,7895 ± 0,4169		9	0,6674 ± 0,4074	
G1F1 HET	3	0,3517 ± 0,1226	>0,9999	3	0,8444 ± 0,2476	>0,9999	3	0,5298 ± 0,2611	>0,9999
G1F1 NORM	2	0,6766 ± 0,596	>0,9999	2	0,9411 ± 0,7239	>0,9999	2	0,4091 ± 0,304	>0,9999
G1F2 HET	3	1,262 ± 1,737	0,9998	3	1,688 ± 1,631	0,8641	2	0,4971 ± 0,005728	>0,9999
G1F2 NORM	2	0,9583 ± 0,1694	>0,9999	2	1,362 ± 0,1435	0,9959	2	0,6773 ± 0,03288	>0,9999
G2F1 HET	3	0,6131 ± 0,3403	>0,9999	3	0,9257 ± 0,5856	>0,9999	2	0,4238 ± 0,3439	>0,9999
G2F1 NORM	2	4,73 ± 6,39	0,1192	2	2,251 ± 2,587	0,5592	2	3,194 ± 4,238	0,1862
G2F2 HET	1	1,292 ± 0	>0,9999	1	1,276 ± 0	0,9998	1	0,707 ± 0	>0,9999
G2F2 NORM	1	0,4256 ± 0	>0,9999	1	0,3981 ± 0	>0,9999	1	0,2447 ± 0	>0,9999



#### 4.2.1.3.Sperm Dokusunda *Cc2d1a* Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Spermde *Cc2d1a* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.10), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre, G1F1 Norm, G1F2 Het, G2F1 Het, G2F2 Het/Norm'da düşük, G1F1 Het, G2F1 Norm yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Spermde *Cc2d1a* geninin genotip grupları ve kontrol grubunun standart sapma ve p değerleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

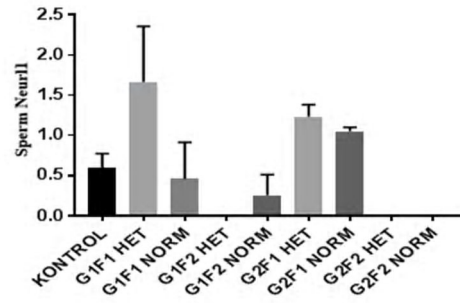
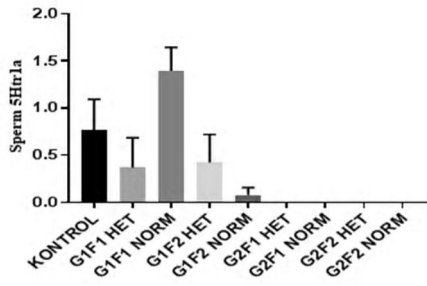


Şekil 4.10: *Cc2d1a*, Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği

#### 4.2.1.4.Sperm Dokusunda *5Htr1a* ve *Neurl1* Geninin Gruplar Arasındaki mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Spermde *5Htr1a* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.11), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F1Het, G1F2 Het/Norm 'da düşük, G1F1Norm'da yüksek, diğer gruplarda (G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) eksprese edilmemesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Spermde *Neurl1* gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması grafiğinde (Şekil 4.12), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F1Het, G1F2 Het/Norm 'da yüksek, G1F1Norm, G1F2 Norm'da düşük, diğer gruplarda (G1F2 Het ve G2F2 Het/Norm) eksprese edilmemesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Spermde *5Htr1a* ve *Neurl1* genlerinin genotip grupları ve kontrol grubunun standart sapma ve p değerleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.11:** *5Htr1a* Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği

**Şekil 4.12:** *Neur1l* Spermde Kontrol ve Gruplar Arasındaki Ekspresyon Grafiği

**Tablo 4.4:** Sperm dokusunda *Cc2d1a*, *5Htr1a* ve *Neur1l* genlerinin kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri

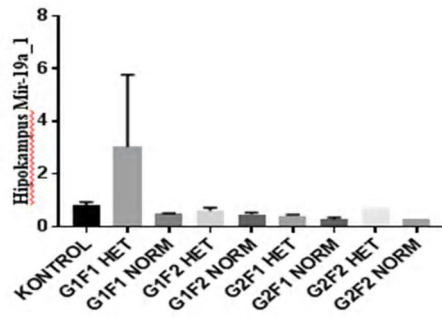
Spermde Çoklu Karşılaştırma	<i>Cc2d1a</i> Geni			<i>5Htr1a</i> Geni			<i>Neur1l</i> Geni		
	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	0,7961 ± 0,5619		9	0,7659 ± 0,987		9	0,5968 ± 0,4978	
G1F1 HET	3	0,9507 ± 0,1217	>0,9999	3	0,3683 ± 0,5496	0,9955	3	1,664 ± 1,199	0,2036
G1F1 NORM	2	0,626 ± 0,652	>0,9999	2	1,396 ± 0,3507	0,9708	2	0,458 ± 0,6477	>0,9999
G1F2 HET	3	0,744 ± 0,7448	>0,9999	3	0,4227 ± 0,5176	0,9983	3	0 ± 0	0,7987
G1F2 NORM	2	0,9055 ± 1,281	>0,9999	2	0,079 ± 0,1117	0,9527	2	0,256 ± 0,362	0,9944
G2F1 HET	3	0,3827 ± 0,1412	0,9743	2	0 ± 0	0,9169	2	1,234 ± 0,2093	0,8582
G2F1 NORM	2	1,025 ± 0,4052	0,9998	2	0 ± 0	0,9169	2	1,051 ± 0,07142	0,9716
G2F2 HET	1	0,449 ± 0	0,9996	1	0 ± 0	0,9842	1	0 ± 0	0,9745
G2F2 NORM	1	0,221 ± 0	0,9882	1	0 ± 0	0,9842	1	0 ± 0	0,3816

