

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

**MİKRORNA OLUŞUM YOLAĞINDA YER ALAN GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ALKOL BAĞIMLILIĞI RİSKİ
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin GEDİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

MERSİN – 2012

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

MİKRO RNA OLUŞUM YOLAĞINDA YER ALAN GEN POLİMORFİZMLERİNİN ALKOL BAĞIMLILIĞI RİSKİ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin GEDİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBEM TM (HG)

2010-5 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

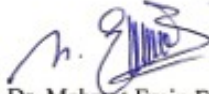
Tez No: 215

MERSİN – 2012

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "MikroRNA Oluşum Yoluğında Yer Alan Gen Polimorfizmlerinin Alkol Bağımlılığı Riski Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 06/06/2012



Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Yasemin KAÇAR

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 20.06.2012 tarih ve 2012/183 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince eleştirel ve analitik düşünme açısından bana büyük katkıları olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'ın hatalarımızda pozitif eleştirisini açıkça belirttiğini, çalışmalarımızda bizi cesaretlendirdiğini, bilgi ve deneyimini bizden esirgemediğini ve bundan sonraki akademik hayatımızda bıraktığı etkilerin büyük olacağını belirtmek istiyorum ve kendisine teşekkür ediyorum.

Denizli AMATEM'de alkol bağımlısı tanısı almış bireylerden kan örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmalarımıza destek veren Pamukkale Üniversitesi Psikiyatri Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Hasan HERKEN ve Doç. Dr. Cem ŞENGÜL'e teşekkür ederim.

Deney aşamasının her anında yanımızda olan, bilgilerini ve gözlemlerini paylaşan ve hiçbir karşılık beklemeden yardım eden laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma tümüne teşekkür ederim.

Genotip ve allel dağılımlarının istatistiksel analizlerinin yapılmasında Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca birçok ebeveyninden çok daha büyük fedakarlık yapan ve söz yerindeyse yemeden yediren, giymeden giydiren anneme ve babama teşekkür ediyorum ve her ikisinin de ellerinden öpüyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1 Alkol Bağımlılığı.....	4
2.1.1. Alkol Bağımlılığının Moleküler Mekanizması ve Bu Mekanizma İçinde Öne Çıkan Gen Polimorfizmleri.....	5
2.1.2. Alkol Bağımlılığı Hem Genetik Hem de Çevresel Faktörlerin Etkisiyle Ortaya Çıkmaktadır.....	10
2.1.3. Alkol Bağımlılığının Genom-Boyu İlişkilendirme Çalışmaları.....	10
2.2 miRNA: Posttranskripsiyonel Gen İfadesini Düzenler.....	11
2.2.1. Klasik miRNA Oluşum Yolağı ve Bu Yolakta Yer Alan Bileşenler.....	12
2.2.2. Merkezi Sinir Sistemindeki mRNA Hedeflerinin miRNA’lar Tarafından Düzenlenmesi.....	14
2.2.3. miRNA ile İlişkili Gen Polimorfizmleri.....	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18

3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler ve Kimyasallar.....	18
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Labotratuvar Ekipmanları.....	18
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	19
3.2. Vaka-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması.....	20
3.3. Tuz ile Çöktürme Yöntemiyle Periferik Kandan DNA İzolasyonu.....	20
3.4. Vaka-Kontrol Gruplarının Polimorfizmler İçin Genotip Tayini.....	22
3.4.1. Genotipleme Yapılacak SNP'lerin Seçilmesi.....	22
3.4.2. Real Time PCR Genotipleme Deneyi İçin Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi.....	23
3.4.3. Real Time PCR Yöntemiyle Genotipleme Deneyi.....	29
3.4.4. Genotipleme Deneyinin Ardından Genotip Tayini.....	31
3.5. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi.....	33
4.BULGULAR.....	35
4.1. Vaka-Kontrol Grubuna Ait Genotip Dağılımları ile Allel Frekansları.....	35
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	44
7. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dopaminerjik limbik sistem (ödüllendirici yol) içinde yer alan bölümlerin merkezi sinir sistemindeki konumları.....	6
Şekil 2.2. Olgun miRNA oluşum yolağında yer alan bileşenler.....	13
Şekil 2.3. Alkol bağımlılığında sinaptik aralıkta miRNA'lar tarafından hedef alınan bileşenler.....	15
Şekil 2.4. miRNA oluşum yolu gen polimorfizmleri hücre içi miRNA seviyesini değiştirebilir.....	17
Şekil 3.1. <i>RNASEN</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs10719'nin (G>T) olduğu bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	24
Şekil 3.2. <i>DGCR8</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs1640299'nin (G>T) olduğu bölgenin dizisi.....	24
Şekil 3.3. <i>XPO5</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs11077'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	24
Şekil 3.4. <i>RAN</i> 'a ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs14035'nin yer aldığı (C>T) bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	24
Şekil 3.5. <i>DICER1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs3742330'nin (A>G) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	24
Şekil 3.6. <i>DICER1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs13078'nin (T>A) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	25
Şekil 3.7 <i>TARBP2</i> 'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs784567'nin (C>T) yer aldığı bölgenin dizisi.....	25
Şekil 3.8. <i>AGO1</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs595961'nin (A>G) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	25
Şekil 3.9. <i>AGO2</i> 'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs4961280'nin (C>A) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	25

Şekil 3.10. <i>GEMIN3</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs197388'nin (T>A) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	25
Şekil 3.11. <i>GEMIN4</i> 'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs910924'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.....	26
Şekil 3.12. <i>GEMIN3</i> rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen yarı logaritmik floresan ışımaya vs. döngü sayısı multicomponent grafiğinde homozigot AA genotipi.....	31
Şekil 3.13. <i>GEMIN3</i> rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen yarı logaritmik floresan ışımaya vs. döngü sayısı multicomponent grafiğinde heterozigot TA genotipi.....	32
Şekil 3.14. <i>GEMIN3</i> rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen yarı logaritmik floresan ışımaya vs. döngü sayısı multicomponent grafiğinde homozigot TT genotipi.....	33
Şekil 4.1. <i>RNASEN (DROSHA)</i> rs10719 polimorfizmi C>T için örnek genotipleme deneyi sonrasında elde edilen allelik diskriminasyon grafiği.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Genotip tayini yapılan miRNA oluşum yolağındaki SNP'ler.....	23
Çizelge 3.2. <i>RNASEN</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs10719 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	26
Çizelge 3.3. <i>DGCR8</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs1640299 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	27
Çizelge 3.4. <i>XPO5</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs11077 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	27
Çizelge 3.5. <i>RAN'a</i> ait 3'-UTR`de yer alan rs14035 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	27
Çizelge 3.6. <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs3742330 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	27
Çizelge 3.7. <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs3742330 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	28
Çizelge 3.8. <i>DICER1</i> 'e ait 3'-UTR`de yer alan rs13078 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	28
Çizelge 3.9. <i>AGO1</i> 'e ait intron 10`da yer alan rs595961 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	28
Çizelge 3.10. <i>AGO2</i> 'ye ait promotor bölgesinde yer alan rs4961280 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	29
Çizelge 3.11. <i>GEMIN3</i> 'e ait promotor bölgesinde yer alan rs197388 polimorfizmi için dizayn edilen primer ve prob dizileri.....	29
Çizelge 3.12. <i>GEMIN4</i> 'e ait promotor bölgesinde yer alan rs910924 polimorfizmi için dizayn	

edilen primer ve prob dizileri tabloda gösterilmiştir.....	29
Çizelge 3.13. Genotipleme deneyinde her bir örnek için Real Time PCR karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı.....	30
Çizelge 4.1. Vaka ve kontrol gruplarının demografik özellikleri.....	35
Çizelge 4.2. Vaka ve kontrol gruplarının ilgili gen bölgelerindeki polimorfizmlerin genotip dağılımları.....	35
Çizelge 4.3. Vaka ve kontrol gruplarına ait ilgili gen bölgelerindeki polimorfizmlerin allel dağılımları gösterilmiştir.....	36

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

3'-UTR	:Translasyonu Yapılmayan 3' Bölge (3'-Untranslated Region)
5-HTT	:Serotonin Taşıyıcısı
A	:Adenin
ADH	:Alkol Dehidrogenaz
AGO1	:Argonat Protein 1
AGO2	:Argonat Protein 2
ALD1B	:Aldehit Dehidrogenaz 1B
APA	:Amerikan Psikiyatri Birliği (American Psychiatric Association)
BHQ	:Karadelik Soğurucusu (Black Hole Quencher)
BK Kanalı	:Büyük Potasyum Kanalı
cdC	:C-5 Propinil Deoksiribo-Sitozin
COGA	:Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism
COMT	:Katekol-O-metil Transferaz
CRHR1	:Kortikotropin Salgılatıcı Hormon Reseptörü-1
dbSNP	:SNP Bilgi Bankası
DGCR8	:DiGeorge Sendromu Kritik Bölgesi 8
DICER1	:Dcr1 Homoloğu
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DRD4	:Dopamin Reseptör D ₄
DSM IV-TR	:Ruhsal Hastalıklar için Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition)
EDTA	:Etilendiamintetraasetik Asit
EtOH	:Etil Alkol (Etanol)

FRET	:Floresan Rezonans Enerji Transferi (Florescence Resonance Energy Transfer)
GABA	: γ -(gama)aminobütirik asit
GABRD	:Gama-aminobütirik Asit A Reseptör Delta Altbirimi
GAD	:Glutamik Asit Dekarboksilaz
GEMIN3	:DDX20 Dead Box Proteini 20
GEMIN4	:Gem (nükleusa ait parça) İlişkili Protein 4
G	:Guanin
gr	:Gram
lt	:Litre
miRNA	:MikroRNA
MAOA	:Mono Amin Oksidaz A
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik Asit
NMDA	:N-Metil-d-Aspartat
NCBI	:Amerika Birlesik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
OMIM	:Online Mendelian Inheritance In Man
QTL	:Nicel Karakter Lokusları (Quantitative Trait Loci)
RAN	:Ras İlgili Nükleus Proteini (Ras-related Nuclear Protein)
RFLP	:Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	:Ribonükleik Asit
ROX	:6-Karboksi-X-Rodamin, süksinil esteri
rpm	:Dakikadaki Dönme Sayısı
RT-PCR	:Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
rs	:Referans SNP numarası
C	:Sitozin
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	:Tek nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

T	:Timin
TARBP2	:Trans Activation Responsive RNA Binding Protein 2
TE	:Tris-EDTA
T_m	:Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
Tris-HCl	:Tris (hidroksimetil) Aminometan Hidroklorit
VNTR	:Değişen Sayıda Sıralı Tekrar (Variable Number of Tandem Repeat)
XPO5	:Hücre Dışı Sinyali Düzenleyen Kinaz 5

ÖZET

MikroRNA Oluşum Yolağında Yer Alan Gen Polimorfizmlerinin Alkol Bağımlılığı Riski Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması

Alkol bağımlılığı çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol aldığı kompleks kalıtsal bir nöropsikiyatrik hastalıktır. Alkol bağımlılığının etiolojisinde genetik faktörler önemli ölçüde yer almaktadır. Protein kodlamayan transkriptlerden işlenerek oluşturulan küçük RNA molekülleri ailesinin bir üyesi olan miRNA'lar, nöropsikiyatrik hastalıklarda gen ekspresyonunun değişiminden sorumlu tutulmaktadır. miRNA oluşum yolağında yer alan gen polimorfizmlerinin toplu olarak miRNA seviyesinde değişime neden olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Bu vaka-kontrol çalışmasında 123 alkol bağımlısı ve 135 sağlıklı kontrolden izole edilen DNA örnekleri üzerinde miRNA oluşum yolağı gen polimorfizmlerinin Real Time PCR ile genotipleme deneyi yapılmıştır. Ardından vaka-kontrol gruplarının allel ve genotip frekansı hesaplanıp istatistiksel analiz yapılmıştır.

