

**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRORNA (miRNA) OLUŞUM YOLAĞINDA YER ALAN GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN DİKKAT EKSİKLİĞİ VE  
HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU RİSKİ ÜZERİNE OLASI  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Ümit KARAKAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

MERSİN – 2012

**T.C.  
MERSİN UNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRORNA (miRNA) OLUŞUM YOLAĞINDA YER ALAN GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN DİKKAT EKSİKLİĞİ VE  
HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU RİSKİ ÜZERİNE OLASI  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Ümit KARAKAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE TTB  
(ÜK) 2011-3 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir

Tez No: 234

MERSİN – 2012

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "MikroRNA (miRNA) Oluşum Yolağında Yer Alan Gen Polimorfizmlerinin Dikkat Eksikliği Ve Hiperaktivite Bozukluğu Riski Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.12.2012

  
Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL  
Mersin Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY  
Mersin Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Rukiye Nalan TİFTİK  
Mersin Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 25/12/2012 tarih ve 2012/394 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

## TEŞEKKÜR

Gerek akademik eğitim hayatımda gerekse meslek hayatım süresince, tüm bilgi birikimi ile ihtiyaç duyduğum her an bana destek olan, sürekli olarak bana anlayışla yol gösteren, tezimin hazırlanma sürecinde ve öncesinde göstermiş olduğu titizlik, önem ve bilimsel katkıları için danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY' a; tez çalışmalarım sırasında hem deneysel hem de teorik anlamda vermiş olduğu her bilgiden ve yaptığım hatalar karşısında göstermiş olduğu anlayış ile bana bilimsel özgüven aşılamış olmasından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Emin ERDAL' a; hasta ve kontrol gruplarını temin etmemdeki rolleri, destekleri ve çalışmalarını için Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Hasan HERKEN' e ve Dr. Ayşe Nur İNCİ KENAR' a, ayrıca akademik eğitimime katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın değerli hocalarına, deney sonuçlarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve katkılarını sunan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Mehmet Ali SUNGUR' a; deneysel aşamalarda sürekli beni destekleyen ve yardımlarını eksik etmeyen özellikle Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ' a, Koray UYSAL' a, Arş. Gör. Kenan ÇEVİK' e ve birbirinden değerli tüm ekip arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Eğitimim ve geleceğim için gece gündüz çalışan babama, saçını süpürge eden anneme ve neşesiyle bana güç veren kardeşim Cemil'e her şey için teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL ve ONAY</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB).....	<b>3</b>
2.1.1. Tarihçe.....	<b>4</b>
2.1.2. Epidemiyoloji.....	<b>5</b>
2.1.3. Tanı.....	<b>6</b>
2.1.3.1. Düzensizlikler için Diagnostik ve İstatiksel Manuel IV (DSM-IV; The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)’e göre dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tanı ölçütleri:.....	<b>7</b>
2.1.4. Etiyoloji.....	<b>11</b>
2.1.5. Çevresel Etmenler.....	<b>12</b>
2.1.6. Genetik Temel.....	<b>13</b>
2.2. mikroRNA (miRNA).....	<b>16</b>
2.2.1. mikro RNA (miRNA) Oluşum Basamakları.....	<b>17</b>
2.2.2. miRNA-SNP İlişkileri.....	<b>21</b>
2.2.3. miRNA’ların nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkisi.....	<b>22</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>27</b>
3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler ve Kimyasallar.....	<b>27</b>
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları.....	<b>27</b>
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	<b>27</b>

3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	28
3.1.3.1. Nüklei Lizis Tampon Çözeltisi .....	28
3.1.3.2. %10 SDS .....	28
3.1.3.3. TE Tampon Çözeltisi .....	28
3.1.3.4. 10 M Amonyum Asetat (C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ) Tampon Çözelti .....	28
3.1.3.5. Proteinaz K için Tampon Çözeltisi .....	28
3.2. Vaka-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması	29
3.2.1. Vaka Grubunun Seçimi .....	29
3.2.2. Kontrol Grubunun Seçimi .....	30
3.3. Tuz ile Çöktürme Yöntemi Kullanılarak Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....	30
3.4. Vaka-Kontrol Gruplarının Polimorfizmler İçin Genotip Tayini .....	32
3.4.1. Genotipleme Yapılacak SNP'lerin Seçilmesi .....	32
3.5. Real Time PCR Genotipleme Deneyi İçin Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi .....	34
3.6. Real Time PCR Yöntemiyle Genotipleme Çalışması .....	43
3.7. Genotipleme Deneyleri Sonrasında Genotiplerin Belirlenmesi .....	46
3.8. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi .....	48
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1. Vaka - Kontrol Grubuna Ait Yaş, Cinsiyet, Genotip Dağılımları ve Allel Frekansları .....	49
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>56</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>62</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>71</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tarihi .....	5
<b>Şekil 2.2.</b> Yetişkin erkek ve kadınlarda; DEHB tanısı sırasında, belirgin ortak özelliklerin görülme sıklığının yaklaşık yüzdeleri .....	6
<b>Şekil 2.3.</b> DEHB'in klinik algoritması .....	9
<b>Şekil 2.4.</b> 8-16 yaşlardaki kompozit 3-D görüntüleme verileri: Renkli bölgeler DEHB'li hastalarla sağlıklı kontroller arasındaki korteks kalınlığının farkını ifade etmektedir. Parlaklığın fazla olması farkın da fazla olduğunu belirtir .....	12
<b>Şekil 2.5.</b> Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun kalıtsallığı .....	14
<b>Şekil 2.6.</b> miRNA oluşum yolağının şematik gösterimi .....	18
<b>Şekil 2.7.</b> Mikroişlemci kompleksin pri-miRNA ile kurduğu bağın çizimsel gösterimi. DROSHA yeşil renk ile DGCR 8 ise mavi renk ile gösterilmiştir. Siyah oklar ayrılma bölgelerini işaret etmektedir .....	19
<b>Şekil 2.8.</b> miRNA'lar kendi çekirdek sekansları ile mRNA'ya bağlanırlar (sarı ile vurgulanmıştır). Argonaute proteine bağlı bir miRNA yapısı bu konumda baz eşleştirmeyi önlese bile tipik olarak miRNA bağlanma bölgesi miRNA'nın ilk nukleotidinin karşısına yerleşir, ilk nukleotidin karşısında bir adenozin (altı çizgili) bulunur .....	20
<b>Şekil 2.9.</b> SNP'lerin miRNA sürecindeki rolü .....	22
<b>Şekil 2.10.</b> Nöronal hücrelerin gelişiminde, farklılaşmasında ve diğer basamaklarında miRNA'ların rolü .....	23
<b>Şekil 2.11.</b> Yetişkin insan beyinde miRNA'ların ifadesi. (A) İnsan miRNA çipleri kullanılarak, insan beyin neokorteks duvarında hibridizasyonla tespit edilmiş farklı miRNA çeşitlerinin ifadelerinin göreceli seviyeleri. 1000den fazla ifade edilenler yüksek ifadeli miRNA'lar, 1000'den az-100den fazla ifade edilenler nadir ya da az ifade edilen miRNA'lar olarak gösterilmiştir. (B) miRNA'lar genellikle beyinde ifade edilir. Diğer dokularla karşılaştırıldığında beyindeki miRNA seviyesinin zenginliğinin göreceli gösterimi .....	25

<b>Şekil 2.12.</b> Bazı nöropsikiyatrik hastalıkların gelişiminde miRNA ve miRNA bileşenlerinin potansiyel rolü .....	26
<b>Şekil 3.1.</b> Tez çalışmasında araştırılacak miRNA oluşum yolağındaki genler ve rs numaraları .....	34
<b>Şekil 3.2.</b> <i>RNASEN</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs10719'nin (C>T; G>A) olduğu bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	35
<b>Şekil 3.3.</b> <i>DGCR8</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs1640299'nin (G>T) yer aldığı bölgenin dizisi. ....	35
<b>Şekil 3.4.</b> <i>XPO5</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs11077'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	35
<b>Şekil 3.5.</b> <i>RAN</i> 'a ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs14035'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi. ....	36
<b>Şekil 3.6.</b> <i>DICER1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs3742330'nin (A>G) yer aldığı bölgenin dizisi.....	36
<b>Şekil 3.7.</b> <i>DICER1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs13078'nin (A>T) yer aldığı bölgenin dizisi.....	36
<b>Şekil 3.8.</b> <i>TARBP2</i> 'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs784567'nin (C>T) yer aldığı bölgenin dizisi.....	37
<b>Şekil 3.9.</b> <i>AGO1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs595961'nin (A>G) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	37
<b>Şekil 3.10.</b> <i>AGO2</i> 'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs4961280'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi. ....	37
<b>Şekil 3.11.</b> <i>GEMIN3</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs197388'nin (A>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	38
<b>Şekil 3.12.</b> <i>GEMIN4</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs910924'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi. ....	38
<b>Şekil 3.12.</b> AGO1 genine ait bir Real Time çalışma şartları örneği.....	45
<b>Şekil 3.13.</b> <i>RAN</i> rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde heterozigot GA genotipi .....	46



<b>Şekil 3.14.</b> <i>RAN</i> rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot GG genotipi .....	47
<b>Şekil 3.15.</b> <i>RAN</i> rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot AA genotipi .....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Çizelge 3.1.</b> Tez çalışmasında araştırılacak miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri .....	33
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>RNASEN</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs10719 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri .....	39
<b>Çizelge 3.3.</b> <i>DGCR8</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs1640299 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	39
<b>Çizelge 3.4.</b> <i>XPO5</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs11077 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	40
<b>Çizelge 3.5.</b> <i>RAN</i> 'a ait 3'-UTR`de yer alan rs14035 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	40
<b>Çizelge 3.6.</b> <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs3742330 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	40
<b>Çizelge 3.7.</b> <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs3742330 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	41
<b>Çizelge 3.8.</b> <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs13078 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	41
<b>Çizelge 3.9.</b> <i>AGO1</i> 'e ait intron 10`da yer alan rs595961 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	41
<b>Çizelge 3.10.</b> <i>AGO2</i> 'ye ait promotor bölgesinde yer alan rs4961280 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	42
<b>Çizelge 3.11.</b> <i>GEMIN3</i> 'e ait promotor bölgesinde yer alan rs197388 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	42
<b>Çizelge 3.12.</b> <i>GEMIN4</i> 'e ait promotor bölgesinde yer alan rs910924 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri. ....	42
<b>Çizelge 3.13.</b> Çalışılan genlere ait Real Time PCR çalışma şartları. ....	44
<b>Çizelge 3.14.</b> Çalışılan genlere ait Real Time PCR karışım hacimleri (* FAM ** Yakıma Yellow). ....	45

<b>Çizelge 4.1.</b> Vaka-Kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları .....	49
<b>Çizelge 4.2.</b> Vaka-Kontrol gruplarının yaş dağılımları .....	50
<b>Çizelge 4.3.</b> Vaka-Kontrol gruplarının genotip dağılımları .....	51
<b>Çizelge 4.4.</b> Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarının grafiksel gösterimi.....	52
<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol gruplarının allel frekans dağılımları.....	54
<b>Çizelge 4.6.</b> Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarının yüzdesi.....	54
<b>Çizelge 4.7.</b> Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarının grafiksel gösterimi.....	55

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>A</b>	:Adenin bazı
<b>AGO</b>	:Argonaute proteini
<b>ARE</b>	:AU-Ağırlıklı Element (AU-Rich element)
<b>BHQ</b>	:Black Hole Quencher™
<b>C</b>	:Sitozin bazı
<b>°C</b>	:Santigrat derece
<b>C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub></b>	:Amonyum Asetat
<b>COMT</b>	:Katekol-O-metil Transferaz
<b>DAT</b>	:Dopamin taşıyıcısı
<b>dbSNP</b>	:SNP Bilgi Bankası
<b>DEHB</b>	:Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
<b>DGCR8</b>	:DiGeorge Sendromu Kritik Bölgesi 8
<b>DICER1</b>	:Dcr1 Homoloğu
<b>Dk</b>	:Dakika
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik Asit
<b>DRD 4</b>	:Dopamin Reseptör Geni 4
<b>DRD 5</b>	:Dopamin Reseptör Geni 5
<b>DSM</b>	:Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel Elkitabı
<b>DβH</b>	:Dopamin beta hidroksilaz
<b>EDTA</b>	:Etilendiamintetraasetik asit
<b>FAM</b>	:6-carboxyfluorescein
<b>G</b>	:Guanin bazı
<b>GEMIN 3</b>	:Gem “çekirdek organeli” ilişkili Protein 3
<b>GEMIN 4</b>	:Gem “çekirdek organeli” ilişkili Protein 4
<b>gr</b>	:Gram
<b>GWAs</b>	:Genom Boyu İlişki Çalışmaları

<b>HTR1B</b>	:5- hidroksitriptamin “serotonin” reseptörü 1B
<b>let-7</b>	:lethal-7
<b>lin-4</b>	:lineage deficient-4
<b>M</b>	: Molarite
<b>MAF</b>	: Minör Allel Frekansı
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>miRNA</b>	: mikroRNA
<b>miR SNP</b>	: miRNA hedefinde tek bir nükleotid polimorfizmi
<b>N</b>	: Birey sayısı
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	: Sodyum Etilendiamintetraasetik Asit
<b>NCBI</b>	: Amerika Birlesik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>ncRNA</b>	: Kodlanmayan Ribonükleik Asit
<b>Ng</b>	: nanogram
<b>OR</b>	: Odds Ratio
<b>ORF</b>	: Açık Okuma Alanı (Open Reading Frame)
<b>PACT</b>	: Protein Kinaz Aktivatör Protein
<b>PAZ</b>	: Piwi/Argonaute/Zwille
<b>pdC</b>	: C-5 propinil-deoksiribo Sitozin
<b>pH</b>	: Hidrojenin Gücü
<b>PIWI</b>	: P-element induced wimpy testis
<b>pre-miRNA</b>	: Öncül miRNA
<b>pri-miRNA</b>	: Primer miRNA
<b>Real Time PCR</b>	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RISC</b>	: RNA ile uyarılmış sessizleştirme kompleksi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROX</b>	: 6-Karboksi-X-Rhodamin

<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SLC6A3</b>	: Dopamin taşıyıcı gen 1
<b>SNAP-25</b>	: Sinaptozom ilişkili protein-25 kDa
<b>SNP</b>	: Tek bir nükleotid polimorfizmi
<b>ss</b>	: Standart Sapma
<b>T</b>	: Timin bazı
<b>TARBP (TRBP)</b>	: Trans-Aktivasyon Yanıt Elemanı RNA Bağlayıcı Protein
<b>TE</b>	: Tris-EDTA
<b>Tm</b>	: Erime Sıcaklığı
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktörü-alpha
<b>Tris-HCl</b>	: Tris-Hidroklorit
<b>WUDÖ</b>	: Wender-Utah Değerlendirme Ölçeği
<b>XPO-5</b>	: Exportin-5
<b>3'UTR</b>	: Translasyonu Yapılmayan 3' Bölge (3'-Untranslated Region)
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre

## ÖZET

### MikroRNA (miRNA) Oluşum Yolağında Yer Alan Gen Polimorfizmlerinin Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu Riski Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması

Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB); yaygınlığı ve yaşam kalitesine etkisi açısından, önemli bir psikiyatrik bozukluktur. Çocukluk çağının en sık görülen nörodavranışsal bozukluklarından biridir ve hastalık erişkinlik döneminde de devam edebilmektedir. DEHB etiyolojisinde; özellikle çevresel ve genetik faktörler önemlidir. Hastalığın mendeliyen kalıtım göstermemesi ve multifaktöriyel olarak kalıtılması, hastalığın genetik mekanizmasının tam olarak anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hastalığın etiyolojisinin farklı açılardan çalışılması gerekliliğine ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA'lar, kodlanmayan RNA'lar arasında yer almaktadır ve ökaryot gen ifadesinin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. miRNA ana sekansında ya da miRNA hedefinde tek nükleotid polimorfizm (SNP) miR SNP olarak isimlendirilir. miR SNP'nin kodlanan protein seviyesinin ekspresyon düzeyini değiştirerek, çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olabildiği bildirilmektedir. Çalışmamızda, miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin polimorfizmleri ile DEHB arasında bir ilişkinin olup olmadığı hipotezi, Real-Time PCR ile genotipleme yapılarak araştırıldı. Çalışmaya, kontrol grubundan 164, vaka grubundan ise 191 birey dahil edildi. Kontrol grubunda yaş ortalaması 27,23 ±9,01, vaka grubunda 27,84 ±9,19'dur. Genotip ve allel dağılımları değerlendirmeleri sonucunda *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* (her iki SNP), *TARBP2*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* genlerindeki polimorfizmlerle DEHB arasında ilişki gözlenmedi. *AGO1* rs595961'de hem allel hem de genotip dağılımlarında, *DGCR8* rs1640299'de ise sadece allel dağılımında anlamlılık gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Bu araştırma, şu ana kadar miR SNP'lerin DEHB ile olan olası ilişkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Başka bir merkez tarafından daha geniş çaplı bir çalışmada, bulguların tekrarlanması sonuçların doğrulanması açısından önemlidir. Verilerimiz miRNA'nın DEHB etiyolojisindeki rolünün ortaya çıkartılması amacıyla yapılacak araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** DEHB, miRNA, miR SNP, AGO1, DGCR8

## ABSTRACT

### Investigation of The Gene Polymorphism's Possible Effect on The Risk of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder Located in the microRNA(miRNA) Formation Pathway

Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) is a major psychiatric disorder in terms of prevalence and life quality. It is one of the most common neurobehavioral disorders of childhood, and the disease may carry on adulthood. In the etiology of ADHD, environmental and genetic factors are seriously important. Disease is not inherited as a Mendelian and show multifactorial inheritance so completely understanding of the genetic mechanism of the disease is difficulty. Therefore, studying different aspects of the etiology of this disease are needed. miRNAs that are noncoding RNAs thought to play a role of translational regulation of eukaryotic gene expression. The main miRNA sequence or on target miRNA; single nucleotide polymorphism (SNP) called miR SNP. miR SNP's alter the level of expression of the encoded protein level may cause a variety of diseases have been reported. In this study, the hypothesis of the relationship between genes polymorphism's located in the microRNA(miRNA) formation pathway and ADHD was investigated by performing genotype with Real-Time PCR. The study included 164 individual from control group, and 191 from case group. The mean age of the control group is  $27.23 \pm 9.01$ , and the case group is  $27.84 \pm 9.19$ . According to the results of genotype and allele distributions; no relationship observed between ADHD and the polymorphism in genes RNASEN, XPO5, RAN, DICER1 (both SNP), TARBP2, AGO2, GEMIN3 and GEMIN4. The genotype and allele distribution of rs595961 AGO1, and only the allele distribution of DGCR8 rs1640299 was found to be significance ( $p < 0.05$ ). This study is the first study evaluating the possible relationship between miR SNPs with ADHD until now. A large scale study from other center is important in order to repeat verification of results. Our data will be enlight for research of the miRNA's role of the etiology of ADHD.

**Keywords:** ADHD, miRNA, miR SNP, AGO1, DGCR8



# 1. GİRİŞ

Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB); yaygınlığı ve yaşam kalitesine etkisi açısından, yüksek genetik geçiş gösteren önemli bir psikiyatrik bozukluktur (1). Çocukluk çağının en sık görülen nörodavranışsal bozukluklarından biridir (2). DEHB sendromunun adı ve kliniği sıkça değişmektedir. DEHB zaman içerisinde “minimal beyin hasarı”, “minimal beyin fonksiyon bozukluğu”, “minimal serebral fonksiyon bozukluğu”, “hiperkinezis” ve “hiperaktif çocuk sendromu” olarak çeşitli şekillerde ifade edilmiştir (3).

Farklı populasyonlarda DEHB görülme sıklığı dikkate değer bir öneme sahiptir. Birçok çalışma gösteriyor ki; DEHB'nin dünya genelinde çocukluk çağında görülme oranı 18 yaş altındaki erkek çocuklar için %6 ile %16 iken; kız çocuklar için bu oran %2 ile %9 arasındadır. Ülkemizde ise DEHB yaygınlığı toplum örnekleminde %8.1 ile %8.6; klinik örnekleminde ise %8.6 ile % 29.4 arasında bildirilmiştir. Çocuklukta DEHB tanısı alan bireylerin %5-8'inde hastalık ergenlik ve yetişkinlikte süreklilik gösterebilmektedir (1, 3-5).

DEHB etiyojisinde çok sayıda gen çalışılmış ve bu genlerin geçişinin mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır (6, 7). Genetik etkenlerin yanı sıra, çevresel şartların da DEHB oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Çevresel etkenler için en tutarlı bulgular; anne karnında sigaraya maruz kalma ve düşük doğum ağırlığı/gestasyonel yaş için elde edilmiştir (8). Çevresel risk faktörlerine maruz kalma, bireysel direnç ve yatkınlık gibi özelliklerden de etkilenebilir. Dolayısıyla, risk etkenlerine maruz kalan bütün bireyler DEHB geliştirmeyebileceği gibi, duyarlı gen varyasyonlarını taşıyan bireyler çevresel risk faktörleriyle karşılaşmadığında DEHB ortaya çıkmayabilir.

DEHB etiyojisinin mendeliyen kalıtımla açıklanamamış olması ve hastalığın ortaya çıkmasındaki mekanizmanın henüz aydınlatılamamış olması araştırmacıları alternatif arayışlara yönlendirmektedir.

miRNA'lar kodlanmayan RNA'lar arasında yer almaktadır. miRNA'ların ökaryot gen ifadesinin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Günümüzde binin üzerinde sayıda miRNA belirlenmiştir. miRNA'ların polimorfizmlerini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesi olan Wen-Hsiung Li ve ark.

yaptığı çalışmada 173 insan pre-miRNA'nın dizi analizi yapılmış ve 10 adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmuştur (7). miRNA ana sekansında ya da miRNA hedefinde bir SNP oluşması, miR SNP olarak isimlendirilir. miR SNP, miRNA kompleksinin bağlanmasını etkileyebilir. Bu değişim kodlanan protein seviyesinin ekspresyon seviyesini değiştirerek sonuçta çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olan fenotip değişmelerine yol açabilir (7,9).

SNP çalışmaları ile genetik olarak düzensizlik riski taşıyan bireyleri belirleyebiliriz. miRNA'daki ve miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri, olgun miRNA oluşumunu etkileyebilir ve bu yolla miRNA ekspresyonu da etkilenmiş olabilir. miRNA ile ilişkili polimorfizmler, birçok mRNA'yı ve bunların hedefindeki birçok genin ekspresyonunu etkileyebilir ve böylece protein düzeylerinde bir değişim gözlenebilir. miR SNP'lerin neden olduğu pek çok hastalık birçok yayında ifade edilmiştir. Bunlara Sethubay ve ark.'nın kardiyovasküler hastalıklar, Tan ve ark.'nın otoimmün hastalıklar, Jensen ve ark.'nın nöropsikiyatrik hastalıklar üzerine olan etkilerininin gösterildiği çalışmaları örnek olarak gösterebiliriz (7, 9-11).