## 4.2.2.miRNA EKSPRESYONU

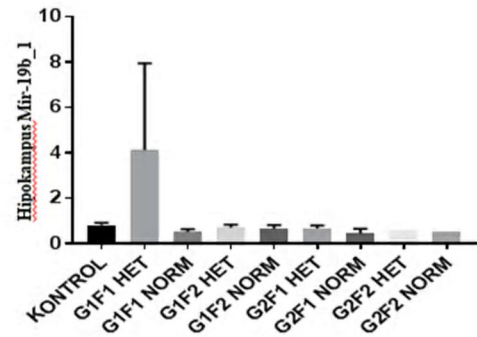
### 4.2.2.1.Hipokampus Dokusundan *miR-19a-1* ve *miR-19b-1*'nin Ekspresyon Seviyeleri

*miR-19a-1*'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi grafiğinde (Şekil 4.13), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre değerler birbirine yakın olup, G1F1 Het yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

*miR-19b-1*'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi grafiğinde (Şekil 4.14), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre değerler birbirine yakın olup, G1F1 Het yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hipokampus dokusunda *miR-19a-1*ve *miR-19b-1*'in genotip grupları ve kontrol grubunun standart sapma ve p değerleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.13:** *miR-19a-1*'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi



**Şekil 4.14:** *miR-19b-1*'in hipokampus dokusunda kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi

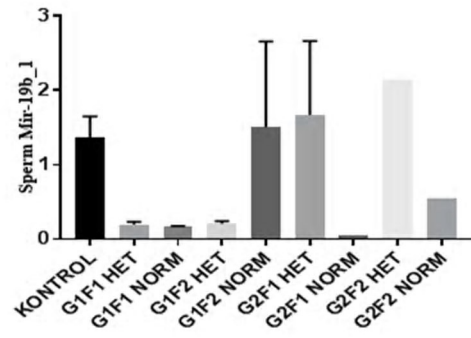
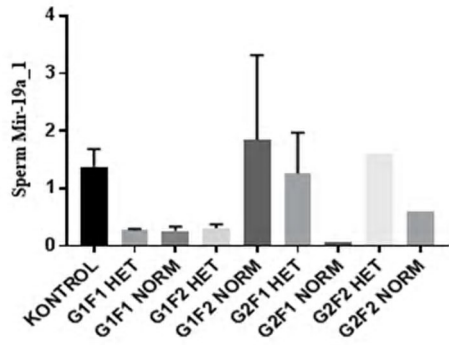
**Tablo 4.5:** Hipokampus dokusunda *miR-19a-1* ve *miR-19b-1*'nin kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri

Hipokampus Dokusu Çoklu Karşılaştırma	<i>miR-19a-1</i>			<i>miR-19b-1</i>		
	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	0,8125 ± 0,3445		9	0,8185 ± 0,2922	
G1F1 HET	3	3,024 ± 4,756	0,5566	3	4,135 ± 6,633	0,4618
G1F1 NORM	2	0,4788 ± 0,03988	>0,9999	2	0,5095 ± 0,1808	>0,9999
G1F2 HET	3	0,5978 ± 0,2126	>0,9999	3	0,6939 ± 0,245	>0,9999
G1F2 NORM	2	0,4688 ± 0,0845	>0,9999	2	0,6544 ± 0,2233	>0,9999
G2F1 HET	3	0,4161 ± 0,06698	>0,9999	3	0,6675 ± 0,2345	>0,9999
G2F1 NORM	2	0,273 ± 0,1105	>0,9999	2	0,4372 ± 0,3083	>0,9999
G2F2 HET	1	0,7071 ± 0	>0,9999	1	0,5743 ± 0	>0,9999
G2F2 NORM	1	0,3099 ± 0	>0,9999	1	0,5434 ± 0	>0,9999

#### 4.2.2.2.Sperm Dokusundan *miR-19a-1* ve *miR-19b-1*'nin Ekspresyon Seviyeleri

*miR-19a-1*'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi grafiğinde (Şekil 4.15), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F2 Norm, G2F2 Het yüksek ve diğer gruplarda (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het, G2F1 Norm ve G2F2 Norm) düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

*miR-19b-1*'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi grafiğinde (Şekil 4.15), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre G1F2 Norm, G2F1 Het ve G2F2 Het yüksek ve diğer gruplarda (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het, G2F1 Norm ve G2F2 Norm) düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sperm dokusunda *miR-19a-1* ve *miR-19b-1*'in genotip grupları ve kontrol grubunun standart sapma ve p değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir



**Şekil 4.15:** *miR-19a-1*'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi

**Şekil 4.16:** *miR-19b-1*'in spermde kontrol ve gruplar arasındaki ekspresyon seviyesi

**Tablo 4.6:** Sperm dokusunda *miR-19a-1* ve *miR-19b-1*'in kontrol ve gruplar arasında standart sapma ve p değerleri

Spermde Çoklu Karşılaştırma	<i>miR-19a-1</i>			<i>miR-19b-1</i>		
	n =	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri	n=	Ort. ± Std. Sapma	P Değeri
KONTROL	9	1,378 ± 0,935		9	1,369 ± 0,8373	
G1F1 HET	3	0,273 ± 0,04158	0,7135	3	0,2003 ± 0,06275	0,6442
G1F1 NORM	2	0,2615 ± 0,1025	0,8386	2	0,179 ± 0,004243	0,7823
G1F2 HET	3	0,311 ± 0,1164	0,747	3	0,2097 ± 0,06407	0,6529
G1F2 NORM	2	1,84 ± 2,089	0,9991	2	1,503 ± 1,632	>0,9999
G2F1 HET	3	1,263 ± 1,23	>0,9999	3	1,671 ± 1,712	0,9999
G2F1 NORM	1	0,077 ± 0	0,9175	1	0,059 ± 0	0,9103
G2F2 HET	1	1,602 ± 0	>0,9999	1	2,144 ± 0	0,9959
G2F2 NORM	1	0,603 ± 0	0,9962	1	0,559 ± 0	0,9945

## 5.TARTIŞMA SONUÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal iletişim ve sosyal etkileşimdeki eksiklikler ve kısıtlı, tekrarlayan davranış kalıplarını içeren, tanı ölçütleri tarafından tanımlanan yaşam boyu gelişme yetersizliğidir. İlk belirtiler ve semptomlar tipik olarak çocukluk döneminde görülür. Fonksiyonel sınırlamalar, otistik kişiler arasında farklılık ve zaman içinde değişiklik gösterebilir (20).

Otizmin moleküler mekanizması tam olarak bilinmiyor olsa da genetik çalışmalardaki hızlı ilerlemeler, hayvan model sistemleri ve sistem biyolojisi yöntemler sayesinde, otizmde nörogelişim için kritik olan farklı etiyolojilerin ve ortak moleküler ve hücrel yolların belirlenebileceği ifade edilmektedir (75).

Yaptığımız çalışmada otizm için hayvan modeli oluşturarak RNA ve paternal kalıtımın nesillerarası geçişini takip etmeyi amaçladık. Bunun için;

- 1) Otizmin erkeklerde kızlara göre daha çok görülmesi göz önünde bulundurularak, erkek deney hayvanları ve bu hayvanların spermlerinden elde edilen mRNA'lar üzerinde çalışılmayı planladık.
- 2) Klinikte öğrenme ve hafıza üzerine dikkat çeken yönleri hedef alınarak beynin öğrenme ve hafızadan sorumlu bölgesi olan hipokampus dokusundan elde edilen mRNA'lar üzerinde çalışıldı.
- 3) Otizm de görülen anksiyete, stres gibi sosyal ve bilişsel yönlerini ölçebilmek için, kullanılan deney hayvanları üzerinde, davranış testlerinden Yeni Nesne (Novel Object) ve Delikli Tahta (Hole Board) deneyleri uygulanmıştır. Çalışmada sperm ve hipokampus dokuları rastgele seçilen deney hayvanlarından değil, otizme etkisi olduğu bilinen *Cc2d1a* geni yönünden susturulmuş ve *Cc2d1a* geni yönünden normal (+/+) genotipe sahip Balb-c ırkı fareler çiftleştirilerek üretilen yavrulardan faydalanıldı. Otizmin nesillerarası geçişini görebilmek için bahsedilen yavruların iki

kuşak takibi yapılarak F1 ve F2 neslinden elde edilen erkek fareler çalışmada kullanıldı. Yapılan çalışmada *Cc2d1a* geni ile literatürde ilişkisi olduğu düşünülen *5Htr1a*, *Neur11* genleri ve *miR-19a-1*, *miR-19b-1* miRNA'larının sperm ve hipokampus dokusunda ekspresyonuna bakılmıştır. Literatürde *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fare modelleri ile ilgili nadir çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında araştırılan gen (*5Htr1a*, *Neur11*) ve miRNA'ların (*miR-19a-1*, *miR19b-1*) *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fare modellerinde değerlendirildiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan çalışmanın bu yönüyle özgün olduğu düşünülmektedir.

Oaks ve arkadaşları; *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fare modellerinde bilişsel ve sosyal eksikliklere yol açan beynin fonksiyonel ve morfolojik gelişimi üzerine çalışmışlardır. *Cc2d1a* heterozigot (+/-) olan hayvanların da diğerlerine göre anksiyete, öğrenme ve hafıza, hiperaktivite, bilişsel bozukluk gibi olumsuzlukların oluştuğunu çeşitli analizlerle bildirmişlerdir. Deney gruplarında bilişsel fonksiyonları test etmek için Yeni Nesne davranış testinin de içinde bulunduğu bazı davranış deneyleri uygulamışlardır. Yeni nesne davranış testinde ilk gün alıştırma günü ve ikinci günü test günü olarak değerlendirmişlerdir. İkinci gün değişen nesneyi farelerin fark etmelerini beklemişlerdir. *Cc2d1a* normal (+/+) genotip fareler ikinci gün koyulan yeni nesnedeki değişikliği fark edip etrafında uzun süre dolaşırken, *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fareler önemli düzeyde nesne etrafında zaman harcamadıklarını tespit etmişlerdir. Bu da ilk gün yapılan nesne ve mekanı tanıma ölçütünü hatırlamadıklarını göstermektedir (79).

Kumar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; prenatal valproik asit uygulayarak otistik fare oluşturmuşlar ve otizm spektrum bozukluğuna beyin bariyerindeki değişiklikleri deney hayvanlarında araştırmışlardır. Moleküler çalışmaların yanı sıra davranış testlerini de yapmışlar ve hayvanların keşfetme davranışlarını araştırmak için *delikli tahta* deneyini uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda hayvanlarda keşfetme düzeyinin azaldığını gözlemlemişlerdir (81,82).