RNASEN, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* ve *GEMIN3* polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile alkol bağımlısı olma riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. *AGO2* rs4961280 ve *AGO1* rs595961 G allelinin alkol bağımlısı olma riskini anlamlı oranda değiştirdiği bulunurken ($p=0,043$) *GEMIN4* rs910924 için T alleli ile alkol bağımlısı olma arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,021$). *AGO1* rs595961 ($p=0,001$) ve *DGCR8* rs1640299 ($p=0,002$) genotip dağılımlarında hasta grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, klasik miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri gen ekspresyonunda değişime neden olup alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında rol alabileceği hipotezinden yola çıkarak polimorfizmlerin hastalık riski ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu araştırma şu ana kadar polimorfizmlerin alkol bağımlılığı ile olan olası ilişkisini değerlendiren ilk hasta kontrol çalışmasıdır. Bağımsız bir çalışmada bu araştırmadaki bulguların tekrarlanması sonuçların doğrulanması açısından önemlidir. Çalışmanın sonuçları miRNA'nın alkol bağımlılığındaki rolünün ortaya çıkartılması amacıyla yapılacak araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Alkol bağımlılığı, miRNA, SNP, *GEMIN4*, *DGCR8*, *AGO2*.

ABSTRACT

A Research On Possible Effects Of Gene Polymorphisms In MicroRNA Biogenesis Pathway On Alcohol Dependence

Alcohol dependence is a neuropsychiatric disorder to which both genetic and environmental factors contribute. Especially genetic factors are promising to explain the etiology of the alcohol dependence. MicroRNAs are members of a family of noncoding small RNAs which are thought to be responsible for the altered gene expression in neuropsychiatric disorders. We hypothesized that SNPs in miRNA biogenesis pathway may result in an overall change in miRNA levels of a cell. Real Time PCR genotyping experiment was conducted on DNA samples from 123 alcohol dependent patients and 135 healthy controls. This was followed by a statistical analysis to calculate allele and genotype frequencies of case-control groups.

We did not find any significant association of *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* and *GEMIN3* polymorphisms with alcohol dependence risk. *AGO2* rs4961280 and *AGO1* rs595961 G alleles have significantly altered the risk of alcohol dependence ($p=0,043$), and also there is a significant association of *GEMIN4* rs910924 T allele with the risk of alcohol dependence ($p=0,021$). We also found statistically significant difference in *AGO1* rs595961 ($p=0,001$) and *DGCR8* rs1640299 ($p=0,002$) genotype frequencies between case-control groups.

In conclusion, polymorphisms in miRNA biogenesis may involve in increasing the alcohol dependence risk by changing the levels of miRNAs inside the cell. This is the first study to investigate the effects of SNPs in miRNA biogenesis pathway on alcohol dependence risk. An independent research on this subject should be conducted to verify our results. In the future, these results could be a guide to research on the role of miRNAs in alcohol dependence.

Key Words: Alcohol Dependence, miRNA, SNP, *GEMIN4*, *DGCR8*, *AGO2*.

1. GİRİŞ

Alkol bağımlılığı (OMIM #103780) genetik, psikososyal ve çevresel faktörlerin etkisiyle gelişip kendini gösteren kronik bir hastalıktır. Hastalık, genellikle giderek artan bir şiddette seyreder ve ölümcül olabilir. İçme eylemi üzerinde kontrol kaybı, zihnin sürekli alkolle meşgul olması, olumsuz etkilerine rağmen alkol kullanımına devam etme ve düşünsel eylemlerde sapma, buna örnek özellikle inkar etme verilebilir, bu belirtilerin her biri belirli aralıklarla tekrar edebilir veya kesintisiz gözlenebilir (1). Avrupa Komisyonu tarafından Avrupada 23 milyon kişinin alkol bağımlısı olduğu tahmin edilmektedir (2). Görüldüğü üzere Alkol Bağımlılığı sosyal ve ekonomik hayatı olumsuz yönde etkileyen, ciddi bir hastalıktır. Alkol bağımlılığında her ne kadar çevresel etmenler büyük oranda yer alsada alkol bağımlılığı öyküsü bulunan bireylerin aileleri, tek ve çift yumurta ikizleri üzerinde yapılan çalışmalar alkol bağımlılığının yaklaşık %50 oranında genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıktığını göstermiştir (3). Sonuçta alkol bağımlılığı genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Genetik faktörlerin birden fazla gen ailesinin birlikte etkileşim içinde olduğunu ve bu kompleks hastalığın etiyolojisinde yer aldığını söyleyebiliriz. Alkol bağımlılığı ile ilişkili olduğu daha önce yapılan araştırmalarda öne çıkan genlerin bazılarını şöyle sıralayabiliriz: Serotonin taşıyıcısı (5-HTT), Gama-Aminobütirik asit (GABA) reseptörlerini kodlayan genler, hücre içi GABA düzeyinin düzenlenmesinde görevli olan Glutamik Asit Dekarboksilaz (GAD) enzimini kodlayan *GAD-1*, prefrontal kortekste dopamin yıkımını gerçekleştiren Katekol-O-metil Transferaz (COMT) enzimini kodlayan *COMT*, alkolün antagonistik etki gösterdiği N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörünün alt birimlerini kodlayan genler. Ayrıca Monoamin Oksidaz A (MAOA), Kortikotropin Salgılatıcı Hormon Reseptörü-1 (CRHR1), Aldehit Dehidrogenaz 1B (ALD1B) ve alkol dehidrogenaz (ADH) ile alkol bağımlılığı riskini ilişkilendiren araştırmalar mevcuttur. Görüldüğü üzere bir çok farklı biyolojik yolaktaki bileşenin rol aldığı çok genli kompleks bir hastalık olan alkol bağımlılığının nedenini tek bir genetik faktöre bağlamak mümkün görülmemektedir. Çünkü kompleks genetik hastalıklarda birden fazla genin yer alması ve çevresel etmenlerin de eklenmesiyle hastalığın etiyolojisini açıklamak için çok sayıda değişkenin bir arada değerlendirilmesi gereklidir.

Bu noktada, yolakları düzenlemede rol alan ve merkezi sinir sistemindeki fonksiyonları düzenleyen genetik kontrol mekanizmaları eğer mevcutsa alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında bu mekanizmaların ne şekilde yer aldığı araştırılmalıdır. MikroRNA'lar (miRNA) merkezi sinir sistemi hastalıklarında gözlenen gen ekspresyonu seviyelerindeki değişimin düzenleyicisi olabilir. Büyük oranda sinir dokusunda ifade olan ve sinir hücresi oluşumunda görevli genlerin uzun 3' UTR bölgelerine ve çok sayıda miRNA bağlanma bölgesine sahip olduğu rapor edilmiştir (4). MikroRNA'ların merkezi sinir sistemi hastalıklarında gen ifadesinin değişiminde tam anlamıyla nasıl bir göreve sahip olduğunun araştırılması, hastalığın altında yatan genetik faktörlerin ortaya çıkarılmasına yardımcı olacaktır. MikroRNA'lar, mesajcı RNA (mRNA)'ların 3' transkripsiyon yapılmayan bölgesi ile (3'-UTR) Watson-Crick eşleşmesi yaparak transkripsiyon baskılar ve bu sayede gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev görür (5). Protein kodlayan genlerin de içinde bulunduğu insan genomundaki genlerin üçte birinden fazlası miRNA'ların hedefinde yer almaktadır (6). Yapılan araştırmalarda madde bağımlılığının ortaya çıkmasına neden olabilen moleküler mekanizmayla miRNA seviyelerindeki değişim arasındaki bağlantı bulunmaya çalışılmıştır. miR-9 bağımlı BK (Büyük Potasyum) kanalının stabilitesinin bozulması etanole karşı toleransın gelişmesine yol açmaktadır (7). On dört alkol bağımlısı ve on üç sağlıklı insan süperior prefrontal korteks örneği üzerinde yapılan mikroarray çalışmasında; miyelinizasyon, ubikinasyon, apoptoz, hücre adhezyonu, nöron hücresi oluşumu ve sinir sistemi hastalıklarında yer alan genlerin ekspresyon seviyelerinde hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla bir değişim gözlenmiştir (8). Uzun süreli morfine maruz kalmak doza bağlı olarak sinir hücrelerindeki miR-23b seviyelerinde bir artışa neden olmuştur (9). Striatal miR-212 sinyalinin yayılımı kokain bağımlılığına karşı daha meyilli olmanın ortaya çıkmasında düzenleyici göreve sahiptir (10). Bu çalışmalar alkol ve diğer madde bağımlılığı düzensizliklerinde miRNA'ların rol aldığı düzenleyici bir mekanizma aracılığıyla gen ifadesinin kontrol altında tutulduğuna işaret etmektedir. Diğer yandan, miRNA oluşum yolağındaki genlere ait tek nükleotid polimorfizmleri (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) hücre içindeki bütün miRNA'ların miktarında değişikliğe neden olarak merkezi sinir sistemi hastalıklarının etiyolojisinde yer alabilir. miRNA ile ilişkili polimorfizmler farklı kanserlerde çalışılmış ve kanser riski ile arasında anlamlı ilişkiler

bulunmuştur (11-12). Başka bir araştırma grubunun geniş bir yumurtalık kanserli hasta örneklemini üzerinde yaptığı çalışmaya göre de miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmlerinin yumurtalık kanser riski ile arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (13). Bu çalışmada miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin polimorfizmleri ile alkol bağımlılığı riski arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığını ortaya çıkarmayı amaçladık. Şu ana kadar bilimsel literatüre giren herhangi bir yayında miRNA ile ilişkili polimorfizmlerin alkol bağımlılığı üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Bu araştırma, bu alanda yapılan ilk vaka kontrol çalışması özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alkol Bağımlılığı