Bu çalışma; miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin polimorfizmleri ile DEHB arasında bir ilişkinin olup olmadığı hipotezi ile oluşturulmuştur. Elde edilecek verilerin; DEHB'de miRNA varyasyonlarını tanımlamada ve düzensizliğin etiyolojisini açıklamada, yol gösterici olacağını düşünmekteyiz. miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri ile DEHB arasında muhtemel bir ilişkinin çalışılması; literatürde multifaktöriyel olarak tanımlanan bu hastalığın, genetik yatkınlığının belirlenmesi ve tanı konulması açısından önemli olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB)

Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB); yaygın gözlenen, genellikle çocukluk çağında başlayan, dürtüsellik ve hiperaktivitenin arttığı gelişimsel, uygunsuz dikkatsizlik ile karakterize nöropsikiyatrik bir bozukluktur. Klinik açıdan heterojen olup, yüksek olasılıkla kalıtılan bir hastalıktır (5,12).

İlk kez Still George'nin "moral kontrol kusuru" olarak tanımladığı bu bozukluğun, bir fonksiyonu olarak; çevre ile ilişkili bilişsel kusur, ahlaki bilinç kusuru ve engelleyici irade kusuru olmak üzere üç farklı kusurun ortaya çıkabileceği sonucuna varılmıştır (13). DEHB'nin temel özellikleri olan; hiperaktif davranışlar, dürtüsellik ve dikkatin toplanmasındaki yetersizlik, bir çocuğun akademik, sosyal ve ev ortamlarındaki gelişme yeteneğini büyük ölçüde kesintiye uğratabilmektedir. Çocuk ve ergen bireyler için Birleşik Devletler'de yapılan çalışmalarda; DEHB prevalansını, Barkley & Biederman %3 ile %11 arasında, Mash & Barkley %4.2 ile %6.3 arasında, Rohde ise %5.29 olarak belirtmiştir (14). Çocuklukta DEHB tanısı alan bireylerin, %5-8'inde hastalık ergenlik ve yetişkinlikte süreklilik gösterebilmektedir (13, 14).

Benzer bulgular yetişkin DEHB çalışmalarında görülmüştür. Borland ve Heckman, DEHB olan erişkinlerde; antisosyal kişilik, anksiyete, depresyon ve madde kullanım bozuklukları arasındaki ilişkide yüksek oran bildirmiştir. Morrison ve ark.; ayakta tedavi gören DEHB hastalarının, psikiyatrik kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, antisosyal kişilik bozukluğu oranlarının, daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (15).

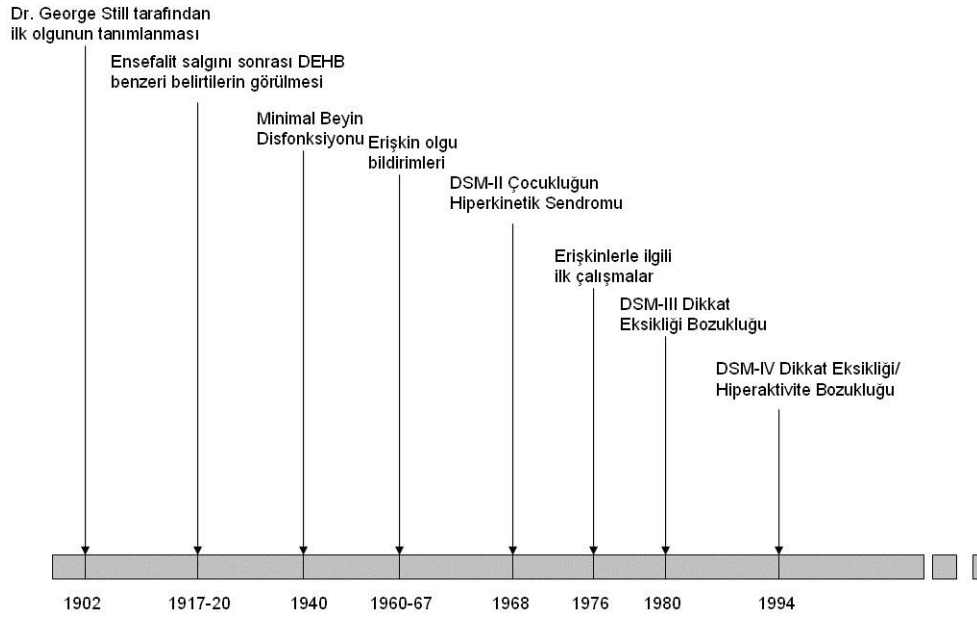
DEHB yaygınlığı ve yaşam kalitesine etkisi açısından yüksek genetik geçiş gösteren önemli bir psikiyatrik bozukluktur. DEHB'nin çocuklar üzerinde olduğu kadar anne-baba ve sosyal çevre üzerinde de etkileri vardır. DEHB tanılı çocuğa sahip ailelerin; çocuklarına bakım verebilme sorumluluklarının arttığı, annelik/babalık doyumunun ve güven duygularının azaldığı, seçim yapabilme olanaklarının azaldığı, annelik/babalık stresi ve boşanma oranının arttığı bildirilmektedir (16).

### 2.1.1. Tarihçe

DEHB ilk kez, 1846 yılında Dr. Heinrich Hoffmann tarafından hiperaktif olan oğlu, Carl Philip için yazdığı “*Struwwelpeter*” adlı çocuk kitabında tanımlanmıştır. Ancak; bilimsel anlamda, çocuklarda davranışsal durum bozukluğu üzerine ilk ciddi klinik araştırmacılar, Still George ve Alfred Tredgold olarak kabul edilmektedir (17).

Still'in 1902 yılında moral kontroldeki sorunlar “*defects in moral control*” olarak bahsettiği ve literatürde DEHB olarak tanımlanan bu hastalığın adı ve tanı koyma ölçütleri günümüze gelene dek birçok değişime uğramıştır. DEHB'nin etiyopatogenezinde çevresel faktörler etkili olmakla birlikte, büyük oranda genetik faktörler de rol oynamaktadır. Birinci Dünya savaşı sonrasında, ortaya çıkan letarjik ensefalit epidemisi sırasında, ensefalit geçirmiş olan çocuklarda hastalıktan sonra gelişen ve Still'in tanımladığına benzeyen davranış bozukluklarının gözlenmesi, hastalığın ortaya çıkışında beyin hasarlarının etkili olabileceğini düşündürmüştür. Benzer şekilde, 1934'te Khan ve Cohen beyin sapında oluşan bir hasara bağlı olarak hastalığın geliştiğini ve bu yüzden de “organik” kökenli olabileceği görüşünü öne sürmüşlerdir. 1937'de Bradley tarafından “en düşük beyin hasarı”, 1960'ta Clements ve Peter tarafından “en düşük beyin işlev bozukluğu” adlarını alırken, 1968'de yayınlanan DSM-II (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel Elkitabı*)’de ise “hiperkinezi” ya da “hiperaktif çocuk sendromu” şeklinde isimler almıştır. DSM-IV (1994)’e göre ise “Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğu olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.1) (3, 13, 18).

Erişkinler açısından DEHB ile ilgili ilk olgu bildirimleri 1960'lara kadar dayansa da, ilk düzenli çalışma 1976'da Wood ve Reimherr'in önderliğindeki bir grup tarafından başlatılmıştır. Sonraki yıllarda erişkin dönemde DEHB konusundaki araştırmalar günümüze kadar artarak devam etmektedir (19).

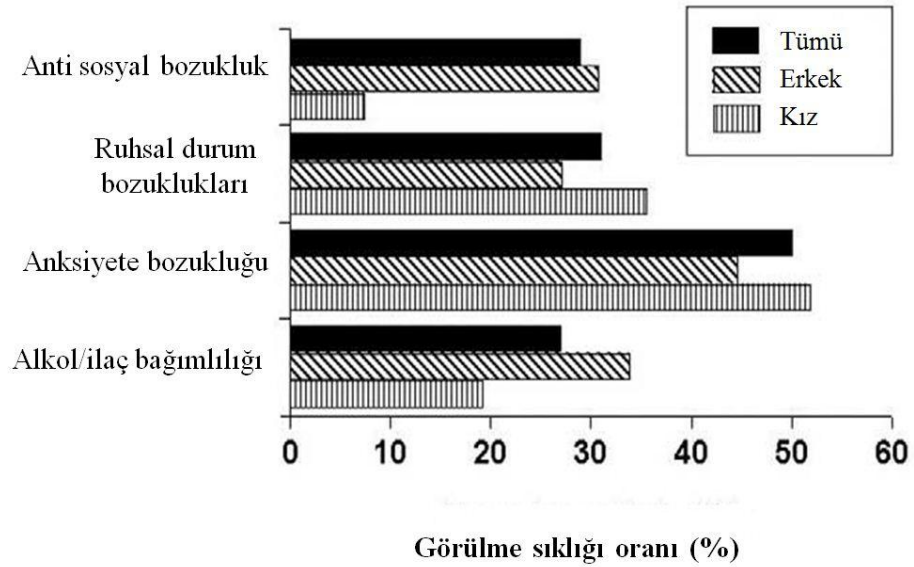


Şekil 2.1. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tarihi (19)

### 2.1.2. Epidemiyoloji

DEHB, ilk hastalık belirtileri çocukluk çağında görülen, oldukça yaygın ve kalıtılabilen bir hastalıktır. Çocuk ve ergenlerde gözlenen DEHB prevalansının dünya genelinde %5.3 olduğu tahmin edilmektedir. DEHB görülme sıklığı; yaşla ters orantılı olmakla birlikte, bu çocukların %40-70 kadarında ergenlikte ve %50 kadarında da yetişkinlikte devamlılık gösterebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; %5 olarak tahmin edilen görülme sıklığının, okul çağı çocuklarda %7-8'e ve yetişkinlerde ise %4-5'e yükseldiği belirtilmektedir (20-22).

Görülme sıklığı; yaş, cinsiyet, kronik sağlık problemleri, ailesel düzensizlikler, düşük sosyo-ekonomik düzey gibi sebeplerden dolayı açık değişkenlik göstermektedir. DEHB görülme sıklığı, cinsiyet bakımından farklılık gösterip, yetişkin erkeklerde %4.1 iken, kadınlarda %2.7'dir. Yetişkin erkek ve kadınlarda; DEHB tanısı sırasında, belirgin ortak özellikler gösteren bulgular Şekil 2.2' de gösterilmiştir (20, 22, 23).



**Şekil 2.2.** Yetişkin erkek ve kadınlarda; DEHB tanısı sırasında, belirgin ortak özelliklerin görülme sıklığının yaklaşık yüzdeleri (23).

Aslında DEHB'nin değişik etnik gruplara ait popülasyonlarda görülme sıklığı yüksektir. Örneğin; Birleşik Devletler'de %2,5- 4, İngiltere'de %1,7, İspanya' %8, Yeni Zelanda'da %6,7'dir. Ülkemizde ise, DEHB yaygınlığı toplum örnekleminde %8,1 ile %8,6; klinik örnekleme ise %8,6 ile % 29,4 arasında bildirilmiştir. Bu bağlamda yapılan ikiz çalışmaları; klinik farklılıklar (heterojenite) göstermiş olmakla beraber, ailelerdeki bağlantı analizleri de, klinik farklılık göstermiş ve bu genetik farklılıklar genetik alt tip çeşitliliklerinde büyük ya da küçük etkilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (1, 8, 20).

### 2.1.3. Tanı

Çocukluk çağı DEHB için 1960'lı yıllardan itibaren birçok bilimsel sınıflandırma ölçütleri kullanılmıştır. Bunlardan dönemlerine göre en çok kabul görenleri; "Hastalıkların ve ilişkili durumların uluslararası sınıflandırılması (*International Classification of Diseases-ICD*) 9, 10; düzensizlikler için diagnostik ve istatistiksel el kitabı (*The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders –DSM*) II, IIR, III ve DSM IV'tür. Günümüzde kabul edilen ölçütler Amerikan Psikiyatri Birliği'nin 1994 yılında yayınladığı DSM-IV ölçütleridir (13, 24).

DSM-IV ölçütlerine göre, DEHB'nin 3 temel alt tipi bulunmaktadır. Bunlar;

I. Genelde hiperaktif-dürtüsellik: Aşırı hareketli ve huzursuz bir çocuk, her zaman "hareket halinde" görünür, zorla bekler ve oturamaz, olgunlaşmamış bir şekilde davranır, fiziksel sınırlar koyulamaz ve yıkıcı davranışlar sergileyebilirler.

II. Genelde dikkatsiz: unutkan, kolayca dikkati dağılan, açıkça hayal kuran ve görevlerini zorlukla tamamlayabilen bir çocuk.

III. Karışık tip (25).

### **2.1.3.1. Düzensizlikler için Diagnostik ve İstatiksel Manuel IV (DSM-IV; The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)'e göre dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tanı ölçütleri:**

Şekil 2. 3'te DEHB'nin klinik algoritması verilmiştir. Buna göre;

A. Aşağıdakilerden (I) ya da (II) vardır:

**(I):** Aşağıdaki dikkatsizlik semptomlarından altısı ya da daha fazlası, en az 6 ay süre ile, uyumsuzluk doğurucu ve gelişim düzeyine göre aykırı bir derecede devam eder:

#### **Dikkatsizlik:**

- Çoğu zaman dikkatini ayrıntılara veremez ya da okul ödevlerinde, işlerinde ya da diğer etkinliklerde dikkatsizce hatalar yapar.
- Çoğu zaman üzerine aldığı görevlerde ya da oynadığı etkinliklerde dikkati dağılır.
- Çoğu zaman kendisi ile konuşulduğunda tam olarak dinlemiyor görünür.
- Çoğu zaman yönergeleri izlemez ve okul ödevlerini, ufak tefek işleri ya da işyerindeki görevlerini tamamlayamaz.
- Çoğu zaman etkinlik, görev planlamada ve düzenlemede zorluk çeker.
- Çoğu zaman belirli bir süre üzerinde zihinsel çaba gerektiren okul çalışması, ev ödevi gibi görevlerden hoşlanmaz, kaçınır, isteksiz davranır.
- Çoğu zaman yapmakta olduğu görev (iş) ya da etkinlik için gerekli olan malzemeyi (kalem, oyuncak, alet) kaybeder.
- Çoğu zaman dışarıdan gelen uyarılarla dikkati kolaylıkla çelinir.
- Günlük etkinliklerinde ve işinde çoğu zaman unutkanlıklar yaşar.

**(II):** Aşağıdaki hiperaktivite-dürtüsellik semptomlarından altısı ya da daha fazlası en az 6 ay süre ile, uyumsuzluk doğurucu ve gelişim düzeyine göre aykırı bir derecede devam eder:

**Hiperaktivite:**

- Çoğu zaman eli ayağı boş durmaz, oturduğu yerde kıpırdanır durur.
- Çoğu zaman oturması gerekli durumlarda, örn. derste kalkıp gezinir.
- Çoğu zaman uygunsuz bir halde gezinir, tırmanır durur (ergen ya da yetişkin ise huzursuzdur).
- Çoğu zaman oyun ya da eğlence etkinliklerini sakince sürdürmede zorlanır.
- Çoğu zaman çoğunlukla hareket halindedir ya da kurulmuş motor gibidir.
- Çoğu zaman çok konuşur.

**İmpulsivite (Dürtüsellik):**

- Çoğu zaman soru bitmeden cevaplamaya kalkar.
- Çoğu zaman sırasını beklemede zorlanır.
- Çoğu zaman başkaların rahatsız edecek şekilde çoğunlukla böler, sataşır (örn. konuşmaya ya da oyuna girer).

**B.** Bozulmaya yol açan bazı hiperaktif-dürtüsel semptomlar ya da dikkatsizlik semptomları 7 yaşından önce de vardır.

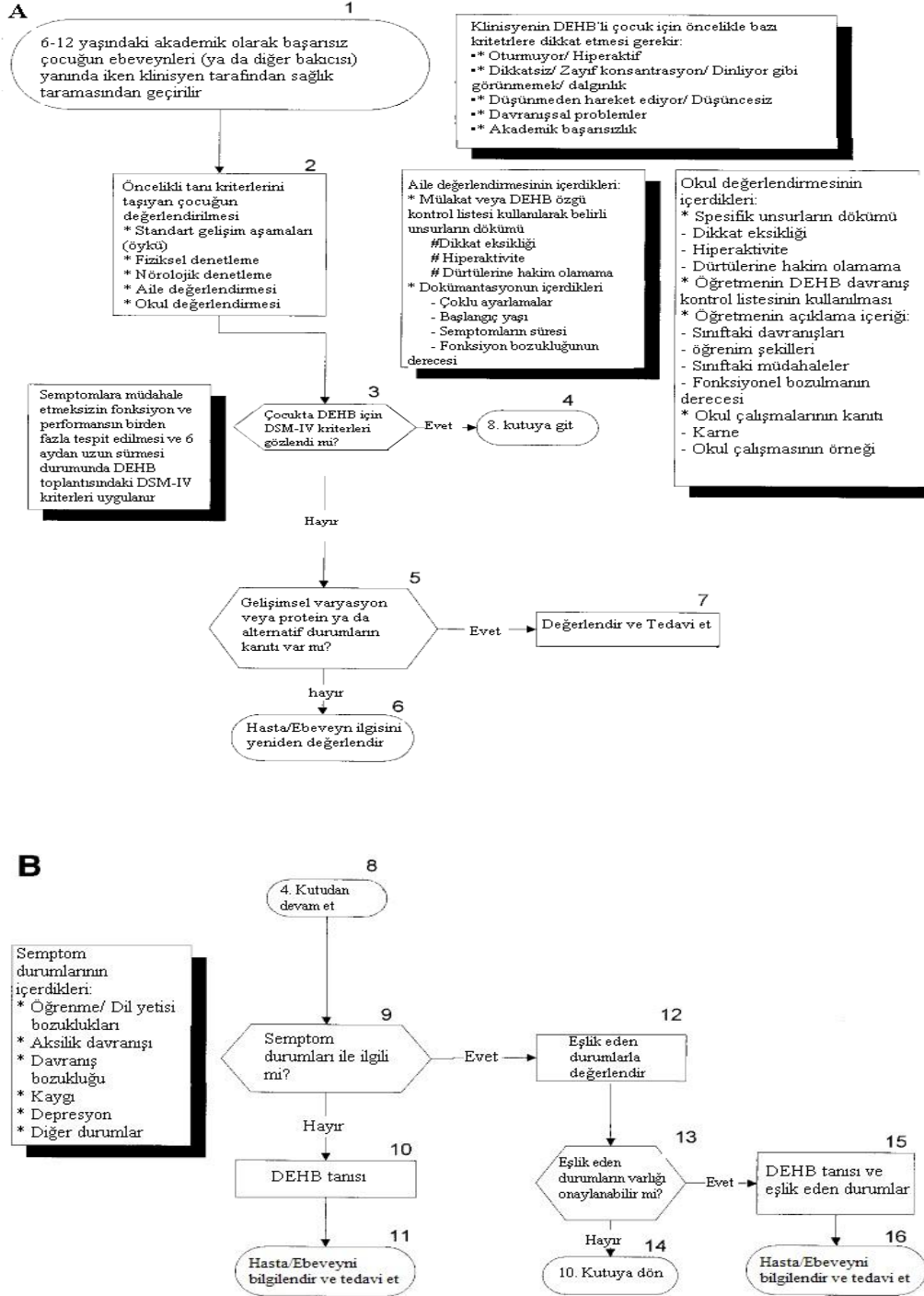
**C.** İki ya da daha fazla ortamda, semptomlardan kaynaklanan bir bozulma vardır (okulda, işte, ya da evde).

**D.** Toplumsal, okuldaki ya da mesleki işlevsellikte, klinik açıdan belirgin bir bozulma olduğunun açık kanıtları vardır.

**E.** Bu semptomlar sadece yaygın gelişimsel bir bozukluk, şizofreni ya da diğer bir psikotik bozukluğun gidişi sırasında ortaya çıkmamaktadır ve başka bir mental bozuklukla daha iyi açıklanamaz. (Örn. duygudurum bozukluğu, anksiyete bozukluğu, dissosiyatif bozukluk, kişilik bozukluğu gibi) (24).



## KLİNİK İŞLEM SÜRECİ (ALGORİTMA)



Şekil 2.3. DEHB'in klinik algoritması (2).

DEHB'nin yüksek prevalansta olması ve zararlı etkilerinin gözlenmesi nedeniyle; klinisyenler için hastalığın anlaşılması ve tanısının konulması son derece önemlidir. Bell'in 2011 yılında yayınladığı derlemeye göre, DSM-IV, DEHB için her ne kadar iyi bir tanı rehberi olsa da, yetişkinlere uygulamada boşluk ve eksiklere neden olabilmektedir. Bundan dolayı, DSM-V oluşturulması fikri ortaya atılmıştır (14).

DSM-IV' ün; erişkin dönem için yetersiz kalması sebebiyle, Wender' in "*Utah Kriterleri*" olarak bilinen ölçütleri alternatif olarak bildirilmektedir. Utah kriterlerine göre; yetişkin DEHB tanı ölçütleri, DSM ölçütlerine göre; yetişkin bireye, çocukluk çağında DEHB tanısı konmuş olmasının yanı sıra, aşağıdaki sorunlardan en az ikisini birlikte gösteriyor olması gerekmektedir.

- A. Motor hiperaktivite
- B. Dikkat eksikliği
- C. Duygudurumda değişkenlik
- D. Çabuk parlamak/kolay öfkelenme
- E. Strese tahammülsüzlük, aşırı tepkisellik
- F. Dağınıklık, planlama/organizasyon problemleri
- G. Dürtüsellik
- H. İlişkili Özellikler (3).

DEHB; tanısı klinik değerlendirmeyle konulan bir bozukluk olduğundan, kullanılan ölçütlerin yanı sıra, bu amaçla geliştirilen ölçekler de bulunmaktadır.

Erişkin DEHB Değerlendirme/Derecelendirme Ölçekleri;

- Copeland Symptom Checklist ( Copeland, 1989)
- Wender Utah Rating Scale (WURS) (Ward ve ark., 1993)
- Adult Report Scale (ARS) (Weyandt, 1995)
- Brown ADD Scale (Brown, 1996)
- Attention Deficit Scales for Adults (ADSA) ( Triolo and Murphy, 1996)
- Symptom inventory for ADHD (Barkley, 1998)
- Conners' Adult ADHD Rating Scale (CAARS) (Erhardt ve ark, 1999)
- Young ADHD Questionnaire- Self Report and -informant Report (YAO-S

ve YAO-1) (Young, 2004)

- Adult ADHD Rating Scale (Adler, 2003) (26).