Bizim yaptığımız çalışmada, literatürde bulunan çalışmalara benzer olarak, *Yeni Nesne Davranış Testi*, Merkezde Geçirilen Toplam Yol grafiği, Merkezde Geçirilen Ortalama Hız grafiği ve Nesnelerin Etrafında Geçirilen Toplam Zaman deneyleri yapılmıştır. Yeni nesne davranış deneyi “*merkezde geçirilen toplam yol*” grafiğinde (Şekil 4.4), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; kontrole göre değerler birbirine yakın olup, G2F2 Norm'da düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Yeni

nesne davranış deneyi “*nesnelerin etrafında geçirilen toplam zaman*” grafiğinde (Şekil 4.5), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında; G1F1 Het/Norm ve G2F1 Het, kontrole göre düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Yeni nesne davranış deneyi “*merkezde geçirilen ortalama hız*” grafiğinde (Şekil 4.6), kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) tek tek karşılaştırıldığında ise; kontrole göre G1F1 Norm ve G2F1 Het gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, G1F2 Het, G1F2 Norm ve G2F2 Het gruplarında istatistiksel olarak çok anlamlı artış tespit edilmiştir. G1F1 Het, G2F1 Norm ve G2F2 Norm’de ise kontrole göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuçlar, otizm gözlenen bireylerdeki nöbet geçirdiklerinde yaşadıkları hızlı davranışlar ve alıştıkları ortamdan farklı bir ortam içerisine girdiklerinde gösterdikleri tepkiler, hiperaktivite ve stresli olmaları ile bağdaştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada yeterli sayıda fare elde edilememesinden dolayı artış tespit edilmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Yaptığımız çalışmada, literatürde bulunan çalışmalara (72–74) benzer olarak, delikli tahta davranış testi, “*delik sayısı*” (Şekil 4.2) ve “*defekasyon sayıları*” (Şekil 4.3) değerlendirilmiştir. Delik sayısı ve defekasyon sayısı değerlendirmelerde, kontrol ile gruplar arasında ve grupların kendi aralarında yapılan analizlerde, bazılarında artış, bazılarında azalış gözlenmiş olup anlamlı sonuç elde edilememiştir. Gruplarda yeterli sayıda fare örneği olmamasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı sonuçların elde edilemediği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, *Cc2d1a* geninin beyin işlevini etkilediği (10,76,77) bulunmuştur. Bu çalışmalar arasında deney hayvanları ile yapılan ve *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fare modelinin de kullanıldığı birkaç araştırmaya yer verilmiştir (51,78,79). İnsanlarda *CC2D1A* heterozigot ya da homozigot mutant olması durumunda bilişsel gerilik (ID) gözlendiği ve *Cc2d1a* heterozigot (+/-) farelerde yapılan çalışmada *Cc2d1a* geni homozigot mutant (-/-) olması durumunda ise letal olduğu ve *Cc2d1a* geninin, farelerin hayatta kalması için ve sinapsların fonksiyonel olgunlaşması için önemli olduğu bilinmektedir (51).

Millar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; *Cc2d1a* geninin transkripsiyonun düzenlenmesini, Notch, Akt, serotonin ve NF-κB sinyalizasyonunu etkilediği belirtilmektedir. Transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonun yanı sıra bahsedilen sinyal



yollarının her biri hücre içi ya da dışı gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığından, *Cc2d1a*'nın kontrolü altındaki bu yollardan en azından bazılarının bozulması durumunda, nöronal gelişim mekanizmalarında *Cc2d1a* geninin ifadesinin bozulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu sistemlerden birinin veya daha fazlasının düzensizleşmesinin sonucunda otizm, ID gibi sağlık problemlerine yol açan gelişimsel anormalliklerin ortaya çıkabileceği ifade edilmiştir (50).

Ou XM ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; Millar ve arkadaşlarının da bahsettiği sinyal yollarından biri olan serotonin nöroenezis reseptörü *5Htr1a* reseptör geni ile *Cc2d1a* geni arasındaki ilişkiyi birden fazla moleküler çalışmalarla değerlendirmişlerdir. İnsanda bulunan *Cc2d1a* proteininin, ratlarda bulunan *Cc2d1a* proteini ile yüksek benzerlik gösterdiğini ve *5Htr1a* reseptör geninin baskılayıcısı olduğunu bildirmişlerdir. *Cc2d1a*, *5Htr1a* geninin baskılayıcı elemanına bağlanarak nöronlardaki bazal *5Htr1a* geninin ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini göstermişlerdir (58,59).

Şener ve arkadaşları bu çalışmalara paralel olarak; otistik hastaların kan örneklerinden elde ettikleri mRNA'lar ile *CC2D1A* ile *5HTR1A* genleri arasındaki ilişkiyi otizmlili bireyler ile kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. *CC2D1A* geni ekspresyon seviyesi kontrole göre yüksek bulunurken, *5HTR1A* geni ekspresyon seviyesi kontrole düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Ayrıca hasta grubunda ID tanısı alan bireylerin, ID ve *CC2D1A* geni ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı çıkarken, ID ve *5HTR1A* geni ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca pozitif aile öyküsüne sahip bireyler için de *CC2D1A* ile *5HTR1A* genleri arasındaki ilişkiye bakılmış fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşamamışlardır (10).