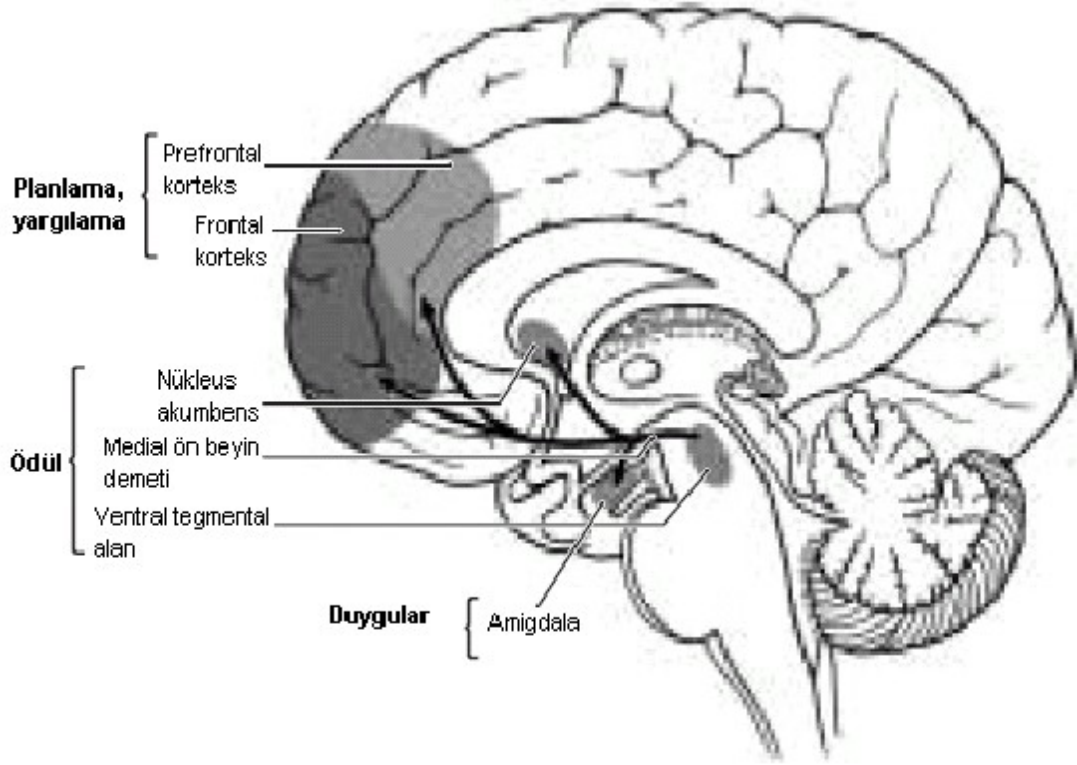
Alkol bağımlılığı sürekli alkol kullanımı, alkole karşı gelişen tolerans, tipik yoksunluk sendromu ve bu sendromu sonlandırmak için alkol içilmesiyle gelişen bir tür madde bağımlılığıdır (14). Alkol bağımlılığını bir cümlede tanımlayarak onu tam anlamıyla kavrayamayız. Dünya genelinde klinisyenler tarafından alkol bağımlısı tanısı konulmasına kılavuzluk eden Amerikan Psikiyatri Birliği (American Psychiatric Association; APA) tarafından hazırlanan Ruhsal Hastalıklar için Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition; DSM-IV) adında bir standart yönergeler kitabı vardır. Bu kılavuz kitaptaki tanı kriterleri doğrultusunda alkol bağımlısı teşhisi koyulabilmektedir. Kontrolsüz alkol içilmesinin yol açtığı olumsuz ve tehlikeli klinik tablolar olarak on iki aylık dönem içinde her hangi bir zamanda DSM-IV'de yer alan aşağıda sıralanan belirtilerden üç veya daha fazlasının ortaya çıkmasını sayabiliriz (15).

1. İntoksikasyon veya istenilen etkiye ulaşmak için artmış miktarda alkole ihtiyaç duyma ya da aynı miktar alkolü kullanmaya devam etmekle alkolün etkisinin kaybolması
2. Alkol yoksunluk sendromu ya da yoksunluğun giderilmesi için alkol içilmesi (veya benzer bir madde kullanılması)
3. Fazla miktarlarda alkol içilmesi veya niyet edilenden çok daha uzun bir zaman diliminde alkol içilmesi
4. Alkol içilmesini tamamen bırakmak veya kontrol altına almak için bir veya birden fazla başarısız girişimde bulunulması ya da sürekli olarak alkol içmek istenmesi
5. Alkol içilmesinden dolayı sosyal hayattaki, iş yaşamındaki veya eğlence hayatındaki aktivitelerde gerileme veya tamamıyla bunlardan vazgeçilmesi
6. Alkolün etkilerinden kurtulmak için veya alkol kullanmak için veya alkol temin etmek için gerekli aktivitelere büyük oranda zaman harcanması

7. Alkol kullanımının neden olduğu veya alkol kullanımıyla daha da kötüye giden, sürekli olarak ya da tekrar tekrar ortaya çıkan bir fiziksel veya psikolojik probleme sahip olunmasına rağmen, alkol içmeye devam edilmesi

2.1.1. Alkol Bağımlılığının Moleküler Mekanizması ve Bu Mekanizma İçinde Öne Çıkan Gen Polimorfizmleri

Alkol bağımlısı olmaya başlamanın ve bağımlılığın kalıcılık kazanmasının altında yatan moleküler mekanizmaların neler olduğunun araştırılması özellikle sinir bilimcilerin üzerinde durdukları bir konu olup bu alanda çok kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Alkol bağımlılığı bir bakıma davranış bozukluğu olduğu için beyin sistemlerindeki işlev bozukluğu muhtemelen hastalığın etiolojisinde yer alıyor. Bu fonksiyon bozukluklarında yer alan yapısal sinir sistemi elemanlarına ait genler aday gen çalışmalarında potansiyel hedef bölgelerdir. Alkolün bağımlılık yapıcı etkileri nöronlar ve yolaklar üzerindeki çeşitli etkileri ile ortaya çıkmaktadır. Bu etkilerin ortaya çıktığı nörotransmitter sistemlerine ait enzimler ve reseptörleri kodlayan genlerde yer alan polimorfizmler ile alkol bağımlılığını açıklamaya yönelik araştırmalar yürütülmüştür. Özellikle bağımlılığın arkasındaki motifler olarak nitelendirebileceğimiz nörotransmitter sistemlerdeki aksaklık alkol içme isteğimiz üzerindeki kontrolümüzü kaybetmemize neden olmaktadır. Mezolimbik sistem alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında kilit göreve sahip olmasıyla diğer beyin sistemleri arasından öne çıkmaktadır (16). Alkol mezolimbik dopamin sisteminin aktivitesini artırır. Bu nedenle hücre dışında dopamin konsantrasyonunun oluşması kompulsif madde kullanımı için gerekli olduğu düşünülmektedir (17). Alkolün etkisiyle gelişen nöroadaptasyonel değişimlerin hücre içinde sinyal iletim sistemlerinin, transkripsiyonun ve protein ekspresyonunun düzenlenmesindeki aksaklıkla bir bağlantısı olabilir (18-20).



Şekil 2.1. Dopaminerjik limbik sistemin (ödüllendirici yol) içinde yer alan bölümlerin merkezi sinir sistemindeki konumları (21).

Mezolimbik dopaminerjik yol diğer bir deyişle alkol ödüllendirici yolu orta beyinde bulunan Ventral Tegmental Alan (VTA) limbik sistemdeki bir çok bölgeye uzantısı olan sinir demetlerinden oluşur (Şekil 2.1). Vücuda alkol alındığında ödül hissi vermesinin birincil derecede sorumlusu Nükleus Akumbens'e (NAc) ait dopaminerjik sistemin uzantılarının olduğu tespit edilmiştir (19). Ayrıca sürekli alkol kullanımına bağlı olarak NAc'deki moleküler değişimler alkol bağımlılığının gelişmesine neden olmaktadır. Diğer yandan dopaminin bazı kalıcı değişimlere neden olarak, bağımlılık davranışının gelişimini kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (16).

Dopamin mezolimbik sistemdeki sinir hücrelerinin yer aldığı ödüllendirici yolun mediyatörü rolünü üstlendiği kabul edilmektedir. Bu yüzden dopamin fonksiyonuyla ilgili olarak DRD2 (Dopamin Reseptor D₂ alt tipi) geni üzerinde bir çok genetik ilişkilendirme çalışması yapılmıştır (22-25). TaqI polimorfizmi (rs1800497) ilişkilendirme çalışmaları arasında en çok çalışılan bölgeler arasındadır. Yapılan çalışmalar TaqI polimorfizminin DRD2'nin bitişiğinde yer alan ankrin tekrar ve kinaz bölgesi 1'i (ANKK1) içeren gen bölgesinde yer aldığını göstermiştir (26). Kırk dört adet

ilişkilendirme çalışmasının sonuçlarını kapsayan geniş çaplı bir meta analiz çalışmasının sonucunda, *DRD2/ANKK1* Taq1 polimorfizminin A1 allelinin alkol bağımlılığının patolojisi üzerinde çok küçük bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (27). Alkol bağımlılığının genetik faktörlerle ilişkisi üzerine yapılan bazı araştırmalar Dopamin reseptör 4 (*DRD4*) geninin ekzon 3 üzerinde yer alan uzunluğu populasyon içinde değişkenlik gösteren 48 baz çiftlik bölgesinin polimorfik sekansları (VNTR; Variable Tandem Number of Repeat) ile içme davranışı arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir (28).