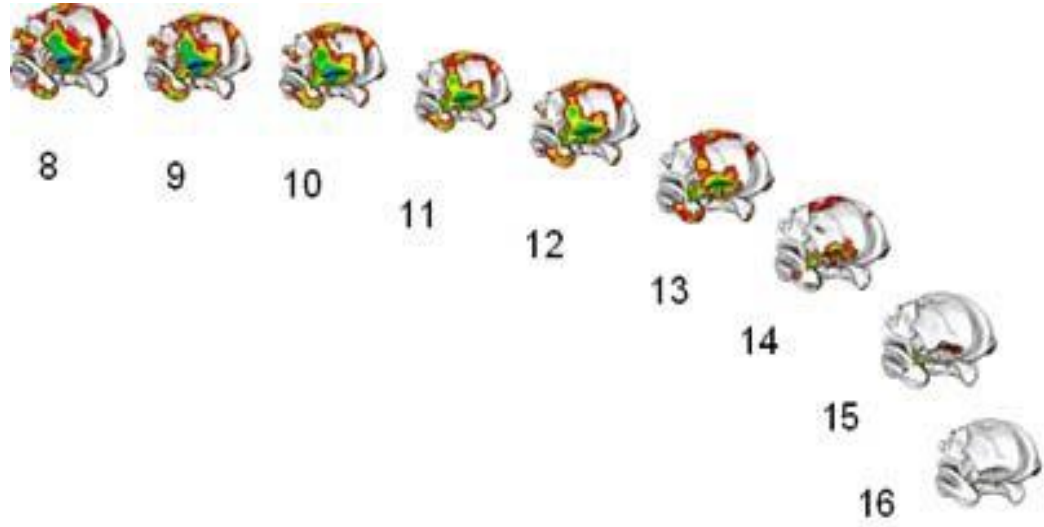
#### **2.1.4. Etiyoloji**

DEHB tek bir patofizyoloji ile ortaya çıkmayıp, çok daha karmaşık bir etiyolojiye sahiptir. Hiperaktivitenin gelişmesinde; hem genetik hem de çevresel faktörler birlikte multifaktoriyel olarak ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Birçok çalışmada, DEHB etiolojisinde genetik faktörlerin etkili olduğunu ve kalıtılabilirlik olasılığının %60-90 olduğu ileri sürülmektedir (5, 27, 28).

Son yıllarda; fonksiyonel nörogörüntüleme, genetik ve farmakolojik çalışmalar ile klasik multifaktöriyel bir bozukluk olarak kabul edilen DEHB'nin patofizyolojisi, nöradrenerjik ve dopaminerjik sistemlerin içinde frontostriatal yollarının dengesizliğinin yanı sıra, bir fonksiyon bozukluğu olduğu da öne sürülmüştür (17).

Prefrontal korteks; doğru nöro-kimyasal ortam ile dikkat, davranış ve duygu gibi gerekli işlevlerin düzenleyicisidir; ancak bu bölge DEHB hastalarında zayıf ve normal işlevinin altında çalışmaktadır. Farmakolojik çalışmalar, nörogörüntüleme çalışmaları ve hayvan modelleri DEHB'de; dopaminerjik, serotonerjik ve noradrenalin dengesizliğini öne çıkarmaktadırlar (20,17).

Son zamanlarda, birçok çalışma DEHB hastalarında yapısal beyin anomalilerin var olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Çalışmaların büyük bir kısmı, DEHB hastalarının beyin hacminde özellikle, prefrontal korteks, anterior singulat korteks, bazal ganglia ve serebellumda azalma olduğunu bildirmektedir. Çalışmalarda; DEHB'li çocuklardaki kortikal gelişimin ve beyin gelişiminin, sağlıklı kontrollere göre 3 yıl sonra olduğu görülmüştür (Şekil 2.4) (5, 15, 27).



**Şekil 2.4.** 8-16 yaşlardaki kompozit 3-D görüntüleme verileri: Renkli bölgeler DEHB’li hastalarla sağlıklı kontroller arasındaki korteks kalınlığının farkını ifade etmektedir. Parlaklığın fazla olması farkın da fazla olduğunu belirtir (29).

### 2.1.5. Çevresel Etmenler

DEHB’nin etiopatogenezinde pre-, peri- ve postnatal çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Annenin gebelik sürecindeki yaşam şekli prenatal faktörlerle ilişkilidir. Örneğin, prenatal alkol maruziyetinin, beyinde özellikle serebellumda yapısal anomalilerin ortaya çıkmasında etkili olduğu bilinmektedir. Prenatal dönemde alkole maruz kalan çocuklarda hiperaktif, dürtüsel, yıkıcı (bozucu) psikiyatrik bozuklukların ortaya çıktığı kanıtlanmıştır. Gebelikte sigara kullanımı da, DEHB riskini 2,7 kat arttırmaktadır. Sigara kullanımı, muhtemelen dopaminerjik aktiviteyi düzenleyen nikotinik reseptörleri etkilemektedir. Dopamin ise dikkat, hafızanın çalışması ve merkezi sinir sisteminde yolların geri bildiriminde rol oynamaktadır. Günümüzde dopaminerjik hatanın DEHB’nin patofizyolojisi ile ilintili olduğu görüşü kabul görmektedir (5, 27).

Perinatal faktörlerden; doğum ağırlığı çok düşük çocuklarda ve daha sonra DEHB tanısı alan çocukların annelerinde, gebelik ve doğum komplikasyonlarının görülmüş olması da, DEHB’nin iki kat artmış olarak gözlenmesine neden olduğu öne sürülmektedir (27).

Postnatal faktörlerden; yetersiz beslenme ve diyetel bozukluklar DEHB’in ortaya çıkmasında etkili olabilmektedir. Esansiyel yağ asitlerinin dengesizliği (omega 3 ve 6),

DEHB gelişme potansiyelini arttırdığı fikri öne sürülmektedir. Bazı vakalarda demir eksikliğinin görülmesi de bu durumun ortaya çıkmasında etkili olabilmektedir (27).

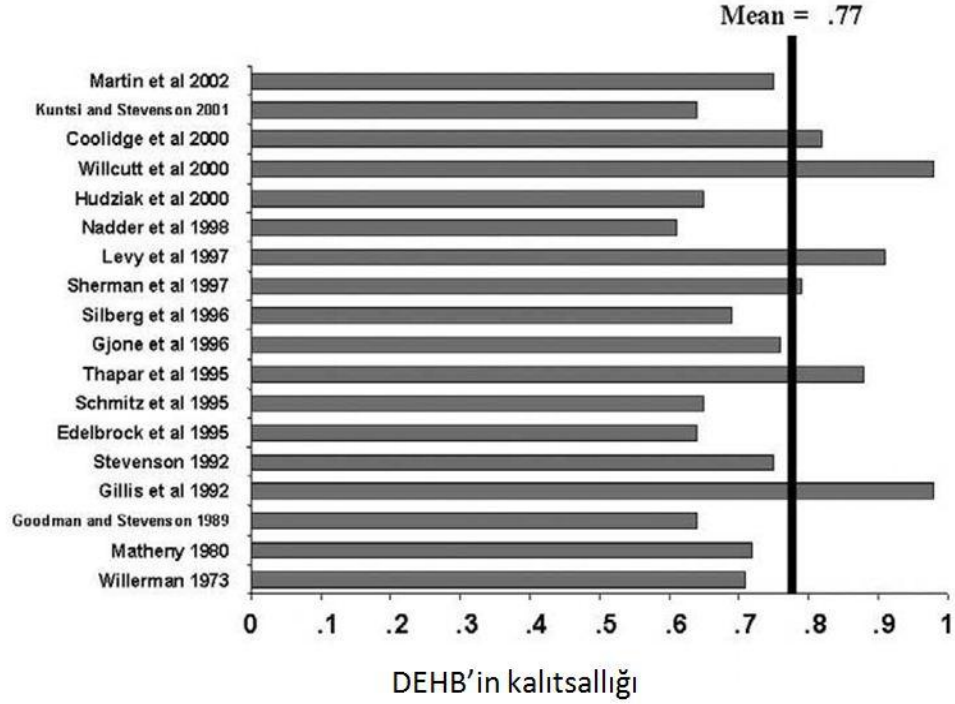
#### **2.1.6. Genetik Temel**

İnsan genom projesindeki çalışmaların başarısı; DEHB gibi karmaşık yapısı olan hastalıkların genetik nedenini araştırmada heyecan yaratmıştır. Bir dizi aile, evlat edinme ve ikiz çalışmaları; DEHB'in fenotipik ifadesindeki genetik faktörlerin belirlenmesinde önemli verilerin elde edilmesine neden olmuştur. Neredeyse tüm moleküler genetik çalışmalar; dopaminerjik ve noradrenerjik yollarla bağlantı üzerine odaklanmıştır (30).

Faraone ve Biederman'ın yaptıkları bir çalışmada, DEHB tanısı almış yetişkinlerin çocuklarındaki DEHB prevalansının %57 olduğu ifade edilmiştir. Bunu takip eden çalışmalara göre; tek bir ebeveynde DEHB tanısı olması, çocuklarında hastalığın görülme oranının %20 ile % 54 arasında gözlenmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla ebeveynlerdeki hastalığın, çocuklarda hastalanma riskini sekiz kat arttırdığı öne sürülmektedir (1, 15).

İkiz çalışmaları sonrası; genetik yatkınlığın, ortalama %77 olduğu gösterilmiştir. Bu yüksek sıklığa rağmen, Dikkat eksikliği / hiperaktivite bozukluğu uyumluluk oranları karşılaştırıldığında; dizigotik ikizlerde bu oran % 29 iken, monozigotik ikizlerde bu oranın % 81 olduğu görülmüştür (1,5).

Bu veriler ve evlat edinme çalışmalarının ışığında, hastalığın ailesel geçiş gösterdiği ve genetik yatkınlıkla ilintili olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 2.5'te bazı araştırmacıların, çalışmaları sonucunda DEHB'nin kalıtılabilirliği ile ilgili elde ettikleri veriler gösterilmiştir (1, 23).



Şekil 2.5. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun kalıtsallığı (23).

DEHB’de, nörotransmitter sistemleri düzenleyen genler sorumlu tutulmuştur. Aday gen çalışmaları; hastalığın ortaya çıkmasında, birkaç genin rol oynadığını ortaya koymuştur. Meta-analizlerle desteklenen genlerin bazılarının; DRD 4 (*Dopamin Reseptör Geni 4*), DRD 5 (*Dopamin Reseptör Geni 5*), SLC6A3 (*Dopamin taşıyıcı gen 1 = DAT1*), SNAP-25 (*Sinaptozom ilişkili protein-25 kDa*), ve HTR1B (*5- hidroksitriptamin “serotonin” reseptörü 1B*) olduğu ortaya konmuştur. DEHB için potansiyel allellerin belirlenmesi amacıyla yapılan genom tarama çalışmalarında; kromozomlardan 5p13, 6q12, 16p13, 17p11 ve 11q22-25’te lokalize genlerle bağlantılı olabileceği gösterilmiştir. Deutsch ve ark. (1990), DEHB tanılı dismorfik çocukları değerlendirdikleri araştırmalarında, dismorfik değişikliklerin otozomal dominant kalıtıldığını öne sürmüşlerdir (1). Bu araştırmada 48 aile ağacı değerlendirilmiş ve bu ailelerde tek bir dominant genin hem DEHB tanısı hem de belirgin olmayan fiziksel anomalilerin oluşumunda rol oynayabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Genetik çalışmalar, dominant genlerin yanında, resesif majör genlerin de kalıtım paterninde işlev gördüğü hipotezini öne sürmüşlerdir. Büyük, nadir kromozomal delesyon

ve duplikasyonların da DEHB'li bireylerde artış gösterdiği bildirilmiştir. Ancak klinik uygulamada, rutin genetik tanı testi olarak kullanılmamaktadır (1, 27).

Allelik çalışmalar, aile kökenli çalışmalardan yola çıkarak DEHB hastalığı ile bağlantı gösteren bölgedeki çok sayıdaki gen grubundan etiyolojik DEHB genlerinin saptanmasına olanak sağlayabilmektedir. Bu çalışmalardaki bağlantı dengesizliği olgularında, DEHB'den bağımsız vakalar ve DEHB'li vakalardaki, SNP (tek nükleotid polimorfizmi) baz çifti değişiklikleri frekansları karşılaştırılmıştır. DEHB'nin etiyolojisinin genetik olduğu düşünülmektedir ve bu kapsamda incelendiklerinde, dopaminerjik, serotonerjik, noradrenerjik yollardaki dengesizliklerden kaynaklanmakta ve dolayısıyla etiyolojik olarak, monoamin genleri de, güçlü aday genlerdir. Meta-analizler ve toplanmış verilerin analizleri DEHB ile dopamin reseptörde (DRD4 ve DRD5), dopamin taşıyıcısı (DAT), sinaptosomal ilişkili protein (SNAP 25; 25 kDa) ve serotonin taşıyıcılarının polimorfizmleri arasında ilişki olduğunu desteklemektedir (5, 20).

DEHB ve aday genler arasındaki ilişki ve bağlantı çalışmaları gözden geçirildiğinde; nörotransmitter yolları üzerinde durulması gerektiği ön plana çıkmaktadır. Nörotransmitter sistemler için aday genler temel olarak şunları içerir:

- 1) *öncül genleri*: öncül amino asitlerden üretilen nörotransmitterlerin hızını etkileyebilir (örneğin; dopamin için tirozin hidroksilaz)
- 2) *reseptör genleri*: nörotransmitter sinyallerin alınımını içerebilir (örneğin; 5 dopamin reseptörüyle ilgili genler: DRD1, D2, D3, D4, ve D5)
- 3) *taşıyıcı genleri*: nörotransmitterlerin presinaptik uca yeniden konulmasında rol alırlar (örneğin; DAT1)
- 4) *metabolit genleri*: nörotransmitterlerin yıkımında ya da metabolizmasında yer alırlar (örneğin; catechol-o-methyl-transferase geni, COMT)
- 5) *bir nörotransmitterin başka bir nörotransmittere dönüşmesinden sorumlu genleri* (örneğin; Dopamin beta hidroksilaz ya da D $\beta$ H, dopamini norepinefrine dönüştürür) (31).

Aday genlerle ilgili çalışmalar, çoğunlukla dopamin nörotransmitter sistemleri içeren genlerle başlamış, diğer majör nörotransmitter sistemlerin (örn; adrenerjik, noradrenerjik, serotonerjik) aday genleriyle devam etmiş ve nörotransmitter sistemlerin dışındaki, beyin ve sinir sistemi gelişiminin farklı yönlerini içeren genlerle ilişkilendirilmeye çalışılmıştır (20).

Yapılan çalışmalarda DEHB'nin ailesel ve kalıtsal geçiş gösterdiği saptanmışsa da; diğer çoğu psikiyatrik bozuklukta olduğu gibi, soy ağaçlarının incelenmesi sonunda tutarlı bir Mendelyen kalıtım biçimi göstermemiştir. Bu sebeplerle birçok hastalığın etiyojisinde etkisi olduğu düşünülen, proteine kodlanmayan küçük RNA (ncRNA) molekülleri üzerinde durulmaya başlanmıştır. Yaklaşık 20 yıl önce keşfedilen ve ncRNA çeşitlerinden biri olan mikroRNA (miRNA)'ların, özellikle Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarla; ilişkilendirilmeye çalışıldığı belirtilmektedir.

## **2.2. mikroRNA (miRNA)**

İnsan genomunun yaklaşık %97'si kodlanmayan DNA'dan oluşmaktadır. Genomik kodun büyük bir kısmı ise sadece RNA'ya dönüşürken, asla proteine çevrilmezler. Proteine kodlanmayan RNA (non-protein-coding RNA –ncRNA-) olarak adlandırılan bu grubun önemli işlevlerinin olduğu belirtilmiştir. Kabaca küçük (<400 nukleotid) ve büyük (>400 nukleotid) olarak iki gruba ayrılan ncRNA'lardan miRNA'lar, küçük (<400 nukleotid) ncRNA'lar içerisinde yer alırlar (32, 33).

İlk olarak 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından, *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilen; lin-4 (*lineage-deficient-4*) ve let-7 (*lethal-7*) olarak isimlendirilen miRNA'lar; küçük düzenleyici RNA'ların bir sınıfı olarak gündeme gelmişlerdir. miRNA'lar son yirmi yılda, gen ekspresyonunun kritik düzenleyicileri olarak ortaya çıkmışlardır. miRNA'ların keşfedilmesi, tıp biliminde potansiyel uygulamalar açısından önemli bir atılım olmuştur. İnsan genomundaki toplam 2000'in üzerinde miRNA çeşidi tanımlanmış olsa da, bu sayı yeni çalışmalar ile sürekli artmaktadır. Memeli genlerinin yaklaşık %30 kadarının miRNA'lar tarafından düzenlenmekte olduğu tahmin edilmektedir. miRNA'ların biyolojik fonksiyonu tam olarak belirlenememiş olmakla beraber, hücre çoğalmasından ve farklılaşmadan, apoptozdan, stres cevabından sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Çeşitli hastalıklarda miRNA'ların rolü, önümüzdeki yıllar içinde netlik kazanacaktır. Gelecekte,

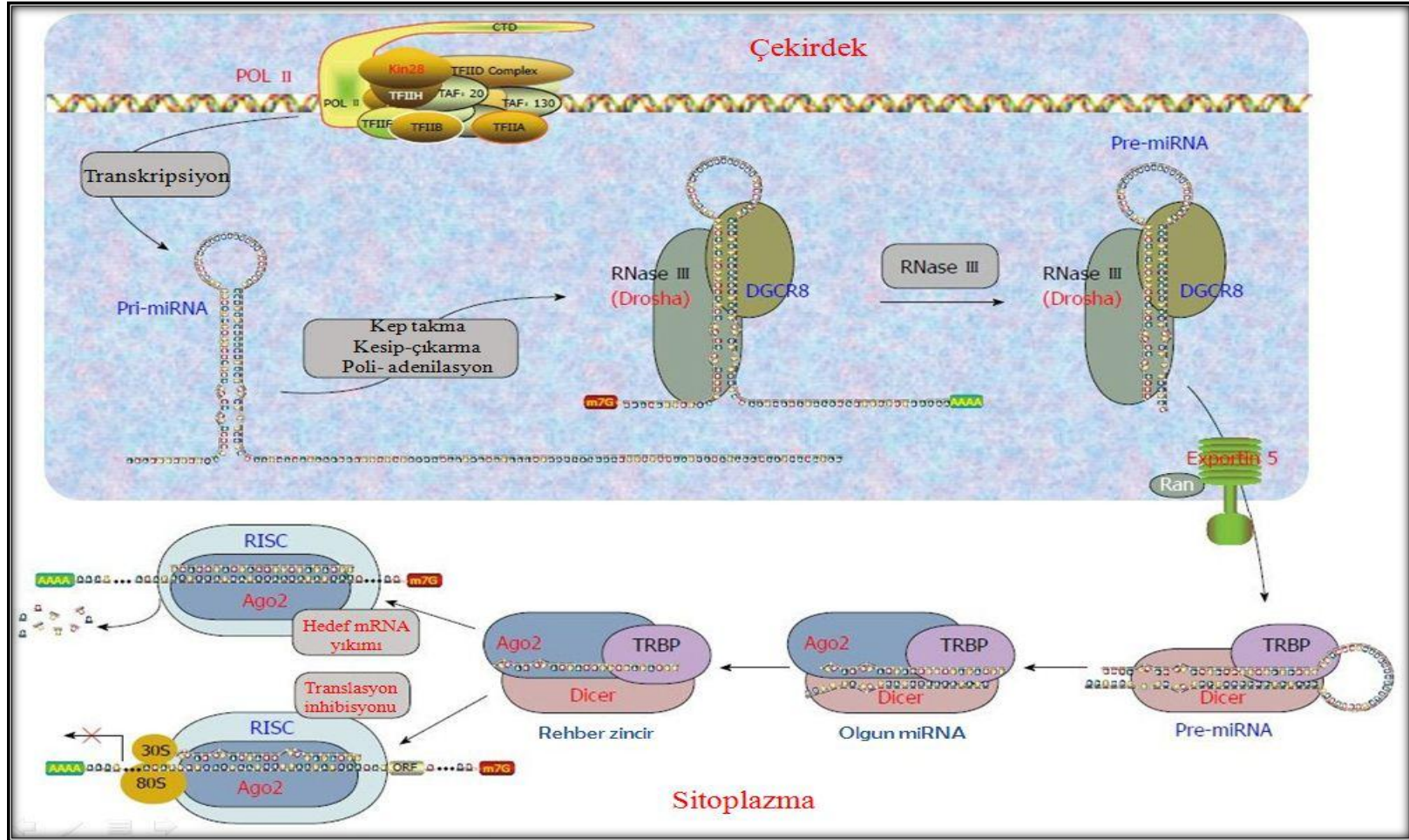


özgün miRNA'ların ifadesi, bir tedavinin etkisinde izleme ya da tanı koymada birer biyomarker olarak kullanılabilir (32-38).

### **2.2.1. mikro RNA (miRNA) Oluşum Basamakları**

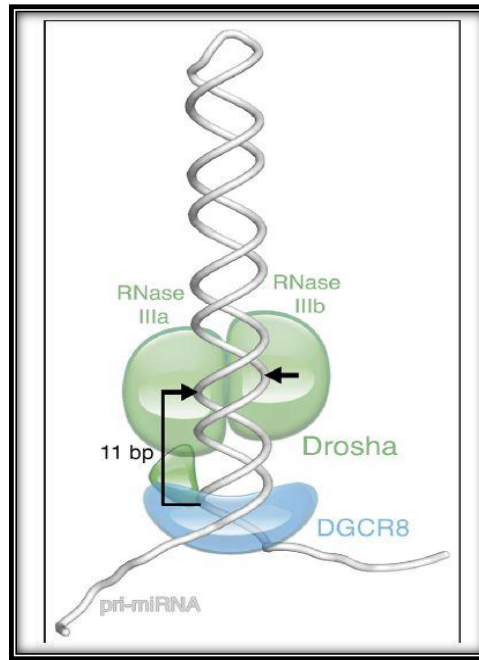
Çoğu miRNA kodlayan gen, yapısal olarak protein kodlayan genlere benzer. MikroRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden, primer miRNA(pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar; nükleus içinde, öncül miRNA(pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.6) (39, 40).

miRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan; fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir. Olgun miRNA'lar 20-25 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli moleküllerdir. Primer miRNA transkriptleri (pri-miRNA'lar) genellikle RNA polimeraz II (küçük bir grubu RNA polimeraz III) tarafından intragenik ya da intergenik kromozomal (genomik) DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA'lar "cap"lenmiş ve "poli-adenil"lenmiş olup, birkaç kilobaz uzunluğundadırlar. Pri-miRNA'lar çift zincirde bir ya da daha fazla sayıda saç tokası ilmeği ve bir terminal uç içerirler (11, 32, 35, 39, 41).



Şekil 2.6. miRNA oluşum yolunun şematik gösterimi (35).

miRNA oluşum süreci çekirdekte başlar (Şekil 2.6). Pri-miRNA'lar mikroişlemci kompleks (microprocessor complex) tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki, öncül miRNA (precursor miRNA=pre-miRNA) formuna dönüştürülür. Mikroişlemci kompleksi bir, sınıf II RNaz III protein ailesi olan Drosha ve onun kofaktörü olan çift iplikli RNA bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8)'in oluşturduğu komplekstir (insanlardaki adı DGCR8 olan proteinin adı *Caenorhabditis elegans*'ta PASHA'dır) (Şekil 2.7) (39, 42).



**Şekil 2.7.** Mikroişlemci kompleksin pri-miRNA ile kurduğu bağın çizimsel gösterimi. DROSHA yeşil renk ile DGCR 8 ise mavi renk ile gösterilmiştir. Siyah oklar ayrılma bölgelerini işaret etmektedir (42).