Pavlopoulos ve arkadaşları yaptığı çalışmada; *Neurl1* geninin hipokampus üzerindeki moleküler mekanizmasını araştırmışlar ve aşırı ifade edilmesi durumunda omurga ve hipokampus fonksiyonel sinapslardaki sayıyı artırdığını ve artan hipokampus fonksiyonel sinapslara bağlı olarak bellek ve sinaptik plastisiteyi olumlu etkilediğini bulmuşlardır. Tersini durumunda *Neurl1* geninin az ifade edilmesi hipokampusa bağlı bellek ve sinaptik plastisiteyi bozar. Bu sonuçlar, diğer moleküler mekanizmalardaki protein sentezi ve sinaps oluşumunu modüle ederek, *Neurl1* genine bağımlı hipokampal plastisite ve hipokampusa bağlı hafızanın korunmasını kolaylaştırdığını ifade etmişlerdir. Moleküler çalışmalar ile birlikte çalışmadaki fareleri bazı davranış testlerine

tabi tutmuşlardır. Yeni nesne davranış testi uygulamışlar ve anlamlı sonuçlara ulaşmamışlardır (68).

Yaptığımız çalışmada, *Cc2d1a* ve *5Htr1a* gen ekspresyonu için kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) arasında yapılan sperm ve hipokampus dokularındaki mRNA ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Bunun sebebinin kontrol ve deney gruplarındaki hayvan sayılarının yeterli sayıda olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca *5Htr1a* geninin Grup 2 (*Cc2d1a* het (+/-) Balb-C X *Cc2d1a* het (+/-) Balb-C) 'de anlamsız da olsa ekspresyonunun olmadığı, Grup 1 (*Cc2d1a* heterozigot (+/-) Balb-C X Normal Balb-C)'de ekspresyonunun var ama istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonuçlar arasındadır. Literatürde *5Htr1a* geninin ekspresyonu testiste varken, bizim deney gruplarımızdan Grup2'de *5Htr1a* geninin ekspresyonu tespit edilmemiştir.

Tez çalışmasında, *Cc2d1a* heterozigot (+/-) fare modellerinde *Neurl1* gen ekspresyon düzeylerine de bakılmıştır ve kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) arasında yapılan sperm ve hipokampus dokularındaki istatistiksel analizlerden anlamlı farklanma elde edilememiştir (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). *Neurl1* geni, Notch sinyal yolağı ile ilişkilendirilmekte ve inhibe edici özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (14,83). Bu bilgi ile beraber *Cc2d1a* geninde “ölümcül (2) dev diskler ( L(2)gd )” olarak tanımlanan mutasyonların etkilerinin Notch sinyal yolağının güçlü aktivasyonu aracılığıyla sağlandığı bilinmektedir (51). Bu yüzden aynı sinyal yolağından etkilenen *Cc2d1a* ve *Neurl1* genleri arasındaki ilişkiye daha fazla sayıda örnek kullanılarak bakılabilir. Çünkü daha önce hafıza üzerine yapılan bir çalışmada, fare hipokampus dokusunda *Neurl1* geninin eksprese olduğu bilinmekte ve aynı sinyal yolağındaki *Cc2d1a* geni ile ilişkisi olabileceği için eksprese edilmiyor ya da ediliyor olabilir. Bir diğer bakış açısı ise, yaptığımız çalışmada deney gruplarında daha fazla örnek ile çalışılırsa bu fark anlamlı olabilir.

Anitha ve Thanseem 2015 yılında yaptıkları çalışmada; miRNA'lar ve otizm üzerine yapılan çalışmaları “mikroRNA ve Otizm” isimli bir kitapta toplamışlardır. Genel olarak otizmlili bireylerde birçok miRNA profiline ekspresyon düzeyinde bakılmış bazıları anlamlı bulunurken bazılarında anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (80).

Vasu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 55 otizmlili bireyin serum örneklerinde, 125 miRNA örneklerinin ekspresyonuna bakmışlardır. Bu 125 miRNA'dan 13 tanesinde

anlamli sonuçlar elde edilmiştir. *miR-151a-3p*, *miR-181b-5p*, *miR-320a*, *miR-328*, *miR-433*, *miR-489*, *miR-572* ve *miR-663a* 'nın ekspresyonunun azaldığı gözlenirken, *miR-101-3p*, *miR-106b-5p*, *miR-130a-3p*, *miR-195-5p* ve *miR-19b-3p* 'nin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (36). Ekspresyonu artan miRNA'lerden birisi de *miR-19b-3p*'dir.

Toma ve arkadaşları yaptığı çalışmada; 636 otizmlili ve 673 sağlıklı kontrolün kan örneklerinde 163 miRNA'nın ekspresyon seviyelerini belirlemişlerdir. *miR-19a-1*'ninde bulunduğu birkaç miRNA'nın ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı farklandığını tespit etmişlerdir. (33).

Yaptığımız çalışmada ayrıca, *Cc2d1a* geninin regülatörü olan *miR-19a-1* ve *miR-19b-1* 'nin hipokampus ve sperm dokularında ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir ve kontrol ve deney grupları (G1F1 Het/Norm, G1F2 Het/Norm, G2F1 Het/Norm ve G2F2 Het/Norm) arasında artış/azalma tespit edilmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Bu durum kontrol ve deney gruplarındaki deney hayvanları sayılarının yetersiz olmasından kaynaklanabilir.

Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara göre; *Cc2d1a* geninin diğer genler (*5Htr1a* ve *Neurl1*) ve miRNA'lar (*miR-19a-1* ve *miR-19b-1*) ile ilişkisinin olduğu literatürde yer almasına rağmen farklanma tespit edilmiştir fakat bu farklanma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bilgilerle beraber *5Htr1a* geninin testislerde ekspresyonu olmasına rağmen yaptığımız çalışmada sperm RNA'larında bazı gruplarda ekspresyonunun olmadığı tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışma *Cc2d1a*, *5Htr1a*, *Neurl1* genleri ile *miR-19a-1* ve *miR-19b-1* arasındaki ilişkiye bakılan literatürdeki ilk çalışmadır. Ekspresyon seviyelerinde artış ya da azalma olmasına rağmen bu farklanmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Örnek sayısı artırılarak çalışma yapıldığında bu farklanmaların istatistiksel olarak anlamlı olacağını düşünmekteyiz. Otizm multifaktoriyel ve heterojen bir hastalık olmakla birlikte görülme şiddeti de bireylere göre değişmektedir. Bu yüzden, bu tez çalışmasında yapılan araştırmaların daha kapsamlı bir şekilde, örneğin deney gruplarındaki deney hayvanı sayıları artırılarak ya da grup sayılarının tekrar belirlenerek analiz edilmesi ile daha anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği ve otizmin *Cc2d1a* geni ile ilişkisi olduğu düşünölen/belirlenen yolların aydınlatılması ile yeni moleköler çalışmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

## 6.KAYNAKLAR

1. Aksoy V, Doç Y, Üniveristesi A, Araştırma E. Otizm Spektrum Bozukluğu Gösteren Çocuklar için Eğitsel Değerlendirme ve Öğrenme Hızı Öngörüsü Kayıt Formlarının Psikometrik Niteliklerinin Belirlenmesi 2017;16(1):60–77.
2. Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries , Washington, 2012;61(3):1–19.
3. Şener EF, Özkul Y. The Genetic Basis of Autism. Sağlık Bilimleri Dergisi Journal, of Health Sciences 2013;22(1):86–92.
4. Özeren SG. Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları / Pediatric Mental Health and Diseases. Acıbadem Üni Sağlık Bilimleri Dergisi 2013;4(2).12-16.
5. Zhubi A, Cook EH, Guidotti A, Grayson DR. Epigenetic mechanisms in autism spectrum disorder. International Review of Neurobiology 2014;115:203–44.
6. Müzeyyen İ. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar 2013;20(1):48–51.
7. Kaptan Z, Üzüm G. Erişkin hipokampal nörogenezin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki rolü. C. 22, Turk Noroloji Dergisi 2016. 149–55.
8. Case-Smith J, Weaver LL, Fristad MA. A systematic review of sensory processing interventions for children with autism spectrum disorders. Autism 2015;19(2):133–48.
9. Rakap S, Birkan B Kalkan SD. Türkiye’de Otizm Spektrum Bozukluğu Ve Özel Eğitim Tohum ve Oteizm Vakfı Yayınları, Ankara, 2017
10. Sener EF, Cıkılı Uytun M, Korkmaz Bayramov K, et al. The roles of *CC2D1A*

- and HTR1A gene expressions in autism spectrum disorders. *Metabolic Brain Disease* 2016;31(3):613–9.
11. Rogaeva A, Galaraga K, Albert PR. The Freud-1/*CC2D1A* family: Transcriptional regulators implicated in mental retardation. *C. 85, Journal of Neuroscience Research* 2007; 2833–8.
  12. Basel-Vanagaite L. Genetics of autosomal recessive non-syndromic mental retardation: Recent advances. *C. 72, Clinical Genetics.* 2007, 167–74.
  13. Basel-Vanagaite L, Taub E, Halpern GJ, et al. Genetic screening for autosomal recessive nonsyndromic mental retardation in an isolated population in Israel. *European Journal of Human Genetics.* 2007;15(2):250–3.
  14. Teider N, Scott DK, Neiss A, et al. Neuralized1 causes apoptosis and downregulates Notch target genes in medulloblastoma. *Neuro-Oncology* 2010;12(12):1244–56.
  15. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *C. 2, Nervous Child.* 1943. 217–50.
  16. Sener EF, Oztop DB, Ozkul Y. *MTHFR* Gene C677T Polymorphism in Autism Spectrum Disorders. *Genetics Research International* 2014;2014:1–5.
  17. Top FÜ. Otistik Çocuğa Sahip Ailelerin Yaşadıkları Sorunlar ile Ruhsal Durumlarının Değerlendirilmesi : Niteliksel Araştırma 2009;9(1):34–42.
  18. Genet ZM, Yüksel A. İi T. 35 Otizm Genetiği. *American Journal of Epidemiology* 2005;9:35–41.
  19. Stankovic M, Lakic A, Ilic N. Autism and autistic spectrum disorders in the context of new DSM-V classification, and clinical and epidemiological data. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo* 2012;140(0370–8179
  20. Christensen DL, Baio J, Braun KVN, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* 2016;65(3):1–23.