COMT; dopamin, norepinefrin ve diğer katekolaminlerin metabolizmasından sorumlu enzimdir. Bu yüzden nöropsikiyatrik hastalıklarla *COMT*'daki genetik değişimler arasındaki ilişki üzerine araştırmalar yapılmıştır. *COMT*'a ait rs4680 polimorfizmi, ileri yaşta alkol bağımlısı olma riski ile ilişkili bulunmuştur (29). Finlandiya'da alkol bağımlısı bir örneklem üzerinde yapılan çalışmaya 896 erkek dahil edilmiş ve rs4680 polimorfizmi taşıyan erkeklerin alkol kullanmaya daha meyilli olduğu bulunmuştur (30). Fakat bazı araştırmalar bu polimorfizmin alkol ve nikotin bağımlılığı riski ile herhangi bir ilişkisinin bulunmadığı ve genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında da *COMT*'a ait bölgeyle bağımlılık riskinin ilişkilendirilemediği rapor edilmiştir (31,32).

Etanol merkezi sinir sisteminin depresanı olup, davranışsal şartlı refleks kaybına, aşırı mutlu olma haline, endişenin azalmasına, motor koordinasyonun aksamasına ve sedasyona neden olur. Alkol bağımlılığında gözlenen sıkıntıdan kurtulmak için alkol kullanımı da dahil olmak üzere davranışsal değişimlerin altında yatan en önemli mekanizmanın GABA_A reseptör işlevinin ve NMDA glutamat reseptörlerinin baskılanması olduğu düşünülmektedir (33). GABA reseptörlerinin alkolün sakinleştirici etkisinde, motor koordinasyonun aksamasında, alkole karşı toleransın gelişmesine ve bağımlılık davranışının gelişmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (34). Akut alkol kullanımı GABA aktivitesini arttırmaktadır. Fakat uzun süreli alkol kullanılması durumunda bu olay tam tersi yönde gelişir çünkü GABA_A reseptörünün faaliyeti zayıflar buna bağlı olarak da yoksunluk sendromu ortaya çıkar ve sinir hücreleri arasındaki iletimin duyarlılığı azalır (35). Bütünüyle işlevsel olan GABA_A reseptörü iki alfa, iki beta ve bir gama alt biriminden olmak üzere toplam 5 alt birimi yapısında barındırır (36). Vücuda çok yüksek miktarda alkol alınmasının ardından gelişen

yoksunluk sendromuna benzer bir etkiyi elde etmek için sıçan modelleri belli aralıklarla sürekli olarak etanole maruz bırakılmıştır. Bunun sonucu olarak alfa 1 ve delta alt birimlerinin ekspresyonunda azalma ve gama 2 ile alfa 4 alt birimlerinin ekspresyonunun ise arttığı gözlenmiştir (37). GAD gen polimorfizmlerinin alkol bağımlılığının gelişmesine neden olabileceğinin araştırıldığı çalışmanın sonucuna göre altı polimorfizmle alkol bağımlılığı riski arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (38). Alkolün vücuda alındıktan sonra elimine edilmesinde görev alan genlere, ADH ve ALD1B`ye ait farklı varyantları taşıyan bireyler arasında alkol metabolizmasında farklılıklar gözlenmektedir (39). İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar alkolün yol açtığı davranışsal değişimlerin nöroadaptasyon sonucunda geliştiğini göstermiştir (40). Alkol NMDA reseptör sistemlerini hedef alarak bu reseptörleri baskılar. Diğer yandan uzun süreli alkol kullanımı sonucunda post sinaptik reseptör miktarı artabilir ve bu baskılamaya karşı gelişen reseptör seviyesindeki artış yoksunluk sendromu sırasında ortaya çıkan NMDAR kanalının aktivitesindeki artışın sorumlusu olabilir (41). Alkolün uyarıcı sinapsların temas noktası olan dentritik uzantıların gelişimini engelleyerek sinaptik plastisitenin oluşmasına yol açabildiği görüşü öne sürülmüştür (42). Postmortem insan beyinleri üzerinde yapılan çalışmalarda mezolimbik dopamin sistemde yer alan prefrontal korteks, NAc'daki ve VTA'daki gen ekspresyonu paterni analiz edilmiştir (43). Ekspresyon paternleri birbirleriyle kıyaslandığında farklı bölgelerin birbirinden farklı ekspresyon değişimlerine sahip oldukları ortaya çıkmıştır (44). Alkol bağımlılığıyla bağlantısı olabilecek metabolik yolları ve genlerin belirlenmesi için yüksek oranda ve düşük oranda alkol tüketen fare modelleri üzerinde yapılan 107 farklı mikroarray çalışmasının sonucu bir araya getirilerek meta analizi yapılmıştır. Bu araştırmanın ardından elde edilen veriler insana ait QTL (Quantitative Trait Loci; Nicel Karakter Lokusları) ile kıyaslandığında yaklaşık 3800 genin ekspresyonunda anlamlı bir değişimin olduğu ve bu genlerin iyon kanalı aktivitesi, hücre içi sinyal iletimi, protein taşınımı, sinir oluşumu ve nörodejenerasyonun düzenlenmesi ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir (45).

Opiyat sisteminin alkolün vücuda alındıktan sonra etkilerini göstermesinde ve madde bağımlılığının gelişmesinde tetikleyici rolü olduğu düşünülmektedir. Opiyat reseptörlerinin farklı çeşitleri bulunmaktadır ama bunlar için opiyat reseptör mu (*OPRM1*) aday gen olarak diğerleri arasından ön plana çıkmaktadır. Çünkü Asn40Asp

polimorfizminin reseptör üzerinde fonksiyonel değişimler yaratabileceği gösterilmiştir (46). Vaka kontrol çalışmalarının sonuçları birbiriyle çelişen niteliktedir. Asn40Asp polimorfizmi üzerine yapılan meta analizi çalışması alkol bağımlılığı ile herhangi bir ilişkinin varlığını tespit edememiştir (47). Asn40Asp polimorfizmi taşıyıcılarının naltrekson tedavisine yanıtlarının, taşımayan alkol bağımlıları ile arasında bir farklılık olduğu rapor edilmiştir (48).

Serotonin taşıyıcısı (5-HTT) serotoninin sinaptik aralıktan geri alımını düzenlemektedir ve böylece serotoninin etkilerinin sonlandırılmasını sağlamaktadır. Serotonin taşıyıcısındaki genetik varyasyonların madde bağımlılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (49). Serotonin sisteminde en çok araştırılan polimorfizmler serotonin taşıyıcı genin promotor bölgesindeki insersiyon/delesyon (5-HTTLPR) varyantlarıdır. Uzun allele (L) sahip genin transkripsiyon aktivitesi kısa allel (S) taşıyan genin transkripsiyon aktivitesi seviyesine göre daha düşük kalmaktadır (50). On yedi ilişkilendirme çalışmasının sonuçları bir araya getirilerek yapılan bir meta analizinin sonuçlarına göre de S allelinin frekansı ile alkol bağımlılığı riski arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu ve alkol bağımlısı ve ek psikopatolojik rahatsızlıkları olanlarda, geç yaşta alkol bağımlısı olanlar ya da alkol bağımlılığı çok şiddetli seyredenlerde bu ilişkinin çok daha kuvvetli olduğu bulunmuştur (51).

Bağlantı analizi çalışmalarıyla alkol bağımlılığı ile 7 nolu kromozomun uzun kolunda bulunan kolinerjik muskarinik reseptör 2 (*CHRM2*) arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur (52). Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA) grubuna ait alkol bağımlılısı bireylere ait DNA örnekleri üzerinde yapılan ilişkilendirme çalışmasının sonucuna göre de *CHRM2* polimorfizmi ile alkol bağımlısı olma riski ve majör depresyon ile ilişkisi olduğu bulunmuştur (53). Şimdiye kadar üzerinde bir çok araştırma yapılmış ve alkol bağımlılığına neden olabilecek potansiyel risk teşkil eden lokusları şöyle sıralayabiliriz: Dopamin taşıyıcısının (DAT 1) yer aldığı lokus SLC6A3, dopamin D4 reseptör ekzon 3 VNTR (*DRD4*), *DRD2* TaqIA (rs1800497), *COMT* val158met (rs4680), monoamin oksidaz A VNTR ve serotonin taşıyıcısının bulunduğu lokus SLC6A4.

2.1.2. Alkol Bağımlılığı Hem Genetik Hem de Çevresel Faktörlerin Etkisiyle Ortaya Çıkmaktadır

Moleküler genetik alanında yapılan araştırmalar alkol bağımlılığı için risk teşkil eden gen bölgelerinin bulunmasına yardımcı olmaktadır. Alkol bağımlılığının kalıtsal olduğu ve alkol bağımlısı bireylerin ailelerinde kuşaktan kuşağa aktarıldığı aile çalışmalarıyla ortaya konmuştur (54,55). Fakat bu alkol bağımlılığının etiolojisinde genetik faktörlerin tek başına yer aldığı anlamına gelmemektedir. Çevresel faktörler de alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında önemli ölçüde etkilidir. İkizler üzerinde yapılan bir çok genetik çalışma konkordans oranlarının tek yumurta ikizlerinde alkol bağımlılığının genetik bir altyapısının olduğunu desteklemektedir. Alkol bağımlısı indekslerin erkek monozigotik kardeşleri ile aynı cinsiyetteki erkek dizigotik kardeşlere oranla alkol bağımlısı olmaya daha meyilli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kadınlarda ise bu iki grup arasında herhangi bir davranış probleminin görülme oranında bir değişim gözlenmemiştir. Fakat alkol kötüye kullanımı gözlenen erken başlangıçlı erkek bireylerde kalıtsal faktörlerin etkisinin geç başlangıçlı gruba göre anlamlı düzeyde daha fazla olduğu bulunmuştur (56). İkizler ile telefon üzerinden yapılan mülakatlardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda monozigotik ikiz eşlerinde de alkol bağımlılığının %64 oranında kalıtılabilirlik gösterdiği bulunmuştur. Alkol bağımlılığında genetik varyansın hem kadın hem de erkek bireyler için aynı oranda olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak cinsiyet farklılığı genetik açıdan alkol bağımlılığının riski üzerinde herhangi bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir (57). Alkol bağımlılığı başka nöropsikiyatrik rahatsızlıklarla beraber ortaya çıkabilir. Alkol bağımlılığının yanında ikinci bir nöropsikiyatrik rahatsızlığın seyretmesinin ortak genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir (58).