Çekirdekte pre-miRNA formuna dönüştürülen yapı, Exportin-5 (XPO-5) tarafından RanGTP bağımlı olarak sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA sitoplazmada, sınıf III RNaz III üyesi olan Dicer endonükleaz enzimi ile ~20-25 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli rehber (guide) ve yolcu (passenger) zincirden oluşan miRNA/miRNA\* dubleksine çevrilir. Memeli hücrelerinde Dicer; trans-aktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein (trans-activation response element RNA binding protein, TRBP = TARBP) ve interferon uyarıcı protein kinaz aktivatör protein (PACT) ile iş birliği içerisinde. Dicer, pre-miRNA'nın saç tokası ilmiğini keser. Bu kesimin ardından miRNA/miRNA\* dubleksinden sadece bir

tanesi RISC (RNA-induced silencing complex = RNA ile uyarılmış sessizleştirme kompleksi) içerisine girer. Seçilen bu zincir, 5' ucu ile Argonaute (AGO) proteinine bağlanan rehber zincirdir. Rehber zincirin 5' ucu, öteki zincirin ucuna göre daha kararlıdır. RISC, AGO ve rehber zincirin birlikte oluşturduğu yapı mi-RISC olarak adlandırılır. Komplekse dahil olmayan zincir, yolcu zincir (miRNA\*) olarak adlandırılır. Bu zincir nükleazlar tarafından parçalanarak yok edilir. mi-RISC; Dicer, TARBP, PACT, GEMIN 3 (Gem "çekirdek organeli" İlişkili Protein 3) ve GEMIN 4 (Gem "çekirdek organeli" İlişkili Protein 4) gibi birkaç proteini içerir; fakat bu proteinler doğrudan AGO ile ilişkilidir. AGO proteinlerinin memeli hücrelerde AGO 1, AGO 2, AGO 3 ve AGO 4 olmak üzere 4 farklı formu, her bir proteinin de N-terminal, PAZ, orta ve Piwi olmak üzere de 4 bölgesi bulunmaktadır (35, 39, 41, 43-45).

Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif RISC kompleksi miRNA'daki 2-8 nükleotidlik çekirdek dizi (seed sequence) ile mRNA (messenger RNA)'ya bağlanır. Bu eşleşme, mRNA'nın 3'UTR (untranslated region) bölgesi ya da ORF (open reading frame) ucu tarafında gerçekleşir. 3' UTR tarafındaki eşleşme, mükemmel olmayan eksik bir eşleşme şeklinde gerçekleşirken, ORF ile kurulan bağ mükemmel bir şekilde gerçekleşir (Şekil 2.8) (39, 40,41).



**Şekil 2.8.** miRNA'lar kendi çekirdek sekansları ile mRNA'ya bağlanırlar (sarı ile vurgulanmıştır). Argonaute proteine bağlı bir miRNA yapısı bu konumda baz eşleştirmeyi önlese bile tipik olarak miRNA bağlanma bölgesi miRNA'nın ilk nükleotidinin karşısına yerleşir, ilk nükleotidin karşısında bir adenozin (altı çizgili) bulunur (46).

mi-RISC kompleksi, AGO yardımıyla hedef mRNA'nın yıkımını başlatmakta ve/veya protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda yapılan son çalışmalarda miRNA'ların, translasyonu arttırdığı yönünde ifadeler de bulunmaktadır. Buna göre; hücre döngüsü arest durumunda iken, TNF  $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) aktivasyon sinyali üzerinden miR 368-3 direkt AU-Rich element (ARE) ile ilişkili olarak translasyonu aktive etmektedir (35, 39, 45, 47).

### 2.2.2. miRNA-SNP İlişkileri

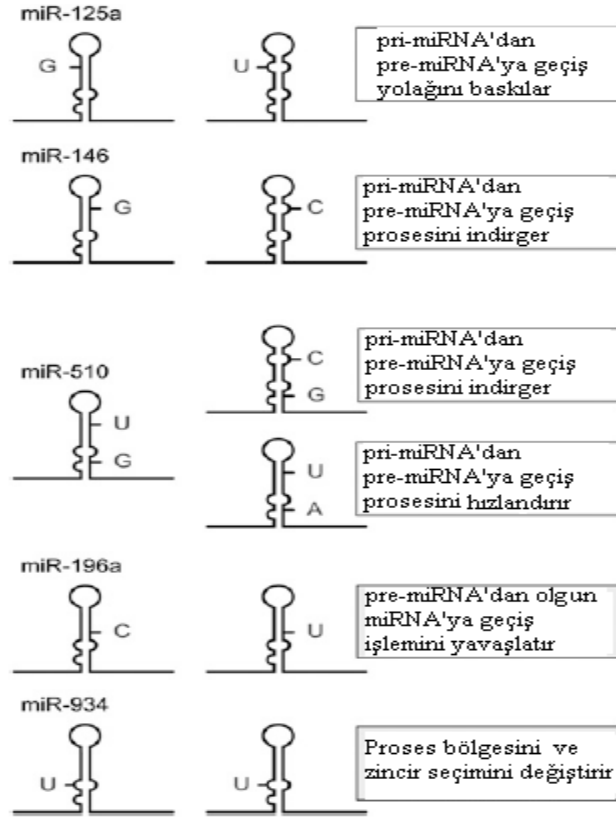
Son zamanlarda , miRNA düzenleyicilerinin kendilerinin, kendi genlerini veya hedef bölgeleri üzerindeki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile düzenledikleri açıkça ortaya konmuştur. SNP'ler sekans varyasyonlarının tekrar etmeyen bir formu olup, bir türe ait bireyler arasındaki çeşitliliğe katkıda bulunan faktörlerden biridir. Bazı genom boyu ilişki çalışmalarında (GWAs) belirlenen tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) önemi araştırılmış ve bazı SNP'lerin genomun kodlanmayan bölümlerine ait olduğu belirlenmiştir. Binlerce SNP karakterize edilmiş ve deneysel olarak birçok miRNA'nın hedef bölgelerine geçerliliği onaylanmıştır, fakat asıl miRNA dizilerinin çeşitliliği azdır. Bu SNP'lerin çoğunun, miRNA-bağlayıcı bölgeleri oluşturmak için olduğu tahmin edilmektedir. Potansiyel olarak, bu tür polimorfizmlerin bireyler arasındaki fenotipik farklılıklara katkıda bulunuyor olabileceği düşünülmektedir (33, 48).

SNP'ler; pri-miRNA, pre-miRNA ya da olgun miRNA seviyelerinde meydana gelebilmekte ve olgun miRNA'ların ifade seviyelerini potansiyel olarak etkileyerek, miRNA fonksiyonunu etkilemektedir. İlkesel olarak pri- ya da pre- sekanslarda belirli SNP'ler, miRNA öncüllerinde değişime neden olabilmekte, olgun miRNA'ların ifade seviyelerini değiştirebilmekte ve dolayısıyla etkinlik ve / veya seçicilikte hedefi değiştirebilmektedir (Şekil 2.9) (49, 50).

miRNA öncülerinde SNP'lerin tanımlanmasında ilk çalışma 2005 yılında Iwai ve Naraba tarafından yapılmış olsa da, miR SNP'lerin insan hastalıklarıyla ilişkisi, 2007 yılında Martin ve ark. tarafından gösterilmiştir (11, 50).

Ana sekansta ya da miRNA hedefinde; bir SNP'nin oluşması, miR SNP olarak adlandırılır. miR SNP'ler ise, miRNA kompleksinin bağlanmasını olumsuz etkileyebilirler. Bu değişim kodlanan protein seviyesinin ekspresyon seviyesini değiştirerek, sonuçta çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olan fenotip değişmelerine yol açabilmektedir. miRNA'ların hedef bölgeleri ve onların hastalıklarla ilişkili bölgelerinde meydana gelen SNP'ler, gen regülasyon bozukluğuna neden olmaktadır. Bu bozuklukların çeşitli kanserler, kardiyovasküler bozukluklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, miR SNP'ler fonksiyon kaybı ya da kazanımlarına sebep olabilmektedir.

Örneğin şizofrenide miR-510 ve miR-502'deki SNP'ler fonksiyon kaybına neden oluyorken, konjenital kalp hastalığında miR-196a2'deki SNP, fonksiyon kazanımına neden olabilmektedir (7, 48, 50).

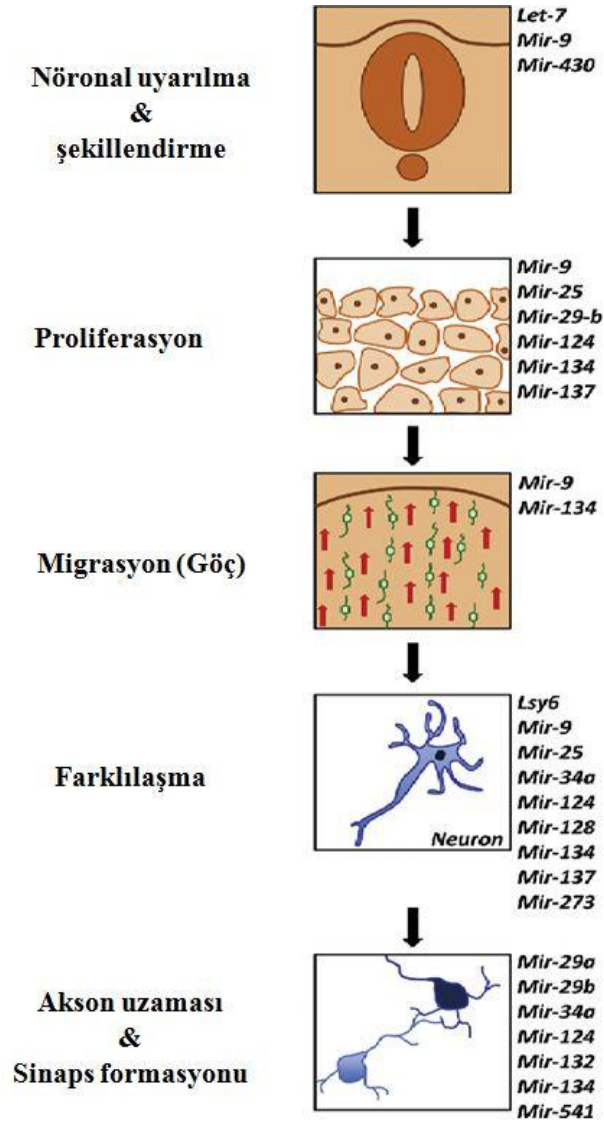


Şekil 2.9. SNP'lerin miRNA sürecindeki rolü (11).

### 2.2.3. miRNA'ların nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkisi

Psikiyatrik hastalıkların altında yatan patofizyolojiler, yeterince anlaşılabilmiş değildir. Küçük düzenleyici RNA moleküllerinin psikiyatrik hastalıkla ilişkisi, düşünülmekle birlikte, mekanizma tam olarak açıklanabilmiş değildir. Beyin gelişim aşamalarında, özellikle beyin içinde çok miktarda ifade edilmesinden dolayı miRNA'ların, nöropsikiyatrik hastalıkların etiyolojisini aydınlatma çalışmalarında, ilgi odağı olmasına neden olmaktadır. miRNA genlerinin, gelişimin kritik düzenleyicisi olduğu da öne sürülmektedir. Merkezi sinir sisteminde miRNA'lar özellikle nöronal gelişim, farklılaşma,

nörodejenerasyon, göç (migrasyon) ve apoptoz gibi olaylarda rol oynamaktadır (Şekil 2.10) (51-54).



Şekil 2.10. Nöronal hücrelerin gelişiminde, farklılaşmasında ve diğer basamaklarında miRNA'ların rolü (54).

miRNA'lar, insanların tüm dokularında ifade edilmektedir. miRNA'ların çeşitli rollerinden biri de sinir sisteminin doğru çalışması için gerekli olmasıdır ve miRNA'ların

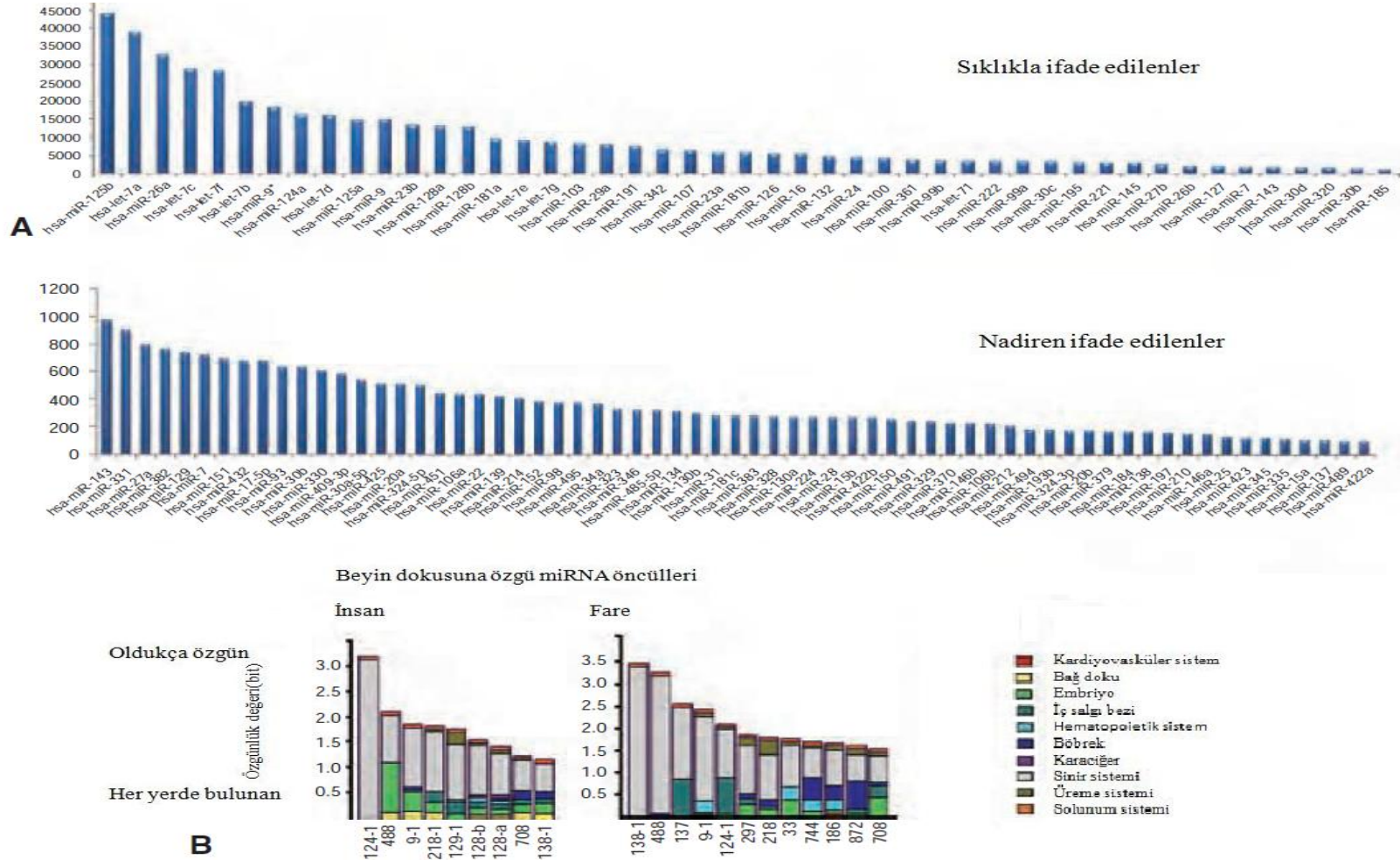
%60-70'e yakını beyin dokularında nöronlara özgü olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.11) (55, 56).

Beyin dokusuna özgü miRNA'lardan biri olan miR-124, beyin gelişiminde gereklidir. İlginç bir şekilde, diğer genlerde miR-124'ün aşırı ifadesi, nöron benzeri oluşumlara yol açmaktadır. Ayrıca miR-124'ün nöroblastoma hücrelerindeki aşırı ifadesi RNA transkriptlerinin kesip çıkarma paternini de değiştirmektedir. Spesifik miRNA'ların özellikle nörolojik hastalıklarla bağlantılı olduğu, çok sayıda yayında ifade edilmiştir. Örneğin; miR-206 eksikliği amyotrofik lateral skleroz sürecini hızlandırmakta, miR-9'un eksikliği spinal motor nöron hastalığına neden olabilmekte, miR-19, miR-101 ve miR-130, seviyeleri ataksin 1 seviyesinin yeniden düzenlenmesi nedeniyle de, spinoserebellar ataksi tip 1'in görülme sıklığını değiştirmektedir (51, 55).

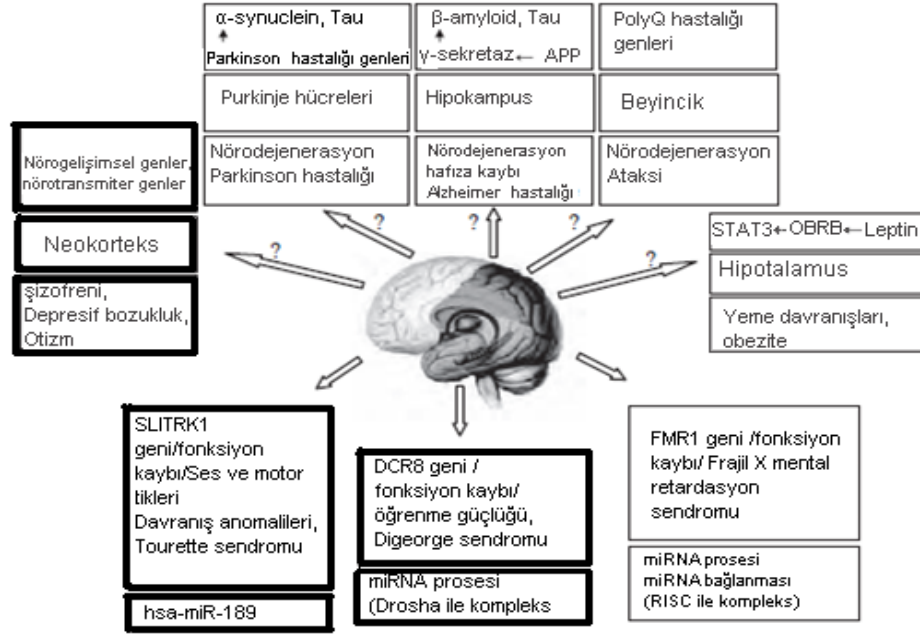
Nöronal gelişimde, fareler üzerinde en çok çalışılan miRNA'lardan biri olan miR-124'ün miR-124-1, -2 ve -3 olmak üzere üç bölgesi bulunmaktadır. Fare genomunda mi-124-1'in delesyonu, hipokampus ve retina da apoptozu (programlı hücre ölümü) arttırmakta ve beynin küçülmesine neden olmaktadır (57).

miRNA'ların ifade edilme seviyelerindeki değişimin; Parkinson, Alzheimer, Huntington, Tourette sendromu, şizofreni, depresyon ve ruh sağlığı bozukluklarının da içinde bulunduğu, psikiyatrik ve nörolojik hastalıklara yol açtığı çok sayıda yayında belirtilmektedir (Şekil 2.12) (51, 52, 57-59).





**Şekil 2.11.** Yetişkin insan beyinde miRNA'ların ifadesi. (A) İnsan miRNA çipleri kullanılarak, insan beyin neokorteks duvarında hibridizasyonla tespit edilmiş farklı miRNA çeşitlerinin ifadelerinin göreceli seviyeleri. 1000den fazla ifade edilenler yüksek ifadeli miRNA'lar, 1000'den az-100den fazla ifade edilenler nadir ya da az ifade edilen miRNA'lar olarak gösterilmiştir. (B) miRNA'lar genellikle beyinde ifade edilir. Diğer dokularla karşılaştırıldığında beyindeki miRNA seviyesinin zenginliğinin göreceli gösterimi (51).



**Şekil 2.12.** Bazı nöropsikiyatrik hastalıkların gelişiminde miRNA ve miRNA bileşenlerinin potansiyel rolü (51).

Sadece miRNA'ların değil, miRNA bileşen ve enzimlerinin de nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. RNaz III Dicer'in, miRNA biyogenezinin erken aşamalarında rol oynadığı bilinmektedir. Dicer delesyonunun fosforilasyon aşamalarında değişim yaratması sonrasında, nöronal hücrelerde azalma olduğu vurgulanmıştır. Farelerle yapılan çalışmalarda; Dicer'in embriyogenez sırasında delesyonu sonucunda, oligodentrogliyal farklılaşmada ve nöronal göç ve farklılaşmasında ortaya çıkan anomalilerde etkili olduğu öne sürülmektedir. Purkinje hücrelerinden Dicer'in uzaklaştırılması sonrasında, purkinje hücrelerinin öldüğü buna bağlı olarak da beyincik dejenerasyonlarının ve ataksinin geliştiğini rapor edilmiştir. Mikroişlemci kompleksi üyelerinden Drosha'da meydana gelen mutasyonların da, Parkinson hastalığında rol oynadığı ifade edilmiştir. DGCR8 baskılandığı zaman, merkezi sinir sisteminde morfolojik anomalilerin ve mekânsal hafıza-bağımlı öğrenme bozukluğu gibi öğrenme kusurlarının ortaya çıktığı, GEMIN-3 ve GEMIN-4 proteinlerinin, yaşamsal motor nöronlardaki mutasyonunun da nörodejeneratif hastalıklardan spinal müsküler distrofiye neden olduğu belirtilmiştir (54-58, 60).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler ve Kimyasallar

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları

- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- 15 ml'lik Polipropilen Santrifüj Tüpleri (BD Falcon)
- Hassas Terazî (AND GR-200)
- Derin Dondurucu (Arçelik 2031D)
- Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- Standart 96 Kuyucuklu Polipropilen Real Time PCR Plate (Applied Biosystems)
- Microamp 96 Kuyucuklu Real Time PCR Plate için Film (Applied Biosystems)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V, OT 40 L)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sodyum Etilendiamintetraasetik asit (Na<sub>2</sub>EDTA) (Sigma E-5134)
- Etanol (Merck)
- Primerler ve Problar (Metabion International AG)
- 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- Tris-Hidroklorit (Sigma T-7149)
- Proteinaz K (Fermentas E00491)

- Steril Apirojen Distile Su (Mustafa Nevzat)
- Amonyum Asetat ( $C_2H_7NO_2$ )
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck)

### **3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

#### **3.1.3.1. Nüklei Lizis Tampon Çözeltisi**

10 mM Tris-HCl.....1,576 gr (pH 8)

400 mM NaCl.....23,4 gr

2 mM  $Na_2EDTA$ .....0,7 gr (pH 7,4)

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

#### **3.1.3.2. %10 SDS**

10 gr SDS 100 ml distile su ile çözüldü. (pH 7,2).

#### **3.1.3.3. TE Tampon Çözeltisi**

10 mM Tris-HCl.....0,394 gr (pH 8)

1 mM  $Na_2EDTA$ .....0,093 gr

250 ml distile suda çözüldü.

#### **3.1.3.4. 10 M Amonyum Asetat ( $C_2H_7NO_2$ ) Tampon Çözelti**

148 gr  $C_2H_7NO_2$

200 ml distile suda çözüldü.

#### **3.1.3.5. Proteinaz K için Tampon Çözeltisi**

10mM Tris-HCl.....0,394 gr

200 ml distile suda çözüldü. Otaklavda steril edildi. +4  $^{\circ}C$ 'de saklandı.

### **3.2. Vaka-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması**

Araştırmaya başlamadan önce, Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğünden B.10 0TGH.0.79.00.07/ sayılı kararla etik kurul onayı alınmıştır. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilip, bu iki örneklem grubu üzerinde genotipleme çalışması yapılmıştır.