21. Baio J. 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* 2014;63(2):1–21.
22. Sener EF, Canatan H, Ozkul Y. Recent advances in autism spectrum disorders: Applications of whole exome sequencing technology. *C. 13, Psychiatry Investigation* 2016. 255–64.
23. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. *C. 251, Behavioural Brain Research.* 2013. 95–112.
24. Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *C. 57, Folia medica* 2015. 19–28.
25. Firat S, Diler RS, Avci A, Seydaoglu G. Comparison of psychopathology in the mothers of autistic and mentally retarded children. *Journal of Korean medical science* 2002;17(5):679–85.
26. Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, et al. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(45):16834–9.
27. Tsang KM, Croen LA, Torres AR, et al. A Genome-Wide Survey of Transgenerational Genetic Effects in Autism. *PLoS One.* 2013;8(10).
28. Tuchman R, Cuccaro M, Alessandri M. Autism and epilepsy: Historical perspective. *C. 32, Brain and Development* 2010. 709–18.
29. Rassoulzadegan M, Cuzin F. From paramutation to human disease: RNA-mediated heredity. *C. 44, Seminars in Cell and Developmental Biology* 2015. 47–50.
30. Kürekçi GK, Bunsuz M, ÖNAL G, Dinçer P. Kazanılmış Epigenetik Değişikliklerin Kalıtımı Ve Hastalıklara Yatkınlıktaki Rolü *İst Tıp Fak Derg* 2017; 80: 1 2017;(3):45–53.
31. Roth TL, Roth ED, Sweatt JD. Epigenetic regulation of genes in learning and memory. *Essays In Biochemistry* 2010;48:263–74.

32. Klengel T, Dias BG, Ressler KJ. Models of Intergenerational and Transgenerational Transmission of Risk for Psychopathology in Mice. *C. 41, Neuropsychopharmacology* 2016. 219–31.
33. Toma C, Torrico B, Hervás A, et al. Common and rare variants of microRNA genes in autism spectrum disorders. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 2015;1–11.
34. Mundalil Vasu M, Anitha A, Thanseem I, et al. Serum microRNA profiles in children with autism. *Molecular Autism* 2014;5(1).
35. Scott JA, Schumann CM, Goodlin-Jones BL, Amaral DG. A comprehensive volumetric analysis of the cerebellum in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 2009;2(5):246–57.
36. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: Genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2012;14(3):281–92.
37. Şener EF, Özkul Y. The Genetic Basis of Autism. *Sağlık Bilimleri Dergisi Journal, of Health Sciences* 2013;22(1):86–92.
38. Feinberg JI, Bakulski KM, Jaffe AE, Tryggvadottir R, Brown SC, Goldman LR, vd. Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *International Journal of Epidemiology* 2015;44(4):1199–210.
39. Smith RG, Fernandes C, Kember R, Schalkwyk LC, Buxbaum J, Reichenberg A, vd. Transcriptomic changes in the frontal cortex associated with paternal age. *Molecular Autism* 2014;5(1):24.
40. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus : Yapısı ve Fonksiyonları Hippocampus : Its Structure and Functions. 2015;287–95.
41. Chalavi S, Adab HZ, Pauwels L, et al Anatomy of Subcortical Structures Predicts Age-Related Differences in Skill Acquisition. *Cerebral Cortex* 2016: 459–73.
42. Songur A, ÖZEN OA, Sarsilmaz M. Hipokampus. 2001;427–31.

43. Eker MÇ, Eker ÖD. Depresyon Patofizyolojisinde Hippokampusun Rolü- The Role of Hippocampus in the Depression 2009;1(Mdd):11–21.
44. Boucher J, Mayes A, Bigham S. Memory in autistic spectrum disorder. *Psychological Bulletin* 2012;138(3):458–96.
45. Kaya M, Çevik A. Planning in animal experiments and choosing model. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 1M.S.;1:36–9.
46. Başar K, Ertuğrul A. Depresyon Araştırmalarında Kullanılan Hayvan Modelleri 2005;123–34.
47. Moy SS, Nadler JJ, Magnuson TR, Crawley JN. Mouse models of autism spectrum disorders: The challenge for behavioral genetics. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 2006;142C(1):40–51.
48. Moy SS, Nadler JJ. Advances in behavioral genetics: Mouse models of autism. *C. 13, Molecular Psychiatry* 2008. 4–26.
49. Foldi CJ, Eyles DW, Flatscher-Bader T, McGrath JJ, Burne THJ. New Perspectives on Rodent Models of Advanced Paternal Age: Relevance to Autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2011;5.
50. M. A, Souslova T, R. P. The *Freud-1/CC2D1A* Family: Multifunctional Regulators Implicated in Mental Retardation. *Latest Findings in Intellectual and Developmental Disabilities Research* 2012;
51. Zhao M, Raingo J, Chen ZJ, Kavalali ET. *Cc2d1a*, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses. *J Neurophysiol* 2011;105(4):1506–15.
52. Zhao M, Li XD, Chen Z. CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF- $\kappa$ B through the canonical pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285(32):24372–80.
53. Albert PR, Le François B, Millar AM. Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *C. 4, Molecular Brain*. 2011.
54. Oblak A, Gibbs TT, Blatt GJ. Reduced serotonin receptor subtypes in a limbic and



- a neocortical region in autism. *Autism Research* 2013;6(6):571–83.
55. David SP. A Functional Genetic Variation of the Serotonin (5-HT) Transporter Affects 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Binding in Humans. *Journal of Neuroscience* 2005;25(10):2586–90.
  56. Gabriele S, Sacco R, Persico AM. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology* 2014;24(6):919–29.
  57. Selvaraj S, Arnone D, Cappai A, Howes O. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *C. 45, Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2014. 233–45.
  58. Ou XM, Jafar-Nejad H, Storrington JM, et al Novel dual repressor elements for neuronal cell-specific transcription of the rat 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(11):8161–8.
  59. Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, Bown CD, Goto A, Rogaeva A, vd. Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene. *J Neurosci* 2003;23(19):7415–25.
  60. Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, vd. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(25):15049–54.
  61. Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(18):10734–9.
  62. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, et al. Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95(24):14476–
  63. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, et al. 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptor Levels Determine Vulnerability to Stress and Response to Antidepressants. *Neuron*

2010;65(1):40–52.