2.1.3. Alkol Bağımlılığının Genom-Boyu İlişkilendirme Çalışmaları

İnsan genom projesiyle kalıtsal bilginin deşifre edilmesi yönünde büyük bir gelişme katedilmiştir. Haplotip Haritası (HapMap) projesinin de yardımıyla genom boyu ilişkilendirme çalışmaları kompleks hastalıkların altında yatan genlerin ortaya çıkarılması için yapılan araştırmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Çok sayıda araştırmacı genetik varyasyonların ve mutasyonların birçoğunun bir araya gelerek

kompleks hastalıkların seyrini nasıl etkilediğini araştırmaktadır. Son yıllarda alkol bağımlılığı üzerine genom boyu ilişkilendirme çalışmaları yapılmıştır. COGA grubunun elinde bulunan 120 alkol bağımlısı ve 160 sağlıklı kontrole ait DNA örnekleri üzerinde 104.268 SNP için yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonunda 51 gen bölgesindeki 188 SNP'nin alkol bağımlılığı riski ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu ilişkili bulunan bölgelerde yer alan genler hücre içi sinyal iletiminden, gen ekspresyonunun düzenlenmesinden, canlı gelişiminden ve hücreler arası tutunmadan sorumlu genler olduğu ortaya konmuştur (59). Diğer bir genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonucunda 487 adet 28 yaşın altında yatan erkek hasta ve 1358 sağlıklı kontrol üzerinde 524.396 SNP test edilip 121 SNP'nin nominal frekansa sahip olduğunu ve bunlardan 15 tanesinin çalışmanın devamında oluşturulan örneklemde de alkol bağımlılığı riski ile arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı doğrulanmıştır. İki nolu kromozomun uzun kolunun 3.5 bandında yer alan (2q35) trans-2-enol-koA redüktaz (PECR) gen bölgesinin 3' ucunda yer alan iki polimorfizm (rs7590720, rs1344694) ile alkol bağımlılığı arasında hem genom boyu ilişkilendirmede anlamlı bir ilişki tespit edilmiş hem de devamında yapılan genotipleme çalışmasının sonunda ilişkinin varlığı doğrulanmıştır (60). Başka bir araştırmada ise 948.658 SNP'nin test edilip 1897 hasta ve 1932 kontrol üzerinde yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonucunda 15 SNP'nin alkol bağımlılığı riski ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Fakat replikasyon çalışmalarında SNP'lerle ilgili bulunan anlamlı ilişkiler tekrarlanamamıştır (61).

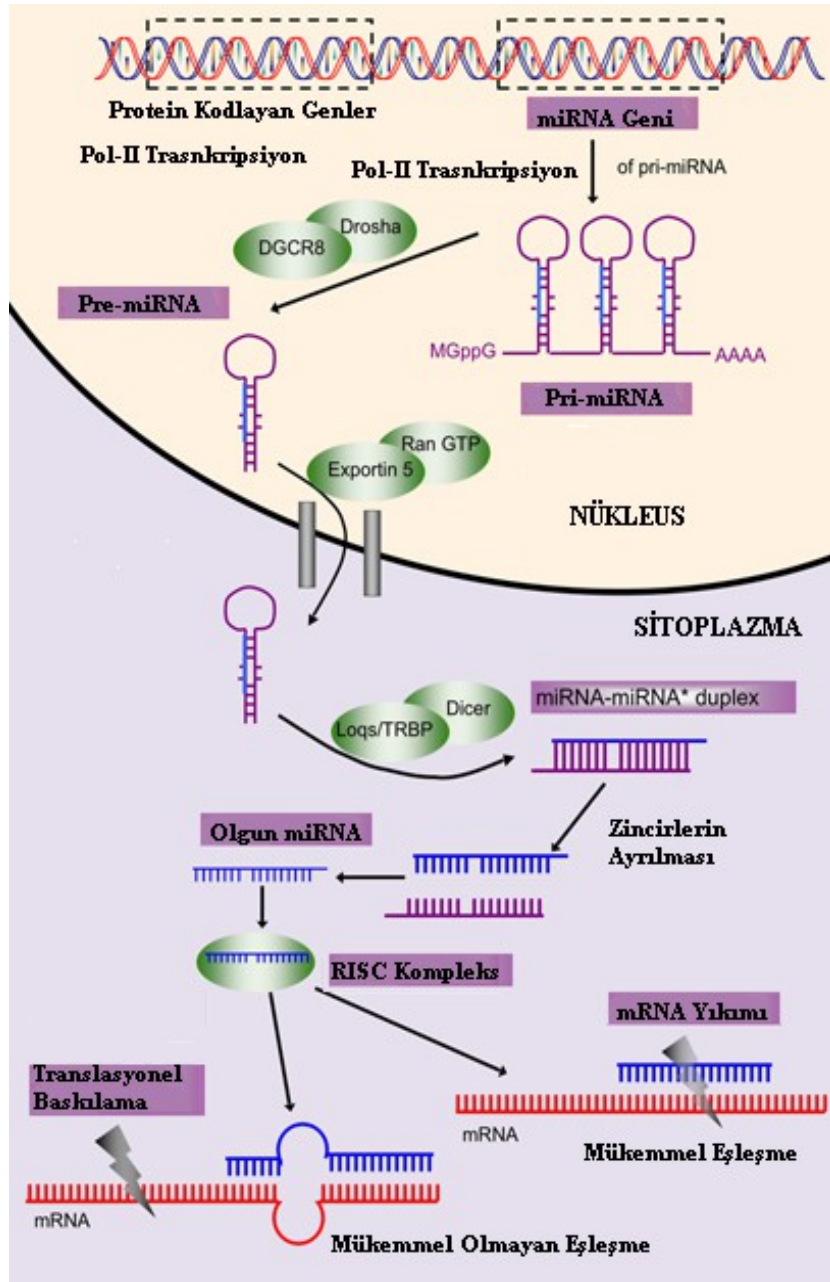
2.2. miRNA: Posttranskripsiyonel Gen İfadesini Düzenler

MikroRNA'lar 1993'te *Ceanorhadbitis elegans* üzerinde yapılan bir araştırmada post-embriyonik gelişimin zamanlamasını düzenleyen moleküller olarak tanımlanmıştır. Bu küçük RNA moleküllerinin *lin-4*'den transkribe olduğu ve Lineage-deficient-14 (*lin-14*) gen sekansına karşı eşlenik bir diziyeye sahip olduklarından RNA-RNA etkileşimi sayesinde bu gene ait mRNA'nın translasyonunu düzenledikleri gösterilmiştir (62,63). MikroRNA üzerindeki çekirdek (seed) adı verilen bir bölge hedef mRNA'yla baz çifti oluşturarak bağlanır (64). MikroRNA'lar genel olarak translasyonu baskılayarak veya mRNA yıkımına neden olarak posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu düzenler (65).

Argonat (Argonaute; AGO) proteinlerinde yer alan bir motifin eIF4E'nin (Ökaryotik Başlatıcı Faktör 4E) 7-metilguanozin bağlanmasında işlev gören bölgesiyle önemli ölçüde benzeştiği bulunmuştur. AGO2 proteininde bulunan motife ait halkasal yan grupların 7-metilguanozine bağlanmada ve translasyonun baskılanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (66). Sonuç olarak bu küçük RNA moleküllerinin hücre içi birçok biyolojik işlev üzerinde hedef mRNA sekansına özgül baz çifti eşleşmesi kurarak gen ifadesinin transkripsiyon sonrası safhada hassas ayarının yapılmasında görev almaktadır.

2.2.1. Klasik miRNA Oluşum Yolağı ve Bu Yolakta Yer Alan Bileşenler

MikroRNA oluşum yolağının ilk basamağı miRNA gen bölgesinden RNA polimeraz II (RNA pol II) aracılığıyla transkribe olmasının ardından oluşan birincil miRNA (primary miRNA; pri-miRNA) sentezlenmesidir. Aynen mRNA molekülünde olduğu gibi pri-miRNA da 5'-metil guanozin şapkası ve 3' poli A kuyruğuna sahiptir (67). MikroRNA geni transkribe edildikten sonra elde edilen transkript pri-miRNA saç tokası şeklindedir ve ilmek ile sap kısımlarından oluşan 5' ucunda fosfat ve 3' ucunda 2 nükleotidlik çıkıntı olacak şekilde 70-80 baz çifti uzunluğundaki öncül mikroRNA (precursor-miRNA; pre-miRNA)'ya dönüştürülür (68,69). Çekirdekte gerçekleşen bu dönüşümü yapan enzim kompleksi üç önemli bileşenden oluşmaktadır: RNase III enzimi, DROSHA proteini ve DiGeorge Critical region 8 (DGCR8) proteini (70,71). Prekürsör miRNA'lar daha sonra çekirdek zarında bulunan Exportin-5 (XPO5) adlı protein aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya doğru taşınır (72,73). Sitoplazmada ikinci bir RNase III enzimi, Dicer ve TAR DNA-Bağlayıcı Protein (TRBP)'nin bir araya gelmesiyle oluşan kompleks pre-miRNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanıp 20-25 baz çifti uzunluğundaki olgun miRNA'yı oluşturur. Oluşan çift zincirli olgun RNA 2 nükleotidlik 3' uzantılara sahiptir (74,75). miRNA:miRNA* dubleks yapısı helikaz ile aralarındaki baz çiftleri ayrılarak olgun miRNA ve miRNA* (olgun miRNA'nın eşlenik dizisi) adlı iki tek zincirli molekül oluşur. Dicer/TRBP miRNA dubleksine ait zincirlerden birini (guide strand, kılavuz zincir) alır ve yapısında AGO2 bulunan RNA-indükleyen susturucu kompleksine (RNA Induced Silencing Complex; RISC) yükler ve hedef mRNA'nın translasyonu baskılanır (75,76).