#### **3.2.1. Vaka Grubunun Seçimi**

Çalışmaya dahil edilen hastalarda gönüllülük esas alınarak, bu kişiler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve yazılı onayları alınmıştır. Vaka grubunu oluştururken okuma - yazması olmayan, nörolojik/kronik hastalığı, psikotik bozukluğu, organik nedene bağlı psikiyatrik bozukluğu ve mental retardasyonu olan hastalar dışlanmıştır. Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Polikliniği'ne başvuranlar arasından;

- 18- 60 yaş arası olanlar,
- Çocukluk ağında DEHB öyküsü olanlar,
- Wender-Utah Değerlendirme Ölçeği (WUDÖ)'den 36 ve üzeri puan alanlar (ölçeğin Türkçe uyarlamasının geçerlilik ve güvenilirliği yapılmış olup, kesme puanı 36 olarak belirlenmiştir),
- Erişkin DEB/DEHB Tanı ve Değerlendirme Envanterinde birinci ve/veya ikinci bölümdeki 9 sorudan en az 6 tanesine 2 veya 3 cevabı vermiş olanlar,
- DSM-IV tanı ölçütlerine göre DEHB tanısı konanlar alınmıştır.

Bu kriterleri sağlayan 191 kişiden oluşan bir vaka grubu oluşturulmuştur.

### **3.2.2. Kontrol Grubunun Seçimi**

Kontrol grubu, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi sağlık personeli ve yakınları arasından seçilmiş, 18 - 60 yaş arası 164 kişiden oluşturulmuştur. Kontrollerin seçiminde; vaka grubundaki seçimdeki gibi, gönüllülük esas alınarak, bu kişiler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve yazılı onayları alınmıştır. Araştırmacı tarafından, kontrol grubuna Erişkin DEB/DEHB Tanı ve Değerlendirme Envanteri ve Wender-Utah Değerlendirme Ölçeği (WUDÖ) uygulanmıştır. Kontrol grubu oluşturulurken, erişkin DEHB tanı ölçütlerini karşılayan, okuma - yazması olmayan, nörolojik/kronik hastalığı, psikotik bozukluğu, organik nedene bağlı psikiyatrik bozukluğu ve mental retardasyonu olan hastalar dışlanmıştır. Bireylerin vaka grubu ile benzer coğrafi bölgeden olmasına dikkat edilmiştir.

Her iki gruba ait bireyden gönüllü olarak çalışmaya katıldıklarına dair yazılı beyanları alındıktan sonra, 4-5 ml periferik kan % 2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren 2 adet 2 ml'lik mor kapaklı hemogram tüplerine alındı.

### **3.3. Tuz ile Çöktürme Yöntemi Kullanılarak Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

Periferik kandan DNA izolasyonu için laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan manuel tuz ile çöktürme yöntemi kullanıldı (61). Vaka ve kontrol gruplarına ait kan örnekleri numaralandırılıp sıraya konduktan sonra DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı. DNA izolasyonu için, sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı:

- 1.** Nükleus içinde bulunan DNA'nın serbest kalması için hücre zarının ve çekirdeğinin yapısının parçalanması gereklidir. Bu amaçla mor kapaklı hemogram tüplerindeki kan 15 ml'lik polipropilen tüpler içine aktarıldı ve üzerine 10 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi. Daha sonra 3-4 dk süreyle tüpler hızlıca çalkalandı.
- 2.** Sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dk 2000 rpm`de santrifüj edildi.
- 3.** Çökelti üstündeki sıvı faz (süpernatant) 7 ml seviyesine kadar atıldıktan sonra tekrar 10 ml'ye tamamlamak için soğuk steril distile su ilave edildi.

4. Oda sıcaklığında 10 dk 2000 rpm`de tüp santrifüj edildi ve tekrar süpernatant atıldı.
5. Soğuk distile su ile yıkama işlemi sıvı faz 7, 5, 3 ve 2ml seviyesine kadar uzaklaştırılmak üzere 4-5 kez tekrarlandı.
6. En son basamakta (süpernatant kısmı tamamen beyaz olduğunda) tekrarlanan adımda süpernatant atıldıktan sonra çökelti üzerine 3 ml nuklei lizis tampon çözeltisi eklendi. Bu basamak ile nükleus içeriğinin ortamda serbest kalması sağlandı.
7. 10 ng/ml konsantrasyondaki Proteinaz K`den 150 µl ve 200 µl %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) köpürtmeden yavaş yavaş eklendi. SDS bir deterjan türevi olup, hidrofobik ve hidrofilik kısma sahip bir molekül olduğundan yapısında yağ bulunduran hücre membranının ayrışmasına neden olur. Dolayısıyla hücre içeriği serbest hale geçer. Proteinlerin elimine edilmesi için de proteinleri sindiren enzimlerden biri olan Proteinaz K kullanıldı.
8. Proteinaz K'nin optimum düzeyde işlevini yapabilmesi için tüp yaklaşık 20 defa alt-üst edildi ve bir gece 37°C`de etüvde inkübasyona bırakıldı.
9. Aktif haldeki enzimin denature edilerek etkisinin sonlandırılması amacıyla ertesi gün inkübasyondan alınan örnekler 55°C'de 1 saat bekletildi.
10. 2 ml 10 M amonyum asetat ( $C_2H_7NO_2$ ) ilave edilip yavaşça yaklaşık 20 defa aşağı yukarı alt üst edildi. (Amonyum asetat proteinlerin DNA'dan ayrılmasını kolaylaştırır.)
11. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve 15 dk 3500 rpm`de santrifüj edildi.
12. Süpernatant başka bir tüpe alındı ve üzerine hacminin 2 katı kadar soğuk, saf etanol eklendi. (DNA'nın alkolde çözünmemesi özelliği nedeniyle, DNA molekül ağırlığı ağır olmasına rağmen yumaklaşıp beyaz bir iplik halini alır ve yüzeye doğru çıkar ya da çözültide asılı kalır.)
13. DNaz aktivitesinin durdurulabilmesi amacıyla, elde edilen DNA yumağının miktarına göre Tris-EDTA (TE; pH 8) tampon çözeltisi eklendi (~500µl).
14. Ardından tüpler oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra bir sonraki deneye kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

### **3.4. Vaka-Kontrol Gruplarının Polimorfizmler İçin Genotip Tayini**

#### **3.4.1. Genotipleme Yapılacak SNP'lerin Seçilmesi**

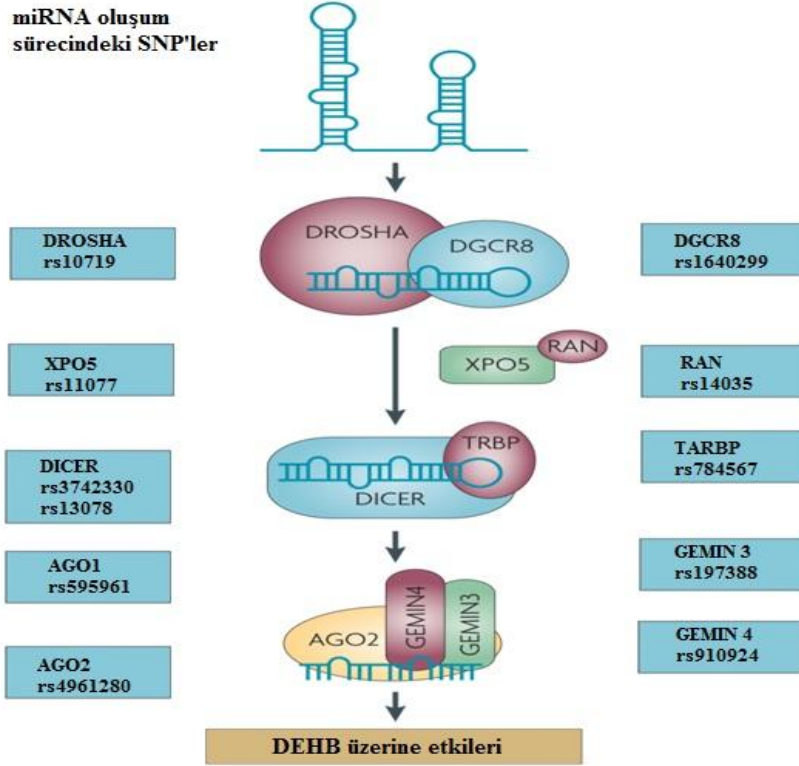
Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, hem hasta hem de kontrol örneklem grubu üzerinde genotip belirleme yapıldı. Genotipleme Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction; Real Time PCR) yöntemi ile ilgili, polimorfik sekansa özgü proplar kullanılarak, Çizelge 3.1'de yer alan polimorfizmler için yapıldı. miRNA oluşum yolağındaki genler Şekil 3.1'de temsili olarak gösterilmiştir. Daha önce mesane kanseri üzerine yapılmış bir vaka kontrol çalışmasında yer alan miRNA oluşum yolağında görevli genlere ait polimorfizmler, bu çalışmada aday gen bölgeleri olarak seçilmiştir (62). Polimorfizmler seçilirken Minör Allel Frekansı (MAF) 0.01'den büyük olanlar araştırmaya dahil edildi. Daha çok gen ekspresyonu üzerinde etkisi olabilecek bölgelerdeki (3'-UTR ve promotor bölge) polimorfizmler seçilmiştir.



**Çizelge3.1.** Tez çalışmasında araştırılacak miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri

<i>Genin Adı</i>	<i>Gen ID</i>	<i>SNP rs no</i>	<i>Pozisyon</i>	<i>Varyant (M&gt;m)</i>
RNASEN	29102	rs10719	3'UTR	C>T (G>A)
DGCR8	54487	rs1640299	3'UTR	G>T
XPO5	57510	rs11077	3'UTR	A>C (T>G)
RAN	5901	rs14035	3'UTR	C>T (G>A)
DICER1	23405	rs3742330	3'UTR	A>G
DICER1	23405	rs13078	3'UTR	T>A
TARBP2	6895	rs784567	5'UTR	C>T (G>A)
AGO1	26523	rs595961	İntron 10	A>G (T>C)
AGO2	27161	rs4961280	Promotor	C>A
GEMIN3	11218	rs197388	Promotor	T>A
GEMIN4	50628	rs910924	Promotor	C>T

Kısaltmalar: M>m, majör>minör allel



**Şekil 3.1.** Tez çalışmasında araştırılacak miRNA oluşum yolağındaki genler ve rs numaraları

### 3.5. Real Time PCR Genotipleme Deneyi İçin Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi

Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı ile Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü'nde (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) bulunan referans insan genom dizilerinden yararlanılarak *DGCR8*, *RAN*, *TARBP2*, *DICER*, *XPO5*, *RNASEN*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* polimorfizmlerine özgü primer ve prob dizileri dizayn edildi. Şekil 3.2-12'de gösterildiği üzere referans genom dizileri üstte belirtilmiş olup, primer eşleşme bölgeleri sarı ile işaretlenmiştir. Yeşille işaretlenen bölgeler prob eşleşme bölgesi iken, kırmızı renkle işaretlenen nükleotid polimorfik allelin yerini işaret etmektedir. Her bir primer ve prob dizisinin üstünde dizayn yapılırken NCBI'dan kullanılan, insan referans genom dizileri belirtilmiştir.

NM\_001100412.1

```
AAATAAAAGGAAGTAATGCACATTCACCAAAGTCAAGTTTTCCGTTAAATAGAAGAAAAATCTAATACTTTGT  
AATAAAGACCATCCAGCTAAAAACAGATCATTAAAAACAACAATAGCGATTTGACTCTGTATTTTATTTCAATG  
AGCACACTTCAATTCATTGTCTGCAGGAAAC TAGGCTAGGTCTCAATAGACAACAGTCA CAGTTACTGAGCAA  
GTAAATACTCCACACTTGCAATGCCCTCCTTTATTTCTTGATGTCCTTCAGTCT
```

**Şekil 3.2.** *RNASEN*'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs10719'nin (C>T; G>A) olduğu bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NG\_022931.1

```
AACCATCAAGGTGGTCCCTCTCCAGTCTGGACACGATGCCAGCAAGGATGACGTCCCTGCCACCTCCTGGAGTT  
ACCC TGGCCTCCTAGGGTCCCTT TTTCTGATGAAG TCTTAAT TCCCTAAAAGCGCCT CTTTGGAC ACTGAGGC  
CCTCTCTGCCTT TCCTGGCCTCCGGCAACAGTTTTTTTACAAAGATTTTTTGCAGTCGAGTCCATATGTCCACC  
CATTGATTTTTTAAAGCTTTTGTGATATTTTAGCATTTTGAAAGACTTTCACAGTGAGAGTAGAAGGTAGATTT  
GGAATCATGCATTTTAGCAAGTGGACTTGTGAAACAGGAAGCAAGGGCCTTCAGTGT
```

**Şekil 3.3.** *DGCR8*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs1640299'nin (G>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NM\_020750.2

```
TGTCATGTGACACTATCTAGGGTACTGTGGCTCTTGTGCCTGAGTGGACCTTGAGGCTGGGGAGGCCAGACTG  
AGGGGTCATTCATGGAAGGGCAAGATGTGT GAAC TCTAAAGGGGATGTTAGC ACTAAAAGACT TCCAGCCCTG  
GTCCTTGAGGTACTATACTTGATACTGTGCCA AGTTTAGCAGTAGCCTGTACCATGG ATCCCATCAGGTGAC  
CAGATTCTTGCCCAAAGCAAAGTTGAGAGAACTGACCAAGTTCTCTTCAGCACTTAGCACCTAACCAGACAT  
GCCCTTAGGGAGTGGGAAAAGTTTCCCTGCCAGCCAGCAGCAAAGGGCTCAGTGGG
```

**Şekil 3.4.** *XPO5*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs11077'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT\_009755.19

```
AGGAGTACCTGAAAACGTGGGGTAAACATGGACCATTTTCCTTGCGTATCAACTTCACACTAAGCATCTAACA  
TTCAAACAAAAAGTGCAAAATTTGTAATTATTTTTAACAGCAAGAATCCCAACCTCC TGCCATCCACTGAT  
GTTCCAT CCTGTTTGA GTTCTACATTAAAAA TGATTACTTTTGCCATAAAAAGAAAAATATTACCCTTAAAAAT  
ATCTATTTGATATGTACA AACCACATTTTTATTCTGACAGGTCA CAGATTTTGAGCAAGTGCTTCCCTAGGTG  
ACCCTACCTAGCCAATATGAAGGTGGAGCAAACACTGCTTTAGCTTAACTGCACTAATATTTACACCATGTAA  
CCCTTCTAAC
```

**Şekil 3.5.** *RAN'a* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs14035'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NG\_016311.1

```
TTATTCAAATGTAATTAAAAACAACCATATAGGTAATAAACATGACATGAGTTTCTCTTCTGCAGATAATGCAA  
ATGGGTAAAGACTCTTAACATAAATTCAGATGCAGTTAAAAAAGGTA TCAAGGTCTCAGTTTGGTGGCTTC  
AATCTTGTA AAGGGATTAG CACCCTAACAGAGC AAGATCCAATATTTTAAATCAACGGGGCCTT GTGCAT  
GAACTGCGCTCG ATCTGGATTCCAGTGATCCTCTGCAGTGCCACCTGCCTCCAGGGAGCGACTGAAGAAGCC  
GACTGCCG
```

**Şekil 3.6.** *DICER1'e* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs3742330'nin (A>G) yer aldığı bölgenin dizisi.

NG\_016311.1

```
CGCAAAAACTAAAACTACAATTAGTTCCAAAATTTTATACATATGTTAAATGTTTTATTCTGTTATCTATCC  
TGTTATCAACCAAAT TTAAATCTGCCTTCAATTCATTCCA CTCACTA CAACTTTAAGTCTTCCTT TCCGA  
TTTAAATAATTTCCCTTAATTTTTTTGTTTTGTTTTCTTGTGTTTTGAATTTTAA AAAGCGGTTTCAGCTATT  
GGGAACCTGAGGTTGATTAGCTTTGAGGCTTCGGAGGGCTTCTTCTGCTGCTGCAGATTTGGCAATCCTGTAA  
CTTCGACC
```

**Şekil 3.7.** *DICER1'e* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs13078'nin (A>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NT\_029419.12

```
AAAGGTTTCACAAAAGAAGCAACACCTGAAGGGAGGTGAAGGACGACCTAGGAAAAGGAAGCAAGTTCTGTGT  
CACGGAGGCCCAAGGGCAAGGGGCTTAGGCTGTGGGTTGAGGGGACTGTCTGAGACGGACTTAACCTGCACC  
AGCTCCAGA GCCCTGCGGAACAGAGATC GTCCCCCTCCGGG GTCTAGGTAAGGCCACCCTCCCA GACCGCA  
AAGAGCCAGGATCCGACGGCAGCCTCTCCGGACCAATCACAACCTTCCTTCATCAAGGAGGCGGGGTCGGGG  
GGGCTGAC
```

**Şekil 3.8.** *TARBP2*'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs784567'nin (C>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NT\_032977.9

```
GTGCGAAGCAGGCGATGGCCCAGACTTTGATCTCAATCCCATTGTAGAACTGTTTCCCCCGCATGTCCCAGAC  
ACCCTGATTGGGTGTGGCAATGGCCCGGTTCTGGGGATAGGTAGAGGGGGCGCCTAGGTGAGCCTCAGTAGAG  
TCAGGTGGGTAGGGGAGCAAAAAGCCCTGGCTATAACAACCAACCACCCCATATGCCCCGAGATGTTGTCTG  
GCCCTGACCCTGCTCACCCGGCCGCCGTACTGCAAGATGGGCGCCGGCAGCACTCGCCCTGTCACTCCGTC  
TGTCATCC
```

**Şekil 3.9.** *AGO1*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs595961'nin (A>G) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NW\_001839140.1

```
ACGAAATCCTTGCAACAAAGTTCCCCAACACAGCGCTCAAAGGAGCTGAAGGCGGGCTGAGGGCAGCCAGTGA  
TGACAGAGCCTTCTGGGCCTTTGCTGAGGCGTGAGTCGCTGACAGCAGGGCAGTTGGGCCTCAGGGATTTCG  
GCCAAAACGAGTTTTGGGATATGTGAAGGAGACAGGGGCAGAGAGAGGGTGGGCATCTGCGAACTGGGA  
AGATTGATGAGGTTGCATGGTTCATAAATAGGAAAGTGGTAACATTCATGATTATTTAAAAATTCCTTGAAA  
TACTACAG
```

**Şekil 3.10.** *AGO2*'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs4961280'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT\_032977.9

```
TCTCTGCCACTTTTCCTTGCTGTGGTCTTCTGCTCAAATATCAGCTTTTCAAAGAGGTCTTGAACACCCTAAG
ACAGCTCTGTCATCCTCTCTGCTGCCTGGCCTTTCCAGCACTCTCTTGTGTTTGGCTTTATTTTTTCTTTATGA
TACTTATACCTACCTGAAATTATATGCTCTGCTGCTCTCCACACTCTATGAGGACAAGAACCCTATTCTGT
CTTGTTCCTCTGCATCCCTAGTGGGAAAAACAATCTGACACATAGGAAATGTTCAATATTTATCAAATGAT
TGAGCTCC
```

**Şekil 3.11.** *GEMIN3'e* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs197388'nin (A>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT\_010718.16

```
GGTGGAGAGTTGGAGTGGCTGTTACTACTCGATCTCAGGGGGAGGAGACAGGCACGCGATGTTTGTGTTTGT
CAAGCACAGATTGCAAGCTCGGGGTCCAGCGTAAACCCACCATGTTTGGGCTCACACGGCGCATTTTCTGGG
GAGGACCAGCCGTCAAAAAGGTCTAGGATCGGAACGCTGCTGTCTGGAGGGGGCGGCGGCAGGAGCGCG
TTGAGGGACTGTATGTGGCGCGAGCTGGGCGGGTGGGAGTGGGAAGCCTCGCGTGGTGC GGCCGCGCTGGGTGG
TGGGCGTC
```

**Şekil 3.12.** *GEMIN4'e* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs910924'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

Primer ve prob oligonükleotid dizileri “Metabion International AG, D-82152 Martinsried/Deutschland” tarafından sentezlendi. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör Yakima Yellow veya FAM (6-carboxyfluorescein) ile işaretlenmiş floresan ışımaya yapabilen boya bağlanmışken; 3' ucunda baskılayıcı florokrom olarak Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki “quencher” (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Prob tek sarmal durumuna getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasının ardından primer uzaması

prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest kalır ve sinyal oluşur. Her döngüde üretilen ampikon miktarıyla doğru orantılı olarak sinyalin şiddetinde artış gösterir (63,64). Ayrıca sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob dizayn edilmesi sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (Tm) artırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışıldı (Çizelge 3.2-12). Her bir pdC eklenmesiyle Tm yaklaşık 2.8°C yükselmektedir. Prob dizilerinde altı çizili nükleotid polimorfik alleli belirtmektedir.