64. Klein T. The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development. *Developmental Biology* 2003;255(2):313–33.
65. Childress JL, Acar M, Tao C, Halder G. Lethal Giant Discs, a Novel C2-Domain Protein, Restricts Notch Activation during Endocytosis. *Current Biology* 2006;16(22):2228–33.
66. Gallagher CM, Knoblich JA. The Conserved C2 Domain Protein Lethal (2) Giant Discs Regulates Protein Trafficking in *Drosophila*. *Developmental Cell* 2006;11(5):641–53.
67. Jaekel R, Klein T. The *Drosophila* Notch Inhibitor and Tumor Suppressor Gene *lethal (2) giant discs* Encodes a Conserved Regulator of Endosomal Trafficking. *Developmental Cell* 2006;11(5):655–69.
68. Pavlopoulos E, Trifilieff P, Chevaleyre V, et al. Neuralized1 activates CPEB3: A function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage 2011;147(6):1369–83.
69. Soyocak A, Özgen M, Kurt H, et al. Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2014;12(121):45–56.
70. Soyocak A, Özgen M, Kurt H, Coşan DT, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA ' lar ve Osteoartrit 2016;38(1):6–17.
71. Wu YE, Parikshak NN, Belgard TG, Geschwind DH, Angeles L, Angeles L, vd. *HHS Public Access* 2018;19(11):1463–76.
72. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 1998;350(1):21–9.
73. Memi G, Yegen BC. Role of Ovarian Hormones in Psychological Stress-induced Oxidative Organ Damage in Rats. *Clinical and Experimental Health Sciences* 2016;6(2):72–9.

74. Can ÖD, Turan N, Alyu F. 1,3,5-Triaril-4,5-Dihidro-1H-Pirazol Türevi Bazı Bileşiklerin Benzodiazepin Reseptörleri Aracılıklı Anksiyolitik-Benzeri Etkileri. Cukurova Medical Journal 2016;41(2):304.
75. Lai M-C, Lombardo M V, Baron-Cohen S. Autism. Seminar 896 www.thelancet.com. 2014;383.
76. Sadoul R, Laporte MH, Chassefeyre R, et al The role of ESCRT during development and functioning of the nervous system. Seminars in Cell and Developmental Biology 2017;
77. Deshar R, Cho EB, Yoon SK, Yoon JB. *CC2D1A* and *CC2D1B* regulate degradation and signaling of EGFR and TLR4. Biochemical and Biophysical Research Communications 2016;480(2):280–7.
78. Zamarbide M, Oaks AW, Pond HL, Adelman JS, Manzini MC. Loss of the intellectual disability and autism gene *Cc2d1a* and its Homolog *Cc2d1b* differentially affect spatial memory, anxiety, and hyperactivity. Frontiers in Genetics 2018.
79. Oaks AW, Zamarbide M, Tambunan DE, et al. *Cc2d1a* Loss of Function Disrupts Functional and Morphological Development in Forebrain Neurons Leading to Cognitive and Social Deficits. Cerebral Cortex <http://www.cercor.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cercor/bhw009> (E.T. 11.03.2018)
80. Anitha A, Thanseem I. MicroRNA and autism. İçinde: Advances in Experimental Medicine and Biology. 2015. 71–83.
81. Kumar H, Sharma BM, Sharma B. Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder. Neurochemistry International 2015;91:34–45.
82. Kumar H, Sharma B. Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. Brain Research Bulletin 2016;124:27–39.
83. Koutelou E, Sato S, Tomomori-Sato C, et al. Neuralized-like 1 (Neur11) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the notch ligand jagged1. Journal of Biological Chemistry 2008;283(7):3846–53.

## OTİZM'DE RNA KALİTİMİNİN ARAŞTIRILMASI

### ORIGINALITY REPORT

10%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

### PRIMARY SOURCES

1

[sagens.erciyes.edu.tr](http://sagens.erciyes.edu.tr)

Internet Source

1%

2

[zapffe.mat-stat.uit.no](http://zapffe.mat-stat.uit.no)

Internet Source

1%

3

[www.acadsci.fi](http://www.acadsci.fi)

Internet Source

1%

4

[axon.cs.byu.edu](http://axon.cs.byu.edu)

Internet Source

1%

5

[www.tohumotizm.org.tr](http://www.tohumotizm.org.tr)

Internet Source

<1%

6

[www.njfreeways.com](http://www.njfreeways.com)

Internet Source

<1%

7

[docplayer.biz.tr](http://docplayer.biz.tr)

Internet Source

<1%

8

[ahid.org.tr](http://ahid.org.tr)

Internet Source

<1%

9

[faculty.ksu.edu.sa](http://faculty.ksu.edu.sa)

Internet Source

<1%

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Fatma ŞİMŞEK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 09.01.1990

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0542 789 63 85

email: sahin.fatmaa@gmail.com

Yazışma Adresi: Yenimahalle Aşyan Sok. Almina Apt. 38/19 Melikgazi KAYSERİ

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi	Halen
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fak.	2011
Lise	Prof. Dr. Şevket Raşit Hatipoğlu Lisesi Yenimahalle Ankara	2006

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017- Halen	Kayseri Şeker Fab.	ARGE- Araştırmacı
2017-	İncesu İlçe Milli Eğitim Müd. Ücretli Öğretmenlik	
2011-2015	Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi	Araştırmacı

### YABANCI DİL

İngilizce Orta Derece