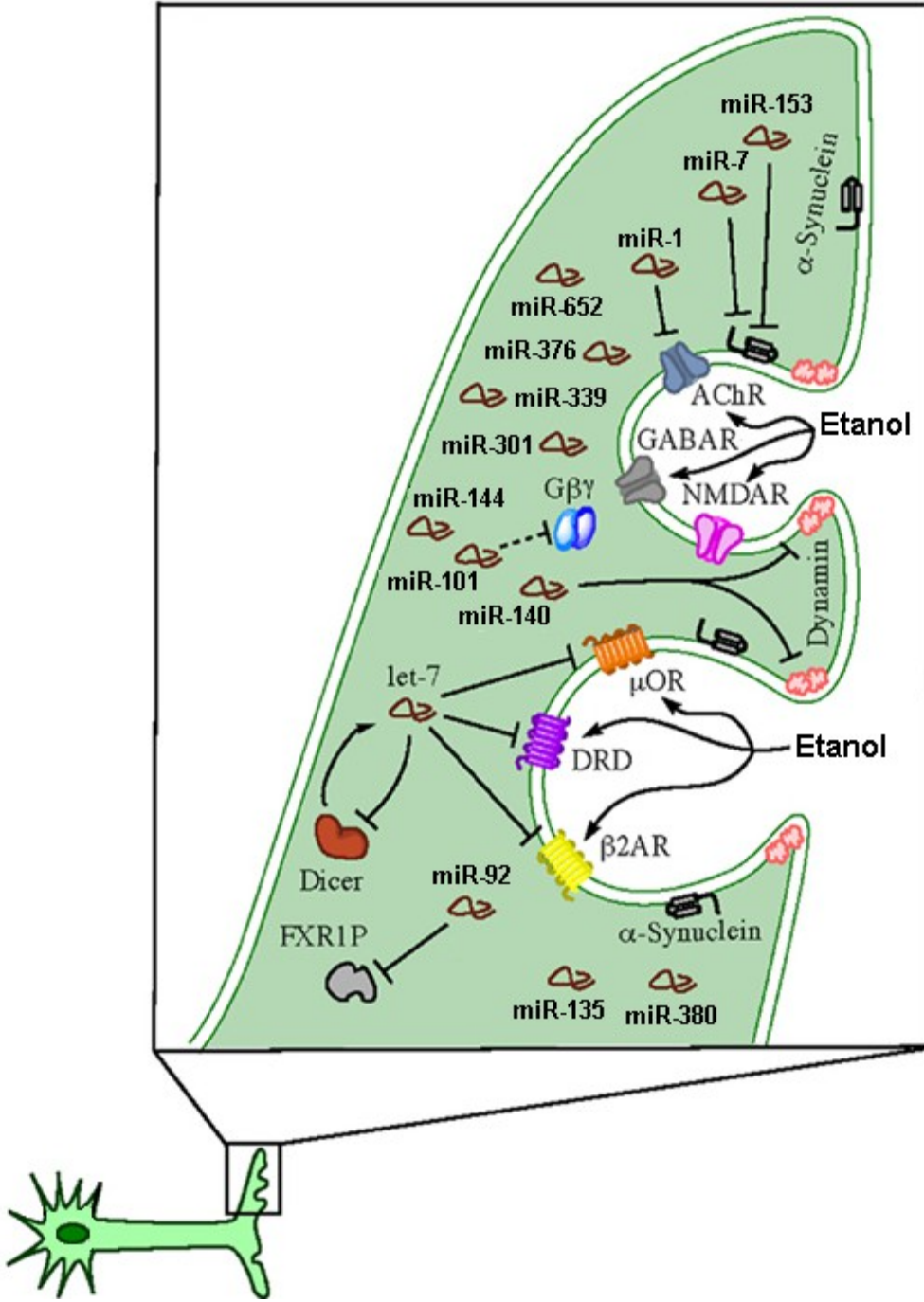
Şekil 2.2. Olgun miRNA oluşum yolağında yer alan bileşenler (77).

Şekil 2.2'de RISC kompleksi oluşuktan sonra iki şekilde miRNA mRNA ile etkileşime girebilir. Birincisi tamamıyla uyumlu baz eşleşmesi kurarak mRNA'nın yıkımına neden olabilir ya da kısmi bir baz eşleşmesi kurarak translasyonu baskılayabilir (77). Olgun miRNA mRNA üzerindeki 3'-UTR içinde yer alan hedef bölgeye bağlanır. MikroRNA üzerindeki bu hedef bölgeyi tanıyan eşlenik diziyeye çekirdek (seed) dizisi adı

verilmektedir. Çekirdek dizisi olgun miRNA'nın 5' ucundan 2-7 nükleotid uzakta bulunur. miRNA çoğunlukla hedefindeki mRNA'nın 3'-UTR'si ile baz eşleşmesi yaparak post-transkripsiyonel gen ekspresyonunu baskılar (6).

2.2.2. Merkezi Sinir Sistemindeki mRNA Hedeflerinin miRNA'lar Tarafından Düzenlenmesi

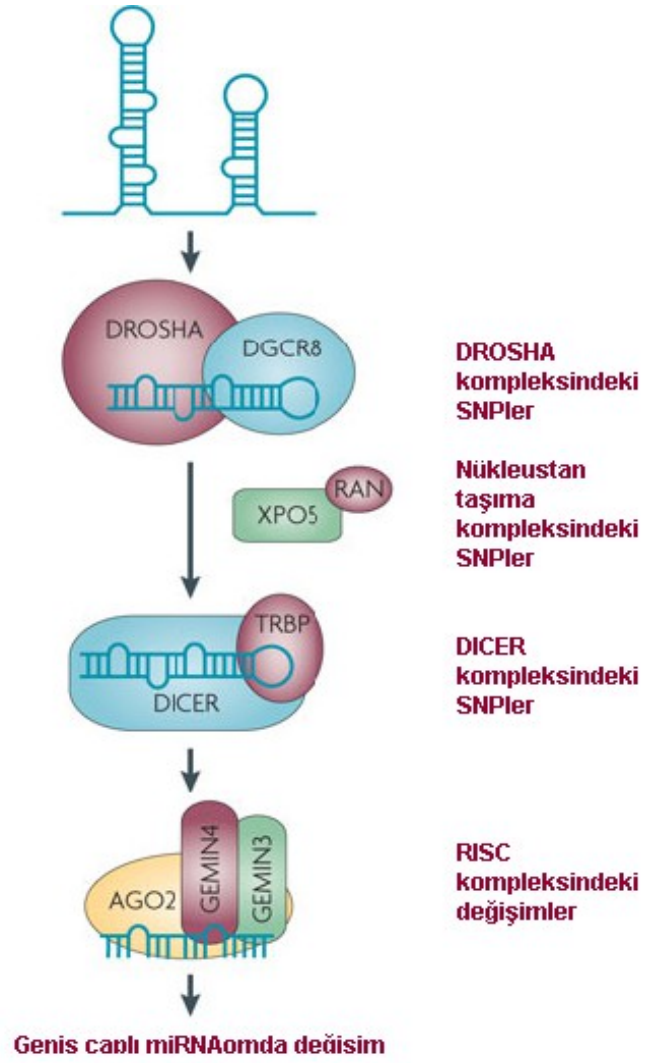
Birçok miRNA sinir sisteminin doğru bir şekilde işleminde önemli göreve sahiptir. MikroRNA'ların özellikle beyinde ekspresyon seviyeleri yüksektir ve bir çoğu da sinir hücrelerine özgü görev yapmaktadır (78). Sinir sisteminin gelişiminde ve dentritik uzantıların oluşmasında miRNA'lar yer almakta ve bir çok nörolojik hastalıkta miRNA seviyelerinde bir düzensizlik gözlenmektedir. Memeliler üzerinde yapılan deneyde miRNA oluşumunda önemli bir bileşen olan Dicer'in fonksiyonunu yerine getirmesi engellendiğinde gözlenen değişiklikler miRNA'ların merkezi sinir sisteminin fonksiyonunda büyük öneme sahip olabileceğini göstermiştir (79). Ayrıca nöron hücrelerinin farklılaşarak sinir hücresi çeşitlerinin ortaya çıkmasında miRNA'ların önemli bir göreve sahip olduğu ortaya konmuştur (80). Purkinje hücrelerinde miRNA işlenmesinin aksaması ataksiyle sonuçlandığı gösterilmiştir (81). Şekil 2.3'te gösterildiği üzere Etanol bir çok nörotransmitter reseptörü etkileyerek davranışın uzun süreli değişimini tetikleyebilir. Bu reseptörler arasında GABA reseptörü, NMDA reseptörü, Asetil kolin reseptörü (AChR), mü opiyat reseptörü (μ OR), DRD ve β 2 adrenerjik reseptörü (β 2AR) sayılabilir. MikroRNA ailesinin üyelerinden let-7, miR-1, miR-101, ve miR-140 nörotransmitter reseptörlerin ekspresyonunu azaltır ya da dynamin ve α -synüklein'in mRNA'sını hedef alarak sinaptik endositozu engelleyebilirler. Sinapta görev alan miRNA'lar Dicer, FXR1 ve miRNA oluşum yolu bileşenlerinin mRNA'larını hedef alarak bir negatif feedback döngüsü içinde yer almaktadır (82).



Şekil 2.3. Alkol bağımlılığında sinaptik aralıkta miRNA'lar tarafından hedef alınan bileşenler (82).

2.2.3. miRNA ile İlişkili Gen Polimorfizmleri

MikroRNA'lar, protein kodlama görevi olmayan, çok geniş bir gen grubunu oluştururlar ve hedef mRNA üstündeki 3'-UTR'deki diziyle eşleşerek gen ifadesinin transkripsiyon sonrasındaki evrede düzenleyici olan küçük RNA molekülleridir. MikroRNA ekspresyonunun, nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalık durumunda değişim gösterdiği bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu sonuçlar miRNA'ların bu hastalıkların patolojisinde önemli görevleri olduğuna işaret etmektedir. miRNA seviyelerinde değişime neden olabilecek üç farklı gen grubundaki polimorfizmleri sayabiliriz. Birincil miRNA transkripsiyonunun gerçekleştiği gen bölgesinde, olgun miRNA'nın hedefinde bulunan mRNA'nın 3'-UTR'sinde veya miRNA oluşum yolağında yer alan bileşenlere ait gen bölgelerinde yer alan polimorfizmler hücre içi miRNA seviyelerinde değişime neden olabilir (Şekil 2.4). MikroRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri ile alkol bağımlılığı riski arasında muhtemel bir ilişkinin çalışılması bu açıdan önemlidir. miRNA'ların polimorfizmlerini araştıran çalışma sayısı giderek artmaktadır. Bu çalışmalardan biri, Iwai ve ark. yaptığı çalışmada 173 insan pre-miRNA'sının dizi analizi yapılmış ve 10 adet SNP bulunmuştur (83). MikroRNA'ya ait farklı bölgelerdeki polimorfizmler, olgun miRNA fonksiyonunu ve oluşumunu etkileyebilmektedir (84-86). miRNA oluşum yolağında yer alan genlerdeki sekans varyasyonları miRNA işlenmesini etkileyebilir. Bu durum henüz deneysel olarak gösterilmemiştir. Öncül miRNA'nın işlenip olgun miRNA'ya dönüştüğü yolakta görevli genler ile ilişkili polimorfizmler miRNA seviyelerinde değişime neden olduğunda miRNA'ların hedefindeki birçok genin ekspresyonunun bu durumdan etkilenerek protein düzeylerinde bir değişim gözlenebilir.



Şekil 2.4. miRNA oluşum yolu gen polimorfizmleri hücre içi miRNA seviyesini değiştirebilir (87).