**Çizelge 3.2.** *RNASEN*'e ait 3'-UTR'de yer alan rs10719 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>RNASEN</i>	3'-UTR	C>T (G>A)	rs10719
Forward Primer	5'-CATCCAGCTAAAAACAGATCATTTAAAAC-3'		
Reverse Primer	5'-TGA CTGTTGTCTATTGAGACCTAGCCT-3'		
Prob A	5'-Yakima Yellow-CTT(pdC) <u>A</u> TT(pdC)ATTGT(pdC)TG(pdC)AGGA-BHQ-1-3'		
Prob G	5'-FAM-CTTC <u>G</u> TT(pdC)ATTGT(pdC)TG(pdC)AGGA-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.3.** *DGCR8*'e ait 3'-UTR'de yer alan rs1640299 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>DGCR8</i>	3'-UTR	G>T	rs1640299
Forward Primer	5'- TGGCCTCCTAGGGTCCCTT-3'		
Reverse Primer	5'- AAGGCAGAGAGGGCCTCAGT-3'		
Prob T	5'-Yakima Yellow-T(pdC)TTAAT <u>T</u> C(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'		
Prob G	5'-FAM-TCTTAAT <u>G</u> C(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.4.** *XPO5*'e ait 3'-UTR`de yer alan rs11077 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>XPO5</i>	3'-UTR	A>C (T>G)	rs11077
Forward Primer	5'-TCATGGAAGGGCAAGATGTGT-3'		
Reverse Primer	5'-CCATGGTACAGGCTACTGCTAAACT-3'		
Prob G	5'-Yakima Yellow-A(pdC)TAAAGA(pdC)TGCC(pdC)AG(pdC)CCT-BHQ-1-3'		
Prob T	5'-FAM-A(pdC)TAAAGA(pdC)TTCC(pdC)AG(pdC)C(pdC)T-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.5.** *RAN*'a ait 3'-UTR`de yer alan rs14035 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>RAN</i>	3'-UTR	C>T (G>A)	rs14035
Forward Primer	5'-TGCCATCCACTGATGTTCCA-3'		
Reverse Primer	5'-TGACCTGTCAGAATAAAAATGTGGTT-3'		
Prob G	5'-Yakima Yellow-C(pdC)TGTTTGAGGTT(pdC)TA(pdC)ATTAAAA(pdC)A-BHQ-		
Prob A	5'-FAM-C(pdC)TGTTTGAAGT(pdC)TA(pdC)ATTAAAA(pdC)AT-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.6.** *DICER1*'e ait 3'-UTR`de yer alan rs3742330 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>DICER1</i>	3'-UTR	A>G	rs3742330
Forward Primer	5'-TCAAGGTCTCAGTTTGGTGGCT-3'		
Reverse Primer	5'-CGAGCGCAGTTCATGCAC-3'		
Prob A	5'-Yakima Yellow-AAGGGATTAGACA(pdC)C(pdC)TAA(pdC)AGAGC-BHQ-1-3'		
Prob G	5'-FAM-AAGGGATTAGGCA(pdC)C(pdC)TAA(pdC)AGA-BHQ-1-3'		



**Çizelge 3.7.** *DICER1*'e ait 3'-UTR'de yer alan rs13078 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>DICER1</i>	3'-UTR	T>A	rs13078
Forward Primer	5'-TTAAATTCTGCCTTCAATTCATTCC-3'		
Reverse Primer	5'-CCCAATAGCTGAAACCGCTTT-3'		
Prob T	5'-Yakima Yellow	CT(pdC)A(pdC)TA <u>T</u> CAA(pdC)TTTAAGT(pdC)TT(pdC)CTT-	
Prob A	5'-FAM-CT(pdC)A(pdC)TA <u>A</u> CAA(pdC)TTTAAGT(pdC)TT(pdC)CTT-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.8.** *TARBP2*'e ait 3'-UTR'de yer alan rs784567 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>TARBP2</i>	5'-UTR	C>T (G>A)	rs784567
Forward Primer	5'-AACCTGCACCAGCTCCAGA-3'		
Reverse Primer	5'-TGGGAGGGTGGGCCTTA-3'		
Prob G	5'-Yakima Yellow-	AA(pdC)AGAGATC <u>G</u> GT(pdC)C(pdC)CTCC -BHQ-1-3'	
Prob A	5'-FAM-AAA(pdC)AGAGATC <u>A</u> GT(pdC)C(pdC)CT(pdC)C-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.9.** *AGO1*'e ait intron 10'da yer alan rs595961 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>AGO1</i>	İntron 10	A>G (T>C)	rs595961
Forward Primer	5'-CAATGGCCCGGTTCTGG-3'		
Reverse Primer	5'-AGGGGCTTTTGCTCCCCTA-3'		
Prob T	5'-Yakima Yellow-	G(pdC)C <u>T</u> AGGTGAG(pdC)CT(pdC)AGTAGAGTC-BHQ-1-3'	
Prob C	5'-FAM-G(pdC)C <u>C</u> AGGTGAG(pdC)CT(pdC)AGTA-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.10.** *AGO2*'ye ait promotor bölgesinde yer alan rs4961280 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>AGO2</i>	Promotor	A>C	rs4961280
Forward Primer	5'-CCTCTCTCTCTGCCCTGTCT-3'		
Reverse Primer	5'-CAGTTGGGCCTCAGGGATTT-3'		
Prob A	5'-Yakima Yellow-T(pdC)A(pdC)ATAT(pdC)C <u>A</u> CAAAA(pdC)T(pdC)GT-BHQ-1-3'		
Prob C	5'-FAM-TT(pdC)ACATAT(pdC)C <u>C</u> CAAAA(pdC)TCGT-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.11.** *GEMIN3*'e ait promotor bölgesinde yer alan rs197388 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>GEMIN3</i>	Promotor	T>A	rs197388
Forward Primer	5'-CCCAGCACTCTCTTGTTTTGCT-3'		
Reverse Primer	5'-AGACAGAATAGGTTCTTGTCCATAGAGT-3'		
Prob A	5'-Yakima Yellow- ATTATATGT(pdC)T <u>A</u> (pdC)TGC(pdC)TGT(pdC)T(pdC)C-		
Prob T	5'-FAM- TATATGT(pdC)T <u>T</u> (pdC)TGC(pdC)TGT(pdC)T(pdC)C-BHQ-1-3'		

**Çizelge 3.12.** *GEMIN4*'e ait promotor bölgesinde yer alan rs910924 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.

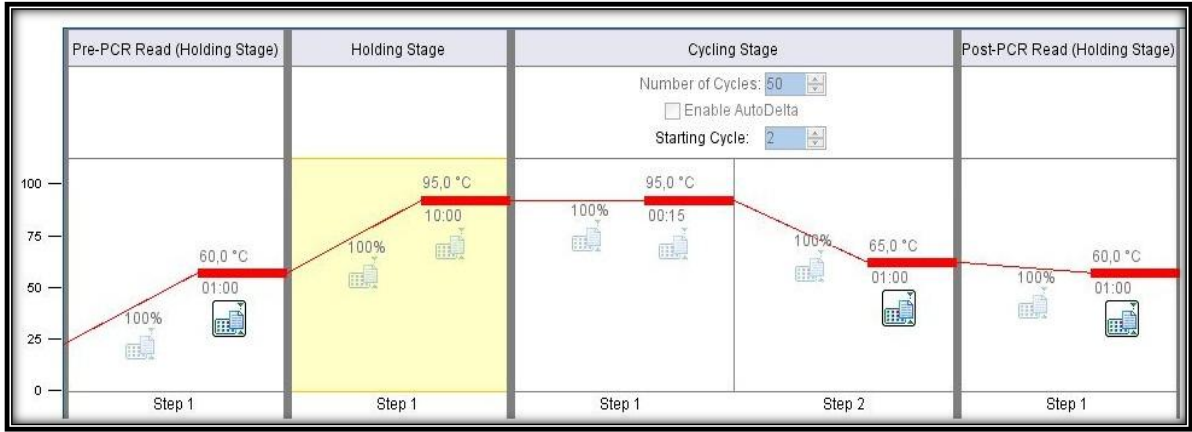
Gen	Gen Bölgesi	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>GEMIN4</i>	Promotor	C>T	rs910924
Forward Primer	5'-CACCATGTTTGGGCTCACAC-3'		
Reverse Primer	5'-CGCCACATACAGTCCCTCAA-3'		
Prob C	5'-Yakima Yellow-CAGCCGTCAAAAAG <u>C</u> GTCTAGGATC-BHQ-1-3'		
Prob T	5'-FAM-CCGTCAAAAAG <u>T</u> GTCTAGGATCCGGA-BHQ-1-3'		

### **3.6. Real Time PCR Yöntemiyle Genotipleme Çalışması**

Real Time PCR Genotipleme deneyi Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real Time PCR cihazı üzerinde gerçekleştirildi. Çalışılacak her bir allele ait reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.14). Hazırlanan bu eş zamanlı PCR reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarının her birine 22,5µl olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla her bir reaksiyon tabağının ilk kuyucuğu örnek DNA içermeyen negatif kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı. Negatif kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa genomik DNA örneğinden 2,5µl ilave edildi. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu plate için Microamp<sup>®</sup> Real Time PCR Film (Applied Biosystems) ile kuyucukların üzeri kaplanmıştır. Tabak ısı bloğuna yerleştirildikten sonra her gen için belirlenen reaksiyon şartları ile deney gerçekleştirildi (Çizelge 3.13) (Şekil 3.12). Yaklaşık 135 ile 150 dakika arasında süren deneylerin ardından multicomponent grafikleri üzerinden genotip tayini yapıldı.

**Çizelge 3.13.** Çalışılan genlere ait Real Time PCR çalışma şartları

GEN SNP rs No	PCR ön okuma	AmpliTaqGold® DNA Polimeraz aktivasyon	Denatürasyon	Bağlanma / Uzama	Döngü Sayısı	PCR sonrası okuma
RNASEN rs10719	60 °C'de 1 dakika	95 °C'de 10 dakika	95 °C'de 15 saniye	60 °C'de 1,5 dakika	50 döngü	95 °C'de 10 dakika
DGCR8 rs1640299			95 °C'de 15 saniye	60 °C'de 1,5 dakika	50 döngü	
XPO5 rs11077			95 °C'de 15 saniye	60 °C'de 1,5 dakika	50 döngü	
RAN rs14035			95 °C'de 15 saniye	60 °C'de 1,5 dakika	50 döngü	
DICER1 rs3742330			95 °C'de 15 saniye	65 °C'de 1 dakika	50 döngü	
DICER1 rs13078			95 °C'de 15 saniye	64 °C'de 1 dakika	50 döngü	
TARBP2 rs784567			95 °C'de 15 saniye	62 °C'de 1 dakika	50 döngü	
AGO1 rs595961			95 °C'de 15 saniye	65 °C'de 1 dakika	50 döngü	
AGO2 rs4961280			95 °C'de 15 saniye	58 °C'de 1 dakika	50 döngü	
GEMIN3 rs197388			95 °C'de 15 saniye	66 °C'de 1 dakika	50 döngü	
GEMIN4 rs910924			95 °C'de 15 saniye	67 °C'de 1 dakika	50 döngü	



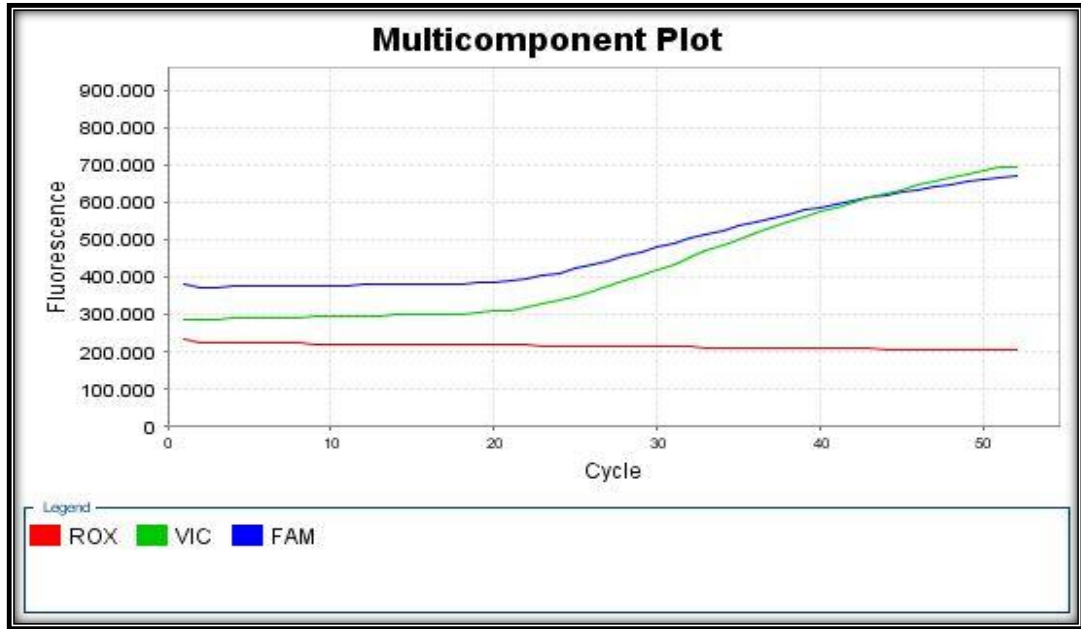
Şekil 3.12. AGO1 genine ait bir Real Time çalışma şartları örneği

Çizelge 3.14. Çalışılan genlere ait Real Time PCR karışım hacimleri (\* FAM \*\* Yakıma Yellow)

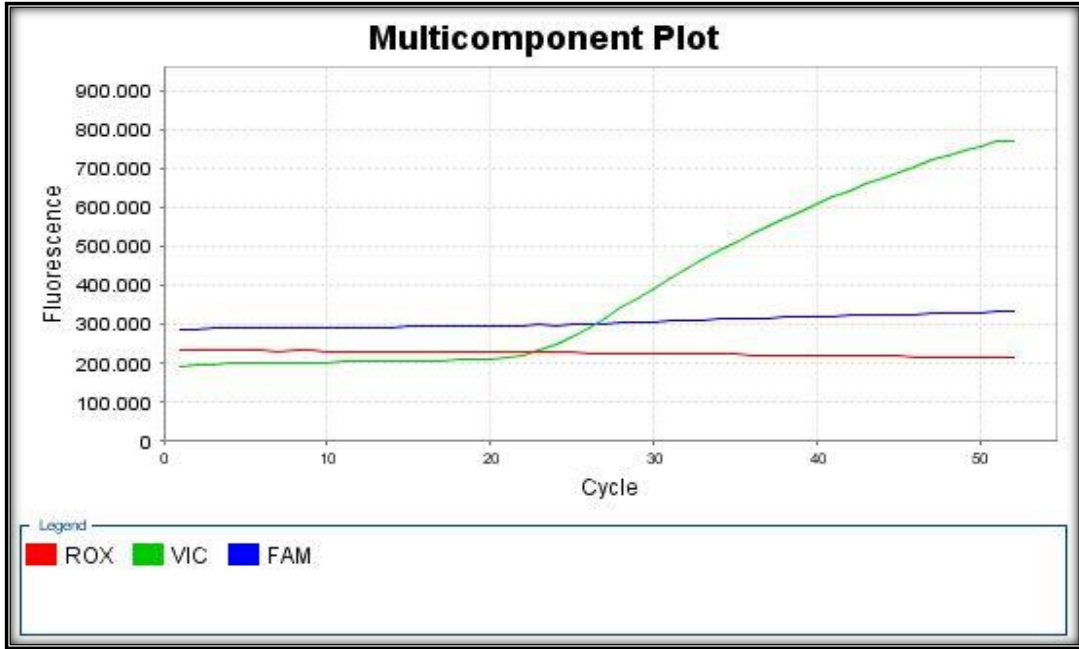
GEN SNP rs No	2X TaqMan Master Mix (µl)	Primer-F (µl)	Primer-R (µl)	Prob 1 (µl)	Prob 2 (µl)	Steril Distile Su (µl)
RNASEN rs10719	1250	250	250	155 µl Prob A(T)**	75 µl Prob G(C)*	500
DGCR8 rs1640299	1250	250	250	75 µl Prob T**	38 µl Prob G*	500
XPO5 rs11077	1250	250	250	160 µl Prob G(C)**	60 µl Prob T(A)*	500
RAN rs14035	1250	250	250	180 µl ProbG**	40 µl Prob A*	500
DICER1 rs3742330	1250	250	250	150 µl Prob A**	50 µl Prob G*	500
DICER1 rs13078	1250	250	250	100 µl Prob T**	50 µl Prob A*	500
TARBP2 rs784567	1250	250	250	200 µl ProbG(C)**	60 µl ProbA(T)*	500
AGO1 rs595961	1250	250	250	220 µl ProbT(A)**	140 µl Prob C(G)*	500
AGO2 rs4961280	1250	250	250	140 µl Prob A**	70 µl Prob C*	500
GEMIN3 rs197388	1250	250	250	140 µl Prob A**	60 µl Prob T*	500
GEMIN4 rs910924	1250	250	250	200 µl Prob C*	80 µl Prob T**	500

### 3.7. Genotipleme Deneyleri Sonrasında Genotiplerin Belirlenmesi

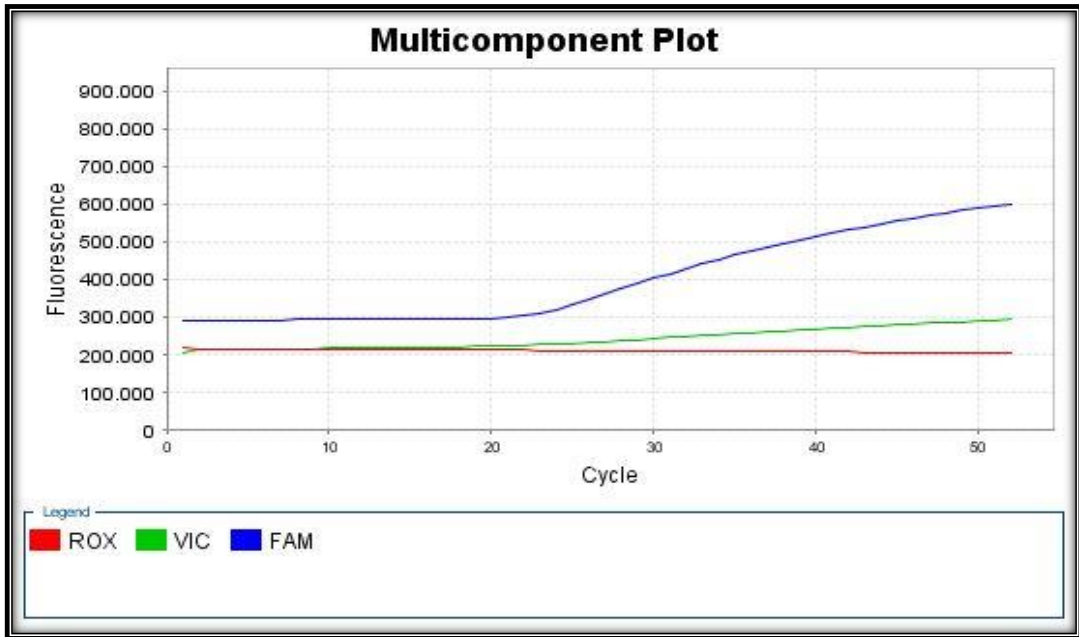
SDS 2.0.3 yazılımı ile logaritmik çizelgede gerçek zamanlı çoğalım eğrilerinin analizi yapılarak genotipler belirlendi. Eş zamanlı PCR cihazı ile elde edilen çoğalma (amplifikasyon) eğrileri ile örneklerin genotipi tayin edilmeye çalışıldı. Polimorfik allelleri taşıyan ve 5` ucunda prob bağlı DNA oligonükleotidin floresan ışığa miktarının birim PCR termal döngüsüne göre, DNA çift zincirli moleküler yapıya sahip olduğundan, her bir döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkacağından dolayı artış eğrisinin Şekil 3.13'tekine benzer bir şekilde sigmoidal olması beklenmektedir. Ancak reaksiyon sonunda ortamdaki PCR bileşenleri tükendiğinden eğri, plato evresine girer ve yatay seyrederek.



Şekil 3.13. RAN rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde heterozigot GA genotipi



Şekil 3.14. RAN rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot GG genotipi



Şekil 3.15. RAN rs14035 polimorfizmi C>T ( =G>A) için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot AA genotipi

Şekil 1.13'de mavi renkli eğri A allelini taşıyan DNA fragmanın, yeşil renkli eğri G allelini ve kırmızı renkli yatay çizgi arka plandaki ışımayı belirten ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyayı temsil etmektedir. ROX analiz sırasında floresan ışımının normalize edilebilmesi için gerekli referans ışımayı yapar. Bu çizgi arka plandaki bazal düzeydeki floresan ışımayı temsil etmektedir. ROX ışımına bağlı olarak da her deneysel kurulum kendine bir bazal seviye belirlemiş olmaktadır. G allelini taşıyan prob Yakıma Yellow'la ve A alleli ise FAM (5-Karboksifloresin) ile işaretlenmiştir. Bu durumda genotip heterozigot GA olarak değerlendirildi. Şekil 3.14'de ışıma sadece yeşil renkli çizgide ani VIC probunda olduğundan GG genotipi olarak Şekil 3.15'de sadece mavi renkli çizgide yani FAM probunda ışıma olduğundan AA genotipi olarak değerlendirildi.

### **3.8. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi**

Gruplar arasında yaş bakımından bir farklılık olup olmadığının incelenmesi amacıyla "*Independent Samples t test*" kullanılmıştır. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri "*ki-kare*" veya "*Likelihood ratio*" testleri ile incelenmiştir. Genotipler bakımından hasta ve kontrol gruplarının "*Hardy-Weinberg*" dengeleri kontrol edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış, istatistik analizlerde  $p < 0,05$  ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Vaka - Kontrol Grubuna Ait Yaş, Cinsiyet, Genotip Dağılımları ve Allel Frekansları

Çalışmamızda; vaka ve kontrol gruplarında bulunan bireylerin periferik kanlarından elde edilen DNA'lar kullanılarak, Real Time PCR teknolojisi ile olgun miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizimlerinin genotiplemesi yapıldı. Bu çalışmaya kontrol grubundan 164, vaka grubundan ise 191 birey çalışmaya dahil edildi. Çizelge 4.1'de gösterildiği üzere; kontrol grubundaki 164 bireyin 50 tanesi (% 30,5) kadın, 114 tanesi (%69,5) erkek; vaka grubundaki 191 bireyin 70 tanesi (%36,6) kadın, 121 tanesi (%63,4) ise erkektir. Kontrol ve vaka grupları arasındaki cinsiyet dağılımları ise benzerdir ( $p=0,221$ ) (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Vaka-Kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları

CİNSİYET	Kontrol Grubu n (%)	DEHB Grubu n (%)	TOPLAM n (%)	p Değeri ( $p<0,05$ )
Kadın	50 (%30,5)	70 (%36,6)	120 (%33,8)	0,221
Erkek	114 (%69,5)	121 (%63,4)	235 (%66,2)	
<b>TOPLAM</b>	<b>164 (%100,0)</b>	<b>191 (%100,0)</b>	<b>355 (%100,0)</b>	

Yaş bakımından elde edilen istatistik veriler, kontrol grubunun yaş ortalamasının 27,23 ( $\pm 9,01$ ), vaka grubunun ise yaş ortalamasının 27,84 ( $\pm 9,19$ ) olduğunu göstermiştir. Yaş bakımından vaka ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ( $p=0,525$ ) (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Vaka-Kontrol gruplarının yaş dağılımları

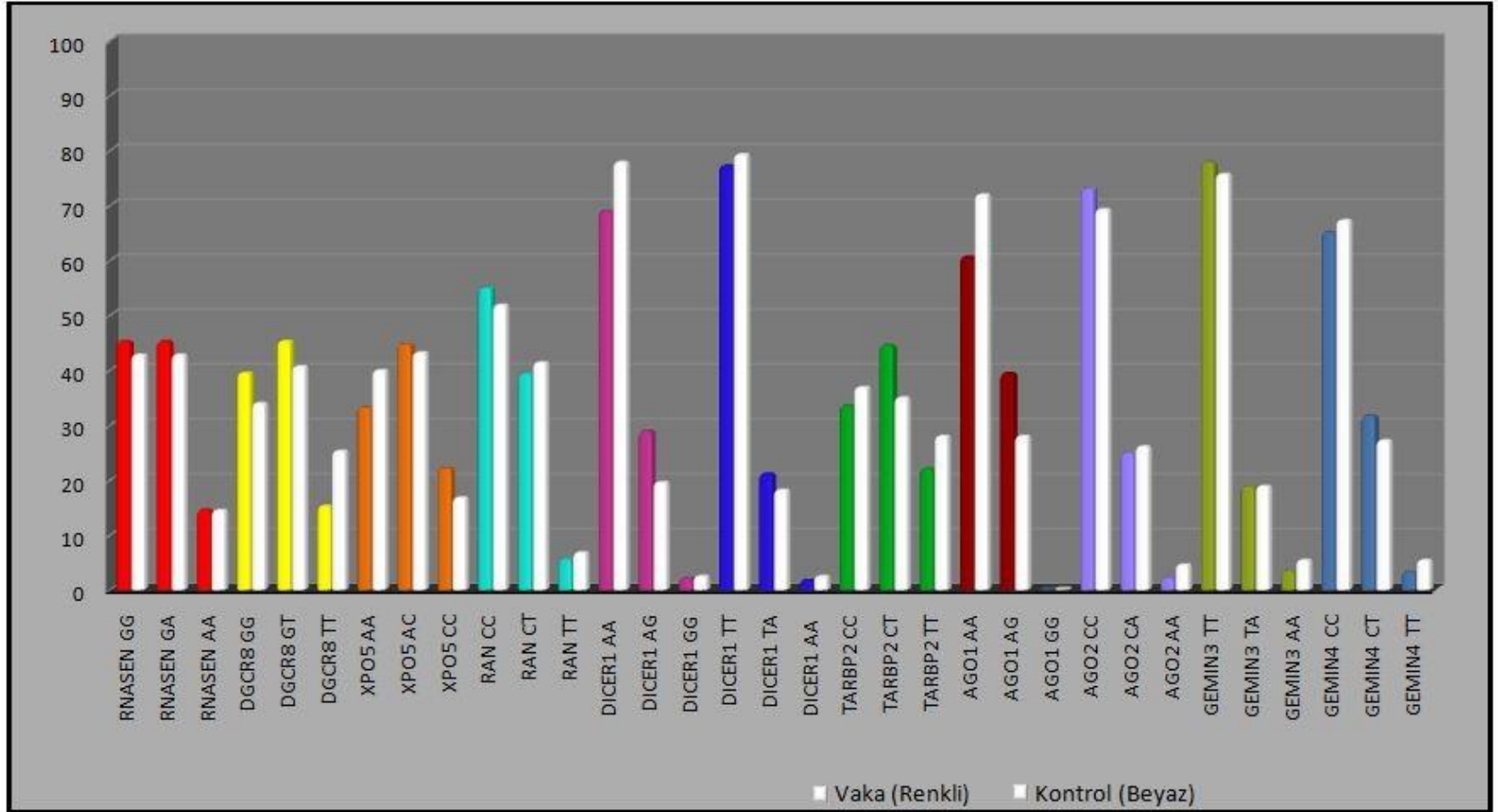
Grup	Birey Sayısı	Ortalama	Standart Sapma (ss)	p Değeri
Kontrol	164	27,2256	$\pm 9,01555$	0,525
DEHB	191	27,8429	$\pm 9,19419$	

Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* (her iki SNP), *AGO2* ve *GEMIN4* genleri bakımından iki grubun da “Hardy-Weinberg” dengesinde olduğu, genotip dağılımlarının ise benzer olduğu gözlemlendi. Bu genlerde kontrol ve vaka grupları arasında anlamlı bir fark belirlenmedi (Çizelge 4.3). *DGCR8*, *TARBP2*, *GEMIN3* ve *AGO1* genlerine ait genotiplerden; *DGCR8* ve *TARBP2*’ de sadece kontrol gruplarında (sırasıyla;  $p=0,023$  ve  $p= 0,001$ ) “Hardy-Weinberg” dengesi gözlenmedi. İstatistiksel olarak, gruplardan biri dengede, diğeri dengede değil ise ve dengede olmayan grup kontrol grubu ise karşılaştırma yapılması uygun görülmedi. *GEMIN3* genotipinde, vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de “Hardy-Weinberg” dengesi gözlenmezken (sırasıyla;  $p=0,035$  ve  $p=0,008$ ) genotip dağılımları bakımından, iki grubun birbirine benzer olduğu görüldü. Çizelge 4.3’te p değeri koyu işaretli olan *AGO1* genotipinde de, hem vaka hem de kontrol grubunun “Hardy-Weinberg” dengesinde olmadığı (sırasıyla;  $p=0,001$  ve  $p=0,039$ ) gözlenmesine rağmen; *AGO1* genotipi ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki olduğu ( $p=0,025$ ) gözlemlendi. *AGO1* geni için, OR(odds ratio)=1,673 (%95 Güven Aralığı; 1,065-2,629) ve ( $p=0,026$ )’dır. Çizelge 4.4’te vaka ve kontrol gruplarının yüzde oranlarının grafiksel olarak ifadesi verilmiştir.

Çizelge 4.3. Vaka-Kontrol gruplarının genotip dağılımları

GEN SNP rs No	Majör>Minör Allel	Genotip	DEHB Grubu	Birey sayısı (n)*	Kontrol Grubu	Birey sayısı (n)*	P Değeri (<0,05)
<b>RNASEN</b> <b>rs10719</b>	C>T	CC/CT/TT	85/85/18	188	65/65/22	152	0,378
<b>DGCR8</b> <b>rs1640299</b>	G>T	GG/GT/TT	75/86/29	190	55/66/41	162	0,062***
<b>XPO5</b> <b>rs11077</b>	A>C	AA/AC/CC	63/85/42	190	62/67/26	155	0,305
<b>RAN</b> <b>rs14035</b>	C>T	CC/CT/TT	99/71/10	180	69/55/9	133	0,822
<b>DICER1</b> <b>rs3742330</b>	A>G	AA/AG/GG	131/55/4	190	127/32/4	163	0,126
<b>DICER1</b> <b>rs13078</b>	A>T	TT/TA/AA	139/38/3	180	96/22/3	121	0,744
<b>TARBP2</b> <b>rs784567</b>	C>T	CC/CT/TT	64/85/42	191	58/55/44	157	0,175***
<b>AGO1</b> <b>rs595961</b>	A>G	AA/AG/GG	114/74/0	188	116/45/0	161	<b>0,025**</b>
<b>AGO2</b> <b>rs4961280</b>	C>A	CC/CA/AA	138/47/4	189	106/40/7	153	0,405
<b>GEMIN3</b> <b>rs197388</b>	A>T	TT/TA/AA	137/33/6	176	84/21/6	111	0,708*
<b>GEMIN4</b> <b>rs910924</b>	C>T	CC/CT/TT	121/59/6	186	99/40/8	147	0,452
* Birey sayıları (n), analizi yapılabilen genotip verilerine göre düzenlenmiştir. ** Hem vaka hem de kontrol grubu <i>Hardy-Weinberg</i> dengesinde değildir. *** Kontrol grubu <i>Hardy-Weinberg</i> dengesinde değildir.							

Çizelge 4.4. Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarının grafiksel gösterimi



Vaka ve kontrol gruplarına ait allel dağılım sonuçlarının verileri Çizelge 4.7’de grafiksel olarak, Çizelge 4.6’de ise sayısal (%) olarak ifade edilmiştir. Çizelge 4.6’de çalışılan genlere ait allel frekanslarının yanı sıra, Avrupa popülasyonlarında görülen ve “*Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)*” veritabanından elde edilen, aynı SNP referans numaralarındaki ilgili allel verilerinin yüzdeleri de gösterildi. Tabloda koyu renkle gösterilen *GEMIN4*, Avrupa popülasyonlarından çok, yine dbSNP’den elde edilen verilere göre Asya popülasyonlarıyla uyum göstermiştir.

Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımları incelendiğinde (Çizelge 4.5); *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* (her iki SNP), *TARBP2*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* genleri bakımından grupların allel dağılımlarının benzer olduğu belirlendi. Çizelge 4.6’da koyu renkli olarak gösterilen *DGCR8* rs1640299 (p=0,037) ve *AGO1* rs595961 (p=0,046) genlerinin hastalık ile anlamlı bir ilişkisi olduğu tespit edildi. *DGCR8* geninde, T alleli taşımanın G alleli taşımaya oranı bakımından oranı; OR(odds ratio)=0,726 (%95 Güven Aralığı 0,537-0,981) (p=0,037)’dir. *AGO1* geni için G alleli taşımanın, A alleli taşımaya oranı bakımından vaka/kontrol oranı; OR: 1,508 (%95 Güven Aralığı 1,006-2,261) (p=0,047)’dir. Bu sonuçlara göre; G alleli hastalarda, kontrollerden 1,5 kat daha fazla gözlenmiştir ve G allelinin varlığı, hastalığın oluşumu yönünde 1,5 kat daha etkilidir diyebiliriz.

Çizelge 4.5. Kontrol gruplarının allel frekans dağılımları

Gen	SNP referans no	Atasal Allel	Majör>Minör Allel	DEHB Grubu	Birey sayısı (n)*	Kontrol Grubu	Birey sayısı (n)*	p Değeri (<0,05)
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	rs10719	T	C>T	255 / 121	188	195 / 109	152	0,314
<i>DGCR8</i>	rs1640299	G	G>T	236 / 144	190	176 / 148	162	<b>0,037</b>
<i>XPO5</i>	rs11077	C	A>C	211 / 169	190	191 / 119	155	0,107
<i>RAN</i>	rs14035	T	C>T	269 / 91	180	193 / 73	133	0,542
<i>DICER1</i>	rs3742330	A	A>G	317 / 63	190	286 / 40	163	0,106
<i>DICER1</i>	rs13078	T	T>A	316 / 44	180	214 / 28	121	0,809
<i>TARBP2</i>	rs784567	C	C>T	213 / 169	191	171 / 143	157	0,731
<i>AGO1</i>	rs595961	G	A>G	302 / 74	188	277 / 45	161	<b>0,046</b>
<i>AGO2</i>	rs4961280	A	C>A	323 / 55	189	252 / 54	153	0,271
<i>GEMIN3</i>	rs197388	A	T>A	307 / 45	176	189 / 33	111	0,479
<i>GEMIN4</i>	rs910924	C	C>T	301 / 71	186	238 / 56	147	0,990

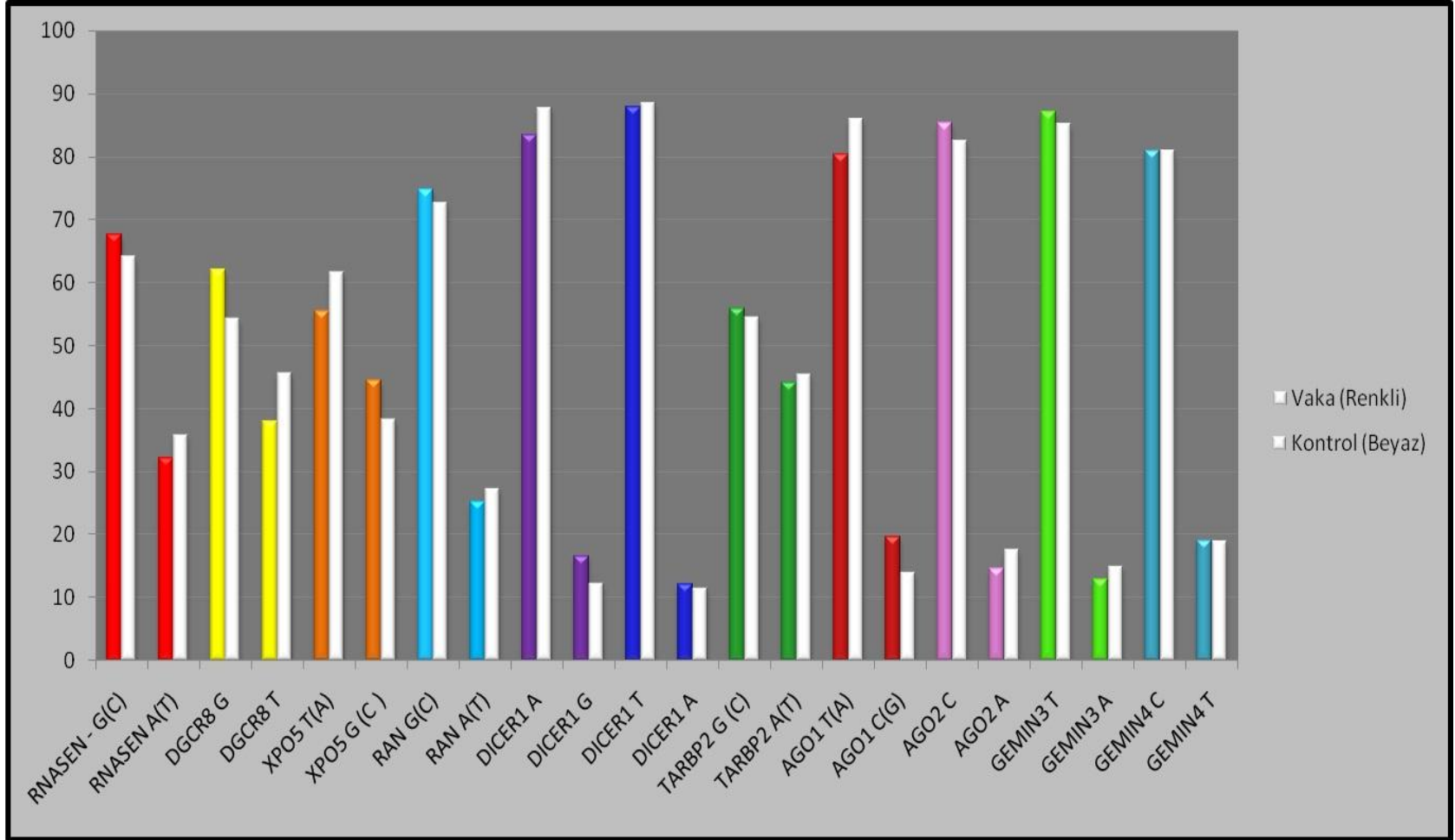
\* Birey sayıları (n), analizi yapılabilen genotip verilerine göre düzenlenmiştir.

Çizelge 4.6. Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarının yüzdesi

GEN-ALLEL	SNP REFERANS NO	VAKA GRUBU (%)	KONTROL GRUBU (%)	AVRUPA FREKANSI* (%)
RNASEN - G(C) RNASEN A(T)	rs10719	67,60 32,20	64,10 35,90	76,75 23,25
DGCR8 G DGCR8 T	rs1640299	62,10 37,90	54,30 45,70	48,75 51,25
XPO5 T(A) XPO5 G (C)	rs11077	55,50 44,50	61,60 38,40	58,30 41,70
RAN G(C) RAN A(T)	rs14035	74,70 25,30	72,60 27,40	70,40 29,60
DICER1 A DICER1 G	rs3742330	83,40 16,60	87,70 12,30	92,50 7,50
DICER1 T DICER1 A	rs13078	87,80 12,20	88,40 11,60	84,20 15,80
TARBP2 G (C) TARBP2 A(T)	rs784567	55,80 44,20	54,50 45,50	51,30 48,70
AGO1 T(A) AGO1 C(G)	rs595961	80,30 19,70	86,00 14,00	84,10 15,90
AGO2 C AGO2 A	rs4961280	85,40 14,60	82,40 17,60	87,50 12,50
GEMIN3 T GEMIN3 A	rs197388	87,20 12,80	85,10 14,90	70,80 29,20
GEMIN4 C GEMIN4 T	rs910924	80,90 19,10	81,00 19,00	<b>66,30</b> <b>33,70</b>

\* Avrupa frekansları için dbSNP (Database of single nukleotide polymorphisms) veri tabanı kullanıldı.

Çizelge 4.7. Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarının grafiksel gösterimi



## 5. TARTIŞMA

Dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu (DEHB); sıklıkla dikkat eksikliği, hiperaktivite ve dürtüsellik ile karakterize, nöropsikiyatrik bir hastalıktır. Hastalığın görülme sıklığı farklı popülasyonlar arasında değişkenlik göstermekle birlikte, yetişkinlerde prevalansının %2,5 ile %4.9 arasında olduğu tahmin edilmektedir (12). Hiperaktif davranışlar, dürtüsellik ve dikkatin toplanmasındaki yetersizlik; bireyin akademik, sosyal ve ev ortamındaki yaşam kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Hastalık için çok çeşitli tanı kriterleri bulunmaktadır; ancak bunların arasında en çok kabul göreni DSM-IV'tür. Buna rağmen; DSM-IV tanı kriteri çocukluk dönemi DEHB tanısında yeterli kabul edilse bile bu tanı kriterinin erişkin dönem DEHB'nin tanısında yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu sebeple erişkin DEHB tanısında Wender-Utah kriterlerinin kullanılması uygun görülmektedir (3).

Hastalığın etiyopatogenezi psikiyatri ve genetik alanında geniş bir çalışma imkanı sağlamaktadır. Aile, ikiz ve evlatlık çalışmalarında; yüksek derecede ifade edilen kalıtılabilirlik değeri ile, DEHB'nin etiolojisinde genetik faktörlerin önemli katkısı olduğu gösterilmiştir. Hastalığın genetik temelini altındaki mekanizmanın belirlenebilmesi amacıyla pek çok gen araştırılmıştır (27). DEHB'de incelenen genlerden en çok üzerinde durulan ve olumlu bulguların elde edildiği genler DRD4 ve DAT1 genleri olsa da, henüz bu genlerin etkisi konusunda kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Her ne kadar bu yolak üzerinde çalışılan genlerin etkili olduğu belirtilse de, DEHB'ye orta derecede etkili pek çok genin etkileşiminin neden olduğu ileri sürülmektedir (66, 67). Ayrıca, DEHB ile ilgili çalışmalarda, hastalığın multifaktöriyel olduğu ileri sürülmektedir. Hastalığın ortaya çıkmasında genetik faktörlerin yanı sıra, doğum öncesi ve doğum sonrası dönemdeki çevresel faktörlerinde etkili olabileceği öne sürülmektedir (68).

DEHB'nin ortaya çıkmasının altında yatan mekanizmanın monogenik mutasyonlarla tam olarak anlaşılammış olması, araştırmacıların hastalığın genetik temeli üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuş, genetik materyalin protein kodlayan bölgelerinden



ziyade, proteine kodlanmayan RNA (non-protein-coding RNA –ncRNA-) fonksiyonlarının etkisinin araştırılmasına yöneltmiştir.

İnsan genomunun yaklaşık %97'si gibi çok büyük bir kısmı proteine kodlanmayan bölgeler olarak bilinmekte ancak; proteinlerin ifadeleri üzerine etkilerinin olduğu/olabileceği ifade edilmektedir. ncRNA çeşitlerinden biri olan miRNA'ların da, gen ifadesinde protein translasyon inhibisyonunu ya da mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrasında önemli rol oynadıkları çok sayıda araştırmacı tarafından bilim dünyasında tartışılmaktadır (32, 56).

Araştırmayı planlarken hipotezimiz, ekspresyonel açımda beyinde çok zengin olduğu bilinen miRNA'ların biyogenezindeki polimorfizmlerin, DEHB'nin ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşüncesi üzerine kurulmuştur. Real-Time PCR sonuçları ile, belirlenen genotip ve allellerdeki polimorfizmlerin istatistiksel olarak anlamlılığı “*Ki-kare*” veya “*Likelihood ratio*” testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımları sonuçlarına göre; çalışılan genlerden DGCR8 ve AGO 1 genleri haricindeki genlerde bir anlamlılık gözlenmemiştir. Bu bulgu, AGO 1 geni için, G alleli taşımanın A alleli taşımaya kıyasla DEHB olma olasılığını 1,508 kat yükseltmiş olabileceğini düşündürmektedir. dbSNP (*Database of Single Nucleotide Polymorphisms*) verilerine göre de Avrupa'daki popülasyonda allel yüzdeleri arasında çok benzer oranlarda uyuma görülmektedir. Fakat yapmış olduğumuz çalışmada değerlendirilmeye alınan gruplardaki birey sayıları geniş bir örneklemi kapsamamaktadır. Dolayısıyla elde edilen verilerin daha yüksek sayıda bireyde tekrarlanması, verilerin anlamlılığının desteklenmesine olanak sağlayacaktır.

Çalışılan genlere ait allel frekanslarının yanı sıra, Avrupa popülasyonlarında görülen ve dbSNP veritabanından elde edilen, aynı SNP referans numaralarındaki ilgili allel verilerinin yüzdeleri de incelendi. Sonuçlarımız ile veri tabanı verileri *GEMIN4* haricinde örtüşmektedir. *GEMIN4* Avrupa popülasyonlarından çok, Asya popülasyonlarıyla uyum göstermiştir (Asya %83,1 C/ %16,9 T).

Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde, sadece *AGO1* geni istatistiksel olarak dikkat çekmektedir. Elde edilen verilere göre, *AGO1* geninde hastalarda AG genotipi taşıma oranı (%39,4), sağlıklı kontrol grubundaki AG genotipi taşıma

oranından (%28,0) daha fazladır. Bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p=0,025$ ). Buna göre; DEHB vaka grubunda AG genotipine sahip olanların, AA genotipine sahip olanlara oranı; sağlıklı grupta AG genotipine sahip olmanın AA genotipine sahip olmaya oranından 1,673 kat daha fazladır. Allel verilerinde olduğu gibi *AGO1* geni için genotipte elde edilen bu istatistiksel anlamlılığın, AG genotipinde olmanın, AA genotipinde olmaya göre hastalık oluşturma riskini arttırmış olabileceği vurgulanabilir. Real-Time PCR deneyi sonucunda *AGO1* genine ait sonuçların değerlendirilmesi sonrasında ne kontrol ne de vaka grubunda GG genotipinde hiçbir birey gözlenmemiştir. dbSNP verileri incelendiğinde Avrupa populasyonlarında GG genotipinin %1' in altında (%0,90) olduğu gözlenmiştir. Literatürde miRNA genlerinin evrimsel olarak iyi korunmuş küçük ncRNA oldukları savunulmaktadır (22). Buna göre, *AGO1* geninde GG genotipine sahip olmamanın Argonaute (*AGO*) proteinlerinin, olgun miRNA biyogenezindeki işlevsel rolünün önemliliğinden dolayı, iyi korunuyor olması ile ilişkili olduğu varsayılabilir.

*AGO* proteini miRNA'nın tek zinciri ile birlikte RISC kompleksinin çekirdek yapısını oluşturur. Gen inaktivasyon çalışmaları Argonaute proteinlerinin embriyonik gelişimde, hücre farklılaşmasında, kök hücre devamlılığında önemli role sahip olduklarını ileri sürmüştür (69). Memeli Argonaute ailesi, henüz birkaç yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen; memeli Ago2'nin kesici endonükleaz aktiviteleri gibi hücresel etkileri iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Bu nedenle Ago proteinlerinin çok farklı RNA susturma yollarında önemli rolü olduğu belirtilmektedir (70). X-Ray kristallografi çalışmaları, insanlarda Ago proteinlerinin fonksiyonel olarak önemli N, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) (Dicer enzimiyle paylaşılmakta), PIWI (P-element induced wimpy testis) ve bunların arasında bulunan MID (Middle) domainleri olmak üzere 4 alt biriminin olduğunu ortaya koymuştur. MID domaini oldukça temel bir cep içerir ve spesifik bir şekilde küçük RNA'ların karakteristik 5' fosfat kısmına bağlanır. Bu nedenle küçük RNA'lar Argonaute proteinler üzerine sağlam bir şekilde bağlanır. PAZ domaini ise, 3' terminal bağlanma aktivitesine sahiptir ve bu özellik rehber zincire bağlanmada kullanılmaktadır. Mutasyon temelli çalışmalar, insan *AGO2* proteininde DDH (Aspartat 597, Aspartat 669 ve Histidin 807) olarak belirtilen 3'lü katalitik bir bölge tanımlamışlardır. İlginç bir şekilde, insan *AGO3* proteininde katalitikliğin inaktif olmasına rağmen DDH katalitik üçlü bölgesinin korunduğu

gözenmiştir. Bu, translasyon sonrası modifikasyonlar veya spesifik proteinler gibi ek faktörlerle, Ago proteinlerin aktivitelerinin değiştirilebileceğine işaret etmektedir (70, 71).