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)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- ❖ 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)
- ❖ Mikrodalga Fırın (Samsung)
- ❖ Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ❖ Sodyum Etilendiamintetraasetik asit (Na_2EDTA) (Sigma E-5134)
- ❖ Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- ❖ 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)
- ❖ Sodyum Klorür (NaCl)

❖ Amonyum Asetat ($C_2H_7NO_2$)

3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

Nüklei Lizis Tampon Çözeltisi

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

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

2 mM Na_2EDTA0,7 gr (pH 7,4)

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

%10 SDS

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

TE Tampon Çözeltisi

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

1 mM Na_2EDTA0,093 gr

250 ml distile suda çözüldü.

10 M Amonyum Asetat ($C_2H_7NO_2$) Tampon Çözelti

148 gr $C_2H_7NO_2$

200 ml distile suda çözüldü.

Proteinaz K için Tampon Çözeltisi

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

200 ml distile suda çözüldü. Otaklavda steril edildi. +4 °C`de saklandı.

6 M Tuz (NaCl) Çözeltisi

35,5 gr 100 ml`ye distile su ile tamamlandı.

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

Araştırma projesi başlamadan önce hem Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Etik Kurulundan hem de Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan insan örnekleri üzerinde araştırma yapılabileceğine dair onay alınmıştır. Araştırmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Ana Bilim Dalı'na başvuran ve Denizli AMATEM'de (Alkol ve Madde Bağımlılığı Tedavi ve Eğitim Merkezi) tedavi gören alkol bağımlısı bireyler dahil edildi. Alkol bağımlısı bireylerin Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Ana Bilim Dalında DSM-IV kriterlerine göre tanısı konmuştur. Sağlıklı kontrol grubu ise ailesinde alkol bağımlılığı dahil herhangi bir nöropsikiyatrik hastalık tanısı almamış sağlıklı bireylere ait DNA örneklerinin hasta grubuyla sayı bakımından ve cinsiyet dağılımı açısından uyumlu olacak şekilde seçilmesiyle oluşturulmuştur. Hem hasta hem de kontrol grubundaki bireylerden çalışmaya dahil olmayı kabul ettiklerine dair etik kurulda belirtilen yönergelerle uygun bir biçimde hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formunu doldurmaları istendi. Bu çalışmada hasta grubu olarak alkol bağımlısı 123 bireyden ve kontrol grubu olarakta 135 sağlıklı bireyden alınan toplam 258 DNA örneği üzerinde çalışma yapılmıştır. Her 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 (88). Vaka ve kontrol gruplarına ait kan örnekleri numaralandırılıp sıraya konduktan sonra DNA izolasyonu yapıncaya 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 13 ml'ye tamamlanacak şekilde soğuk steril distile su eklendi. Daha sonra 2-3 dk süreyle tüpler hızlıca çalkalandı.

2. Sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dk 2000 rpm`de santrifüj edildi.
3. Çökelti üstündeki sıvı faz (süpernatant) atıldıktan sonra tekrar 13 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 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 basamakla beraber nükleus içeriğinin ortama 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. Bir çeşit deterjan olan SDS hidrofobik ve hidrofilik kısma sahip bir molekül olduğundan yapısında yağ bulunduran hücre membranının ayrışmasına neden olur ve böylece hücre içeriği serbest hale geçer. Proteinlerin elimine edilmesi için de proteinleri sindiren enzim (Proteinaz K; K keratinin baş harfi) kullanıldı.
8. Proteinaz K'nin optimum düzeyde işlevini yapabilmesi için tüp aşağı yukarı 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 6 M NaCl (veya 10 M amonyum asetat; C₂H₇NO₂) ilave edilip hızlıca yaklaşık 20 defa aşağı yukarı alt üst edildi. NaCl proteinlerin DNA'dan ayrılmasını kolaylaştırır. Çünkü NaCl ortamın iyonik kuvvetinin artırır ve aminoasit zincirindeki yan gruplarla DNA'nın arasında kurulan moleküller arası bağların zayıflamasına neden olur. Böylece DNA proteinlerden kolayca ayrılarak ortamda serbest hale geçer.
11. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi ve 15 dk 3500 rpm`de santrifüj edildi.
12. Süpernatant başka bir tüpe alındı ve üzerine soğuk 2 katı kadar saf etanol eklendi. (Eğer saf bir DNA elde edilmiş ise DNA molekül ağırlığı ağır olmasına rağmen yumaklaşıp beyaz bir iplik halini alır ve yüzeye doğru çıkar ya da çözeltide asılı kalır.)
13. Elde edilen DNA yumağının miktarına göre Tris-EDTA (TE; pH 8) tampon çözeltisi eklendi. TE tamponu içinde EDTA bivalent (iki iyon yüklü) katyon şelatörü içerir. EDTA'nın eklenmesinin nedeni DNaz aktivitesini durdurmasıdır, çünkü Ca⁺² DNaz'ın

işlev görmesi için gerekli kofaktördür. Böylece ortamda serbest hale gelen DNaz'ların aktivitesi Ca^{+2} iyonlarının şelatlanmasıyla engellenmiş olur.

14. Ardından tüpler oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra bir sonraki deneye kadar $+4^{\circ}C$ '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 deneyi yapıldı. Genotipleme deneyi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction; Real Time PCR) yöntemi ile ilgili polimorfik sekansa özgü probler kullanılarak Çizelge 3.1'de yer alan polimorfizmler için yapıldı. Daha önce mesane kanseri üzerine yapılmış bir vaka kontrol çalışmasında yer alan polimorfizmler bu çalışmada aday gen bölgeleri olarak seçilmiştir (11). Polimorfizmler seçilirken Minör Allel Frekansı (MAF) 0.01'den büyük olanlar araştırmaya dahil edildi. Gen polimorfizmleri daha çok gen ekspresyonu üzerinde etkisi olabilecek bölgelerdeki (3'-UTR ve promotor bölge) polimorfizmler seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Genotip tayini yapılan miRNA oluşum yolağındaki SNP'ler.

Gen	Gen ID	Kromozomal Lokasyon*	Referans SNP No	Pozisyon	Varyant (M>m)
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	29102	chr5:31401447	rs10719	3'-UTR	C>T
<i>DGCR8</i>	54487	chr22:20098359	rs1640299	3'-UTR	G>T
<i>XPO5</i>	57510	chr6:43490947	rs11077	3'-UTR	A>C
<i>RAN</i>	5901	chr12:131361241	rs14035	3'-UTR	C>T
<i>DICER1</i>	23405	chr14:95553362	rs3742330	3'-UTR	A>G
<i>DICER1</i>	23405	chr14:95556747	rs13078	3'-UTR	A>T
<i>TARBP2</i>	6895	chr12:53894465	rs784567	5'-UTR	C>T
<i>AGO1 (EIF2C1)</i>	26523	chr1:36367780	rs595961	intron 10	A>G
<i>AGO2 (EIF2C2)</i>	27161	chr8:141647414	rs4961280	promotor	A>C
<i>GEMIN3 (DDX20)</i>	11218	chr1:112297482	rs197388	promotor	A>T
<i>GEMIN4</i>	50628	chr17:655920	rs910924	promotor	C>T

Kısaltmalar: M>m, majör>minör allel; chr, kromozom

* SNP bilgi bankasında (dbSNP) yer alan referans genom üzerindeki polimorfizmin konumu.

3.4.2. 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 3.1-11'de gösterildiği üzere referans genom dizileri üstte belirtilmiş olup primer eşleşme bölgeleri sarı ile işaretlenmiştir. Yeşille işaretlenen bölgeler ise prob eşleşme bölgesidir. 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

AAATAAAAGGAAGTAATGCACATTCACCAAAGTCAAGTTTTCCGTTAAATAGAAGAAAAATCTAATACTT
TGTAATAAAGACCATCCAGCTAAAAACAGATCATTAAAAACAACAATAGCGATTTGACTCTGTATTTTATT
TCAATGAGCACACTTCATTTCATTGTCTGCAGGAAAC TAGGCTAGGTCTCAATAGACAACAGTCA CAGTT
ACTGAGCAAGTAAATACTCCACACTTGCATGCCCTCCTTTATTTCTTGATGTCTTCAGTCTC

Şekil 3.1. *RNASEN*'e ait Real Time PCR yöntemi ile çoğaltılan rs10719'nin (C>T) olduğu bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NG_022931.1

AACCATCAAGGTGGTCCCTCTCCAGTCTGGACACGATGCCAGCAAGGATGACGTCCTGCCACCTCCTGGA
GTTACCC TGGCCTCCTAGGGTCCCTTTTCTGATGAAG TCTTAAT TCCCTAAAAGCGCTCTTTGGACAC
TGAGGCCCTCTCTGCCTTTCCTGGCCTCCGGCAACAGTTTTTTACAAAGATTTTTTGCAGTCGAGTCCAT
ATGTCCACCCATTGATTTTTTAAAGCTTTTGTGATATTTTAGCATTTTGAAAGACTTTCACAGTGAGAGTA
GAAGGTAGATTTGGAATCATGCATTTTAGCAAGTGGACTTGTGAAACAGGAAGCAAGGGCCTTCAGTGT

Şekil 3.2. *DGCR8*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs1640299'nin (G>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NM_020750.2

TGTCATGTGACACTATCTAGGGTACTGTGGCTCTTGTGCCTGAGTGGACCTTGAGGCTGGGGAGGCCAGA
CTGAGGGGTTCATTCATGGAAGGGCAAGATGTGTGAACCTCAAAGGGGATGTTAGCACTAAAGACTTCCCA
GCCCTGGTCCCTGGAGGTACTATACTTGATACTGTGCCAAGTTTAGCAGTAGCCTGTACCATGGATCCCA
TCAGGTGACCAGATTCCTTGCCCAAAGCAAAGTTGAGAGAAGTACCAAGTTCTCTTCAGCACTTAGCACC
TAACCCAGACATGCCCTTAGGGAGTGGGGAAAGTTTCTGCCAGCCAGCAGCAAAAGGGCTCAGTGGG

Şekil 3.3. *XPO5*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs11077'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT_009755.19

AGGAGTACCTGAAAACGTGGGTAACATGGACCATTTTCCCTTGCGTATCAACTTCACACTAAGCATCTA
ACATTCAAACAAAAAGTGCAAAATTTGTAATTATTTTAAACAGCAAGAATTCCTAACCTCC TGCCATCC
ACTGATGTTCCATCCTGTTTGAAGTTCTACATTAAAAACATGATTACTTTTGCCATAAAAAGAAAATATTAC
CCTTAAAATATCTATTTGATATGTACA AACCACATTTTTATTCTGACAGGTCA CAGATTTTGAGCAAGTG
CTTCCCTAGGTGACCCTACCTAGCCAATATGAAGGTGGAGCAAACACTGCTTTAGCTTAACTGCACTAAT
ATTTACACCATGTAACCCCTTCTAAC

Şekil 3.4. *RANa* ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs14035'nin (C>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NG_016311.1

TTATTCAAATGTAATTAACAACCATATAGGTAATAAACATGACATGAGTTTCTCTTCTGCAGATAATG
CAAATGGGTAAAGACTCTTAACATAATTTAGATGCAGTTAAAAAAGGTA TCAAGGTCTCAGTTTGGT
GGCTTCAATCTGTGTA AAGGGATTAG CACCCTAACAGAGCAAGATCCAATATTTTAAATCAACGGGGC
CTTGTGCATGAACTGCGCTCGATCTGGATTCCAGTGATCCTCTGCAGTGCCACCTGCCTCCAGGGAGCG
ACTGAAGAAGCCGACTGCCG

Şekil 3.5. *DICER1*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs3742330'nin (A>G) yer aldığı bölgenin dizisi.