Ago yüklenmesi, büyük ölçüde DICER ve onun yardımcı proteinlerine bağımlıdır. Dicer/Ago/miRNA kompleksi Gemin 3, Gemin 4 ve diğer proteinlerle ilişkilidir. Ago ve rehber zincirin birlikte oluşturduğu yapı mi-RISC olarak adlandırılır. miRNA, belirli mRNA'ların düzenlenmesi ve tanınmasında mi-RISC için adaptör görevi görür. miRNA-mRNA komplementerliğinin seviyesi, düzenlenme mekanizmalarında kilit faktördür. Mükemmel eşleşme Ago katalizliğinde mRNA zincirinin yıkımına, merkezde mükemmel olmayan eşleşme ise mRNA translasyonunun düzenlenmesine yol açmaktadır (71).

AGO1, kromozomal olarak 1p34.3'te lokalizedir ve AGO1'de meydana gelen bir SNP'nin DEHB ile ilişkisi henüz belirtilmiş değildir. Ancak; dbGaP (Genotip ve fenotip veri tabanı) verileri dikkate alındığında, 1p35.1'de, AGO1'e çok yakın yerleşim gösteren CSMD2 geninin (CUB and Sushi multiple domains 2), DEHB üzerinde etkili olduğu söz konusudur. CSMD2'nin beyinde, beyin korteksinde, siyah cisimde (substantia nigra) ve beyincikte gelişimsel olarak ekspresyonları düzenleyen; ayrıca, nörogenesis ve hücre adhezyonunda potansiyel rolü olan bir proteindir. DEHB ile anlamlı ilişki bulduğumuz SNP'lerin komşuluğundaki bu lokusların beraber aynı haplotip üzerinde aktarılması da hastalık riskinde değişime neden olmuş olabilir (72).

*DGCR8* rs1640299 genotipinde anlamlı bir fark bulunamamış olmasına rağmen allel dağılımları arasında koruyucu olma bakımından anlamlılık tespit edilmiştir. *DGCR8*, olgun miRNA oluşum yolağında primer transkriptlerin oluşturulmasındaki ilk aşamalar için gereklidir. Yakın tarihli bir çalışmada, *DGCR8* delesyonunun, kardiyomiyopatiye yol açtığı ve prematüre ölüme neden olduğu, bu genin kardiyovasküler fonksiyonda merkezi rol oynadığı bildirilmiştir (73). Kromozomal lokalizasyon açısından *DGCR*'nin, 22 nolu kromozom üzerinde yer aldığı görülmektedir. 22q11 delesyonu olan bireyler incelendiğinde, şizofreni ve diğer nöropsikiyatrik hastalıkların insidansında artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, *DGCR*'nin insan nöropsikiyatrik hastalıklarında önemli olduğunu ifade etmektedir (74). Ancak; *DGCR8* ile DEHB arasındaki ilişkiyi açıklayan herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Eksportin-5 (XPO5) proteini, pre-miRNA spesifik taşıyıcısıdır. 3' UTR bölgesinde yer alan XPO5 SNP'lerinin proteinlerin ekspresyon seviyelerini etkileme ihtimali olasıdır. Boni ve ark. (2010) metastatik kanser hastaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, XPO5'in SNP'sinin hastalık kontrol oranını (DCR) değiştirdiğini saptamış, "AA" ve "AC" genotipli bireylerde, "CC" polimorfik varyantlara oranla hastalık kontrol oranının artmış olduğunu belirtmişler (75). Başka bir çalışmaya göre; XPO5 bronşiolalveolar karsinom, evre 1 akciğer kanserinde az ifade edilirken, prostat kanserinde aşırı miktarda ifade edilmektedir. Ryan ve ark. (2010)'nın kanser araştırmalarıyla ilgili yaptıkları bir çalışmada RAN SNP, rs14035'te meydana gelen polimorfizmin, PolymiRTS (mikroRNA hedef bölgesindeki polimorfizm) veritabanına göre; atasal allelin değişmesi miR-575'in bağlanma bölgesini değiştirmekte ve sonrasında bu derive allel miR-182 için bir bağlanma bölgesi oluşturmaktadır (76). Bir diğer kanser çalışmasında araştırmacılar, pre-mir631'de meydana gelen polimorfizmin özofajiyal kanser riskini önemli oranda arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada miRNA biyogenezinde rol oynayan XPO5 ve RAN genlerinin özofajiyal kanser riskini önemli oranda arttırdığı ifade edilmiştir. RNA interferans kullanılarak XPO5 ekspresyonunun susturulması miRNA seviyesinin azalmasına neden olmakta ve bu durumdaki sonuçlar miRNA ekspresyonunu azaltması ve tümörögenезisi artırması bakımından evrensel sonuçlarla benzeşmektedir (77). Çalışmalarımızda, XPO5 ve RAN genlerinin allel ve genotip verilerinde bir anlamlılık gözlenmemiş olmasına rağmen, olgun miRNA oluşumunda işlevlerinin önemliliği dikkati çekmektedir.

Dicer1 ve transaktivasyon duyarlı RNA- bağlayıcı protein (TRBP) pre-miRNA sürecinde rol oynamaktadır. Son çalışmalardan birinde, Dicer1'in tümör baskılayıcı etkisi bakımından tek başına yetersiz olduğu (*haploinsufficient*) ifade edildi. Nitekim Dicer 1 mRNA'sının düşük seviyelere inmesinin, kanserde sağ kalımda azalma üzerine ilişkili olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, Dicer 1'in 3' UTR bölgesi rs3742330'un lökoplaki ve/veya eritroplakili bireylerde premalign oral lezyonlardaki artış riski ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Melo ve ark. (2009); TRBP'de 2 çerçeve kayması mutasyonunun prematüre stop kodonuna tanıtılmasını belirlediler ve bunun, TRBP'nin ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu ifade ettiler. Fonksiyonlarından biri, Dicer1'in stabilitesini düzenlemek olan TRBP'nin bu mutasyon sonucunda; Dicer ekspresyonunun azalttığı, düşük miktarda

miRNA üretimine sebep olduğu, bu nedenle yüksek hücreli proliferasyonu ile ilişkili olduğu gözlemlendi (76). Çalışmamızda ise, Dicer ve TRBP'nin DEHB ile ilişki olduğu ifade edilebilecek istatistiksel anlamlılığa sahip olmadığı gözlemlendi.

Horikawa ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada renal hücreli karsinomla miR SNP arasında ilişki olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında *GEMIN 4* (rs7813 ve rs2740348) ve *GEMIN 3* (rs197412)'e ait sinonim olmayan 3 SNP'deki değişimin renal hücreli karsinom riskini önemli oranda azalttığını vurgulamışlardır (78). Ancak; çalışmamızda GEMIN proteinleri ile hiperaktivite arasında bir bağlantı kurulamamıştır.

Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız örneklem genişliğinin büyük olmamasından dolayı allel frekansı ve genotip dağılımları ile hastalık durumu arasındaki ilişki popülasyonu yansıtmayabilir. Bu nedenle anlamlı bulduğumuz ilişkilerin doğrulanması açısından bu araştırmadan bağımsız daha geniş bir örneklem grubunda bulguların tekrarlanması gereklidir. Ayrıca miRNA biyogenez mekanizmasında rol oynayan genlerin; ekspresyon çalışmalarıyla, değerlendirilmesi ya da knock-out fare deneyleriyle ekspresyonlarının araştırılması ile ilgili çalışmalar yapılabilir.

Bazı kanser türleri ile miRNA biyogenez yolağı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Ancak; miRNA biyogenezinde rol oynayan gen polimorfizmelerinin DEHB ile olan ilişkisi hakkında herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu bakımdan, araştırmamızın orijinal olduğu düşüncesindeyiz.

Bu araştırma, miRNA'ların biyogenezinde yer alan genlerin DEHB etiyolojisindeki görevlerini açıklamada yol gösterici olacaktır. DEHB mendeliyen kalıtım etkisiyle ortaya çıkan bir hastalık olmadığından ve multifaktöriyel olarak ortaya çıkmasından dolayı hastalık mekanizması anlaşılamamaktadır. Bu sebeple bu ve diğer nöropsikiyatrik hastalıkların alternatif genetik çalışmalar ile araştırılması etiyolojide yer alan yolların keşfedilmesi konusunda yardımcı olacaktır. Dolayısıyla elde edilen veriler hastalıkların tanı ve tedavi süreçlerine de önemli katkı sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda kontrol grubu 164, vaka grubu ise 191 bireyden oluşmaktadır. Yaş bakımından elde edilen istatistik veriler, kontrol grubunun yaş ortalamasının 27,23 ( $\pm 9,01$ ), vaka grubunun yaş ortalamasının ise 27,84 ( $\pm 9,19$ ) olduğunu göstermiştir. Yaş bakımından hasta ve kontrol grupları arasında bir fark olmadığı tespit edildi ( $p=0,525$ ).

Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* (her iki SNP), *AGO2* ve *GEMIN4* genleri bakımından iki grubun da *Hardy-Weinberg* dengesinde olduğu, genotip dağılımlarının ise benzer olduğu gözlemlendi. Bu genlerde kontrol ve vaka grupları arasında anlamlı bir fark belirlenmedi.

*DGCR8*, *TARBP2*, *GEMIN3* ve *AGO1* genlerine ait genotiplerden; *DGCR8* ve *TARBP2*' de sadece kontrol gruplarında (sırasıyla;  $p=0,023$  ve  $p=0,001$ ) *Hardy-Weinberg* dengesi gözlenmedi. *GEMIN3* genotipinde vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de *Hardy-Weinberg* dengesi gözlenmezken (sırasıyla;  $p=0,035$  ve  $p=0,008$ ) genotip dağılımları bakımından iki grubun birbirine benzer olduğu görüldü.

*AGO1* genotipinde de hem vaka hem de kontrol grubunun *Hardy-Weinberg* dengesinde olmadığı (sırasıyla;  $p=0,001$  ve  $p=0,039$ ) gözlenmiş olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p=0,025$ ). *AGO1* geninde OR(odds ratio)=1,673 (%95 Güven Aralığı; 1,065-2,629), ( $p=0,026$ )'dır.

Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarında *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* (her iki SNP), *TARBP2*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* genleri bakımından grupların allel dağılımlarının benzer olduğu belirlendi. *DGCR8* rs1640299 ( $p=0,037$ ) ve *AGO1* rs595961 ( $p=0,046$ ) genlerinin hastalık ile anlamlı bir ilişkisi olduğu tespit edildi.

*DGCR8* geninde T alleli taşımanın G alleli taşımaya oranı bakımından oranı; OR(odds ratio)=0,726 (%95 Güven Aralığı 0,537-0,981) ( $p=0,037$ )'dir.

*AGO1* alleli için G alleli taşımanın A alleli taşımaya oranı bakımından vaka/kontrol oranı; OR: 1,508 (%95 Güven Aralığı 1,006-2,261) ( $p=0,047$ )'dir.

DEHB etiyojisi mendeliyen kalıtıma uymamakta ve multifaktöriyel olarak ifade edilmektedir. Bu sebeple DEHB etiyojenezinin altında yatan faktörlerin alternatif yollarla değerlendirilmesi gereklidir. Bu yöntemlerden biri olarak miRNA oluşum

yolağında anlamlı bulunan genlerin, transgenik memeliler üzerindeki etkisi araştırılabilir. Anlamlı sonuçlar elde edilebilirse hastalığın tanı ve tedavisinde yeni gelişmelere olanak sağlanabilir.

Son yıllarda genom üzerinde proteine kodlanmayan RNA (non-protein-coding RNA –ncRNA-) olarak adlandırılan bir grubun önemli işlevlerinin olduğu belirtilmiştir. ncRNA çeşitlerinden biri olan miRNA'lara alternatif olabilecek diğer ncRNA çeşitleri kullanılarak DEHB etiyolojisi başka açılardan da değerlendirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Akgün GM, Tufan AE, Yurteri N, Ayten Erdoğan A.** Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun genetik boyutu. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry*, **2011**; 3(1):15-48
2. **Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Attention Deficit/Hyperactivity Disorder.** Clinical Practice Guideline: Diagnosis and Evaluation of the Child With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics*, **2000**; 105: 1158-1170.
3. **Wender P, Wolf L, Wasserstem J.** Adults with ADHD. *Annals New York Academy of Sciences*, **2001**; 931(1): 1-16.
4. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition. *American Psychiatric Association*, **1994**; 85-96.
5. **Arime Y, Kubo Y, Sora I.** Animal models of attention deficit/ hyperactivity disorder. *Biol. Pharm. Bull*, **2011**; 34(9):1373—1376.
6. **Pauls DL.** The genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, **2005**; 57: 1310–1312.
7. **Kovács-Nagy R, Hu J, Rónai Z, Sasvári-Székely M.** SNAP-25: A Novel Candidate Gene In Psychiatric Genetics. *Neuropsychopharmacol Hung.* **2009**; 11(2): 89-94.
8. **Spencer TJ, Biederman J, Wilens TE, Faraone SV.** Overview and neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*, **2002**; 63 (12): 3-9.
9. **Spencer M A, Liang H, Li W-H.** Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *PNAS*, **2007**; 104 (9): 3300–3305.
10. **Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch ST, Elton TS, Hatzigeorgiou AG, Antonarakis SE.** Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: A mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*, **2007**; 81: 405-413.
11. **Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen BJ, Van Den Berg A.** MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *RNA*, **2010**; 16:1087–1095.



12. **Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CHD, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S, Haavik J, Lesch K-P, Cormand B, Reif A.** The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Molecular Psychiatry*, **2012**; 17: 960–987.
13. **Barkley RA.** *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder*. 3<sup>rd</sup>. Ed., New York London: The Guilford Press, **2006**: 3-297.
14. **Bell AS.** A critical review of ADHD diagnostic criteria: What to address in the DSM-V. *Journal of Attention Disorders*, **2011**; 15 (1): 3-10.
15. **Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E, Doyle AE.** Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: An overview. *Biol Psychiatry*, **2000**; 48: 9–20.
16. **Durukan İ, Erdem M, Türkbay T, Cöngöloğlu MA.** Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu olan çocukların klinik belirtilerinin annelerinin öfke düzeyleri ve öfke ifade tarzları ile ilişkisi. *Gülhane Tıp Dergisi*, **2009**; 51: 101-104.
17. **Bonazza S, Scaglione C, Poppi M, Rizzo G.** Did Goethe describe attention deficit hyperactivity disorder? *Eur Neurol*, **2011**; 65: 70–71.
18. **Lange KW, Reichl S, Lange KM, Tucha L, Tucha O.** The history of attention deficit hyperactivity disorder. *ADHD Atten Def Hyp Disord*, **2010**; 2:241–255.
19. **Selek S.** Erişkin dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu hastalarında oksidatif metabolizmanın değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep, **2007**.
20. **Sharp SI, McQuillin A, Gurling HMD.** Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropharmacology*, **2009**; 57: 590–600.
21. **Marchant BK, Reimherr FW, Robison RJ, Olsen JL, Kondo DG.** Methylphenidate transdermal system in adult ADHD and impact on emotional and oppositional symptoms. *Journal of Attention Disorders*, **2011**; 15(4): 295–304.
22. **Antshel KM, Hargrave TM, Simonescu M, Kaul P, Hendricks K, Faraone SV.** Advances in understanding and treating ADHD. *BMC Medicine*, **2011**; 9:72.
23. **Biederman J.** Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. *Biol Psychiatry*, **2005**; 57: 1215–1220.

24. **Rowland AS, Lesesne CA, Abramowitz AJ.** The epidemiology of attention-deficit/ hyperactivity disorder (ADHD): A public health view. *MRDD Research Reviews*, **2002**; 8:162–170.
25. **Berger I.** Diagnosis of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Much Ado about Something. *IMAJ*, **2011**; 13: 571–574.
26. **Duran Ş.** Psikiyatri polikliniğine başvuran hastalarda erişkin dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu sıklığı ve eş tanı durumları. Psikiyatri Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi Psikiyatri Kliniği, İstanbul, **2006**.
27. **Curatolo P, D'Agati E, Moavero R.** The neurobiological basis of ADHD. *Italian Journal of Pediatrics*, **2010**; 36:79.
28. **Hess EJ, Collins KA, Wilson MC.** Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. *The Journal of Neuroscience*, **1996**; 76(9): 3104-3111.
29. National Institutes of Health. Attention Deficit Hyperactivity Disorder. Fact Sheet, **2009**; 1-2.
30. **Castellanos FX, Tannock R.** Neuroscience of attention-deficit/ hyperactivity disorder: The search for endophenotypes. *Nature Neuroscience*; **2012**; 3: 617-628.
31. **Waldman ID, Gizer IR.** The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clinical Psychology Review*, **2006**; 26 :396–432.
32. **Lin SL, Miller JD, Ying SY.** Intronic MicroRNA (miRNA). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2006**; 2006: 1–13.
33. **Salta E, Strooper BD.** Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*, **2012**; 11: 189–200.
34. **Sugito N, Ishiguro H, Kuwabara Y.** RNA SEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res*, **2006**; 12: 7322-7328.

35. **Wang Z.** MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem*, **2010**; 1(4): 41-54.
36. **García-Giménez JL, Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mena S, Ivars D, Gomez Cabrera MC, Viña J, Pallardó FV.** Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, **2012**; 413(19–20):1576–1582.
37. miRBase Blog. <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>. Erişim tarihi: 26/12/2012
38. **Wanet A, Tachenay A, Arnould T, Renard P.** miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Research*, **2012**; 40(11): 4742–4753.
39. **Bui TV, Mendell JT.** Myc: Maestro of MicroRNAs. *Genes Cancer*, **2010**; 1(6): 568–575.
40. **Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV.** MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Derg / Dicle Med J*, **2011**; 38 (1): 113-120.
41. **Junn E, Mouradian MM.** MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, **2012**; 133(2): 142-50.
42. **MacRa JI, Doudna JA.** Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, **2007**; 17:138–145.
43. **Pasquinelli AE.** MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, **2012**; 12: 271-282.
44. **Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, Lin J, Habuchi T, Wu X.** Single nucleotide polymorphisms of microRNA-machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **2008**; 14(23): 7956–7962.
45. **Juvvuna PK, Khandelvia P, Lee LM, Makeyev EV.** Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Research*, **2012**; 40 (14): 6808–6820.

46. **Broderick JA, Zamore PD.** MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*, **2011**; 18: 1104–1110.
47. **Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA.** Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, **2007**; 318 (5858): 1931-1934.
48. **Mallick B, Ghosh Z.** A complex crosstalk between polymorphic microRNA target sites and AD prognosis. *RNA Biology*, **2011**; 8(4): 665-673.
49. **Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandre's E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda Z.** Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *The Pharmacogenomics Journal*, **2011**; 11: 429–436.
50. **Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A.** microRNAs in diseases: From candidate to modifier genes. *Clin Genet*, **2010**; 77: 306–313.
51. **Ying SY.** *Current Perspectives in microRNAs (miRNA)*. 1<sup>st</sup> ed., Los Angeles: Springer Science + Business Media B.V, **2008**.
52. **Ha TY.** microRNAs in human diseases: From autoimmune diseases to skin, psychiatric and neurodegenerative diseases. *Immune Network*, **2011**;11(5): 227-244.
53. **Wu L, Zhao Q, Zhu X, Peng M, Jia C, Wu W, Zheng J, Wu XZ.** A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathology*, **2010**; 20: 1042–1054.
54. **Motti D, Bixby JL, Lemmon VP.** MicroRNAs and neuronal development. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, **2012**; 17(6): 347-352.
55. **Esteller M.** Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, **2011**; 12: 861-874.
56. **Wei F, Yue F.** MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. *Sci China Life Sci*, **2011**; 54: 1103–1112.

57. **Gascon E, Gao FB.** Cause or effect: misregulation of microRNA pathways in neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience Neurogenomics*, **2012**; 6: 48.
58. **Junn E, Mouradian MM.** MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, **2012**; 133(2):142-50.
59. **Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K.** MicroRNAs and multiple sclerosis. *Autoimmune Diseases*, 2011.
60. **Nelson PT, Hatzigerorgiou AG, Mourelatos Z.** miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA*, **2004**; 10: 387–394.
61. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **1988**; 16(3): 1215.
62. **Yang H, Dinney CP, Ye Y.** Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*, **2008**; 68: 2530-2537.
63. **You Y, Tataurov AV, Owczarzy R.** Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence. *Biopolymers*, **2011**; 95(7): 472-486.
64. **Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** Oligonukleotides with fluorescent dyes at ends provide a quenched probe system useful for detecting pcr product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.*, **1995**; 4: 357-362.
65. **Tuğlu C,Şahin ÖÖ.** Erişkin dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu: Nörobijoloji, tanı sorunları ve klinik özellikler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar Current Approaches Psychiatry*, **2010**; 2(1): 75-116.
66. **Güleç G,Yenilmez Ç, Ay F.** Bir Anadolu şehrinde psikiyatri kliniğine başvuran hastaların hastalık açıklama ve çare arama davranışları. *Klinik Psikiyatri*, **2011**; 14: 131-142.
67. **Konuk BY, Taner YI, Baltacı V.** Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu ve Genetik. *Türkiye'de Psikiyatri*, **2009**; 11(2): 80-84.

68. **Thapar A, Cooper M, Eyre O, Langley K.** Practitioner review: What have we learnt about the causes of ADHD? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, (Baskıda).
69. **Kanellopoulou C, Monticelli S.** A role for microRNAs in the development of the immune system and in the pathogenesis of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **2008**; 18: 79–88.
70. **Peters L, Meister G.** Argonaute proteins: Mediators of RNA silencing. *Molecular Cell*, **2007**; 26: 611-623.
71. **Carthew RW, Sontheimer EJ.** Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **2009**; 136(4): 642–655.
72. **Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Röser C, Nguyen TT, Craig DW, Romanos J, Heine M, Meyer J, Freitag C, Warnke A, Romanos M, Schafer H, Walitza S, Reif A, Stephan DA, Jacob C.** Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm*, **2008**; 115:1573–1585.
73. **Wilker EH, Baccarelli A, Suh H, Vokonas P, Wright RO, Schwartz J.** Black carbon exposures, blood pressure, and interactions with single nucleotide polymorphisms in microRNA processing genes. *Environmental Health Perspectives*, **2010**; 118 (7): 943-948.
74. **Kimber WL, Hsieh P, Hirotsume S, Yuva-Paylor L, Sutherland HF, Chen A, Ruiz-Lozano P, Hoogstraten-Miller SL, Chien KR, Paylor R, Scambler PJ, Wynshaw-Boris A.** Deletion of 150kb in the minimal Digeorge/velocardiofacial syndrome critical region in Mouse. *Human Molecular Genetics*, **1999**; 8(12): 2229-2237.
75. **Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandres E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda E.** Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *The Pharmacogenomics Journal*, **2011**; 11, 429–436.
76. **Ryan BM, Robles AI, Harris CC.** Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, **2010**; 10(6): 389–402.
77. **Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, Wu X.** Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)*, **2008**; 1(6): 460–469.
78. **Horikawa Y, Wood CG, Yang H.** Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **2008**; 14(23): 7956-7962.

## ÖZGEÇMİŞ

02.11.1985 yılında Suudi Arabistan'ın Tebuk kentinde doğdu. İlkokul eğitimini Ataker İlkokulunda gördü. Orta okulu Ali Sayar İlköğretim okulunda, Lise eğitimini Antakya 23 Temmuz Merkez Lisesinde tamamladı. 2002 yılında liseden mezun oldu.

2009 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yılın Güz döneminde Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2011 yılı Eylül ayında aynı bölümde Araştırma Görevlisi kadrosuna alındı. Halen Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa devam etmektedir.