NG_016311.1

CGCAAAAACTAAAACTACAATTAGTTCCAAAATTTTATACATATGTTAAATGTTTTATTCTGTTATCTA
TCCTGTTATCAACCAAATTTAAATTCTGCCTTCAATTCATTCCACTCACTAACTTTAAGTCTTCCT
TTCGATTTAAATAATTTTCCCCTTAATTTTTTTTTGTTTTGTTTCTTGTGTTTGAATTTTAA
AAAGCGGTTTCAGCTATTGGGAACCTGAGGTTGATTAGCTTTGAGGCTTCGGAGGGCTCTTCTTGCTGCTGCAGATTTG
GCAATCCTGTAACCTCGACC

Şekil 3.6. *DICER1*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs13078'nin (A>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NT_029419.12

AAAGGTTTCACAAAAGAAGCAACACCTGAAGGGAGGTGAAGGACGACCTAGGAAAAGGAAGCAAGTTCTG
TGTCACGGAGGCCCAAGGGCAAGGGCTTAGGCTGTGGGTTGAGGGGACTGTCTGAGACGGACTTAAACC
TGCACCAGCTCCAGAGCCCTGCGGAACAGAGATCGGTCCCCTCCGGCTGTAGGTAAGGCCACCCCTCC
CAGACCGCAAAGAGCCAGGATCCGACGGCAGCCTCTCCGGACCAATCACAACCTTCCTTCATCAAGGAGG
CGGGTTCGGGGGGGCTGAC

Şekil 3.7. *TARBP2*'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs784567'nin (C>T) yer aldığı bölgenin dizisi.

NT_032977.9

GTGCGAAGCAGGCGATGGCCAGACTTTGATCTCAATCCCATTGTAGAAGTGTTCCTCCCGCATGTCCCA
GACACCCTGATTGGGTGTGGCAATGGCCCCGGTCTGGGGATAGGTAGAGGGGGCGCCTAGGTGAGCCTCA
GTAGAGTCAGGTGGGTAGGGGAGCAAAGCCCTGGCTATACAACCAACCACCCCATATGCCCGGAGA
TGTTGTCTGGCCCTGACCCTGCTCACCCGGCCCGCTACTGCAAGATGGGCGCCGGCAGCACTCGCCCTG
TCACCTCCGTCATGTCATCC

Şekil 3.8. *AGO1*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs595961'nin (A>G) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NW_001839140.1

ACGAAATCCTTGCAACAAAGTTCCCCAACACAGCGCTCAAAGGAGCTGAAGGCGGGCTGAGGGCAGCCAG
TGATGACAGAGCCTTCTGGGCCTTTGCTGAGGCGTGCAGTCGCTGACAGCAGGGCAGTTGGGCCTCAGGG
ATTTCCGGCCAAAACGAGTTTTGGGATATGTGAAGGAGACAGGGGCAGAGAGAGAGGTGGGCATCTGC
GAACGGGAAGATTGATGAGGTTGCATGGTTCATAAATAGGAAAGTGGTAACATTCATGATTATTTAAAA
ATTTCTTGAAATACTACAG

Şekil 3.9. *AGO2*'ye ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs4961280'nin (A>C) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT_032977.9

TCTCTGCCACTTTTCTTGCTGTGGTCTTCTGCTCAAATATCAGCTTTTCAAAGAGGTCTTGAACACCCT
AAGACAGCTCTGTCATCCTCTCTGCTGCCTGGCCTTTCCAGCACTCTCTTGTGTTTGGCTTATTTTTTCT
TTATGATACTTATACCTACCTGAAATTATATGTCTCTGCTGTCTCCACACTCTATGAGGACAAGAAC
CTATTCTGTCTTGTCTCTCTGTCATCCCTAGTGGGAAAACAATCTGACACATAGGAAATGTTCAATAT
TTATCAAATGATTGAGCTCC

Şekil 3.10. *GEMIN3*'e ait Real Time PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan rs197388'nin (A>T) yer aldığı bölgenin eşlenik (revers) dizisi.

NT_010718.16

GGTGGAGAGTTGGAGTGGCTGTTACTACTCGATCTCAGGGGGAGGAGACAGGCACGCGATGTTTGTGTTT
TGTC AAGCACAGATTGCAAGCTCGGGGTCCAGCGTAAACCC **CACCATGTTTGGGCTCACAC**GGCGCATTT
TCTGGGGAGGAC **CAGCCGTCAAAAAG** **GTCTAGGATC**CGGAACGCTGCTGTCTGGAGGGGGCGGCGCGGC
AGGAGCGCG **TGAGGGACTGTATGTGGCG**CGAGCTGGGCGGGTGGGAGTGGAAGCCTCGCGTGGTGC
CGCGCTGGGTGGTGGGCGTC

Şekil 3.11. *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. Her prob 5' ucunda Yakima Yellow veya FAM ile işaretlenmiş floresan ışımaya yapabilmeyen boya ve 3' ucunda ise bu ışımamın gerçekleştiği dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki “quencher” (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. 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 (T_m) artırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışıldı (Çizelge 3.2-11). Her bir pdC eklenmesiyle T_m yaklaşık 2.8°C yükselmektedir. Prob dizilerinde altı çizili nükleotid polimorfik alleli belirtmektedir. Yakima Yellow VIC'e alternatif olarak özel geliştirilmiş bir boyadır. 530,5 nm maksimum absorpsiyon ve maksimum emisyon 549 nm ile FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer; Floresan Rezonans Enerji Transferi) teknolojisini kullanan florofor ışımaya algılayıcılarının tamamıyla uyumludur. Eclipse® Dark Quencher (EDQ) ve Black Hole Quencher™ (BHQ) ile en iyi sonuç elde edilebilir (89).

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	rs10719
Forward Primer	5'-CATCCAGCTAAAAACAGATCATTA AAC-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)TTAATTC(pdC)CTAAAAG(pdC)GCCT-BHQ-1-3'		
Prob G	5'-FAM-TCTTAATGC(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	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	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-1-3'		
Prob A	5'-FAM-C(pdC)TGTTTGAAGTT(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-AAGGGATTAGCA(pdC)C(pdC)TAA(pdC)AGA-BHQ-1-3'		

Çizelge 3.7. *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	T>A	rs13078
Forward Primer	5'-TTAAATTCTGCCTTCAATTCATTCC-3'		
Reverse Primer	5'-CCCAATAGCTGAAACCGCTTT-3'		
Prob T	5'-Yakima Yellow CT(pdC)A(pdC)TA <u>I</u> CAA(pdC)TTTAAGT(pdC)TT(pdC)CTT-BHQ-1-3'		
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. *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>TARBP2</i>	5'-UTR	C>T	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	rs595961
Forward Primer	5'-CAATGGCCCGGTTCTGG-3'		
Reverse Primer	5'-AGGGGCTTTTGCTCCCCTA-3'		
Prob T	5'-Yakima Yellow-G(pdC)C <u>I</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'-CCTCTCTCTGCCCCGTCT-3'		
Reverse Primer	5'-CAGTTGGCCTCAGGGATTT-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'-CCCAGCACTCTCTTGTGTTTGCT-3'		
Reverse Primer	5'-AGACAGAATAGGTTCTTGTCTCATAGAGT-3'		
Prob A	5'-Yakima Yellow- ATTATATGT(pdC)T <u>A</u> (pdC)TGC(pdC)TGT(pdC)T(pdC)C-BHQ-1-3'		
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'		

3.4.3. Real Time PCR Yöntemiyle Genotipleme Deneyi

Real Time PCR Genotipleme deneyi Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real Time PCR cihazı üzerinde gerçekleştirildi. Allele özgün dizayn edilen hibridizasyon problemlerinin her bir reaksiyon döngüsündeki floresan ışınması ölçülerek farklı allelleri taşıyan oligonükleotidlerin amplifikasyon miktarları belirlendi. Özgün prob çifti hedef bölgede yer alan polimorfik allele hibridize olabilen iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır. Hedef DNA bölgesine hibridize olan probun 3' ucunda quencher 5' ucunda floresan ışınma yapan boya bulunmaktadır. Prob serbest haldeyken floresan ışınma quencher tarafından söğürüleceğinden emisyon bir bakıma engellenmiş olur. Bu iki molekül birbirlerine çok yakın hibridize olduklarında Real Time PCR sisteminin ışık kaynağı donör boyayı uyarır ve uzun dalga boyunda floresan ışınma gerçekleşir. Gerçekleşen bu olaya FRET adı verilir.

Öncelikle Real Time PCR reaksiyon miksi 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarına dağıtıldı. Hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını belirlemek için her bir reaksiyon tabağında örnek DNA içermeyen negatif kontrol

kuyucuğu kullanıldı. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu plate için Microamp® Real Time PCR Film (Applied Biosystems) ile kuyucukların üzeri kaplanmıştır. Isı bloğuna yerleştirilen plate daha önceden hazırlanan yürütme metodu şablon dosyası açılarak reaksiyon başlatılmıştır. Yaklaşık iki buçuk saat süren deneyin ardından multicomponent grafikleri üzerinden genotip tayini yapılmaya çalışılmıştır. Her bir polimorfizm için şablon dosyada kayıtlı aşağıdaki Real Time PCR şartları kullanılmıştır:

60 °C’de	1 dakika ön PCR okuma	(1 döngü)
95 °C’de	10 dakika AmpliTaqGold® DNA Pol aktivasyon	(1 döngü)
95 °C’de	15 saniye denatürasyon	(40 döngü)
60-65 °C’de	1-1.5 dakika bağlanma/uzama	(40 döngü)
60 °C	1 dakika PCR sonrası okuma	(1 döngü)

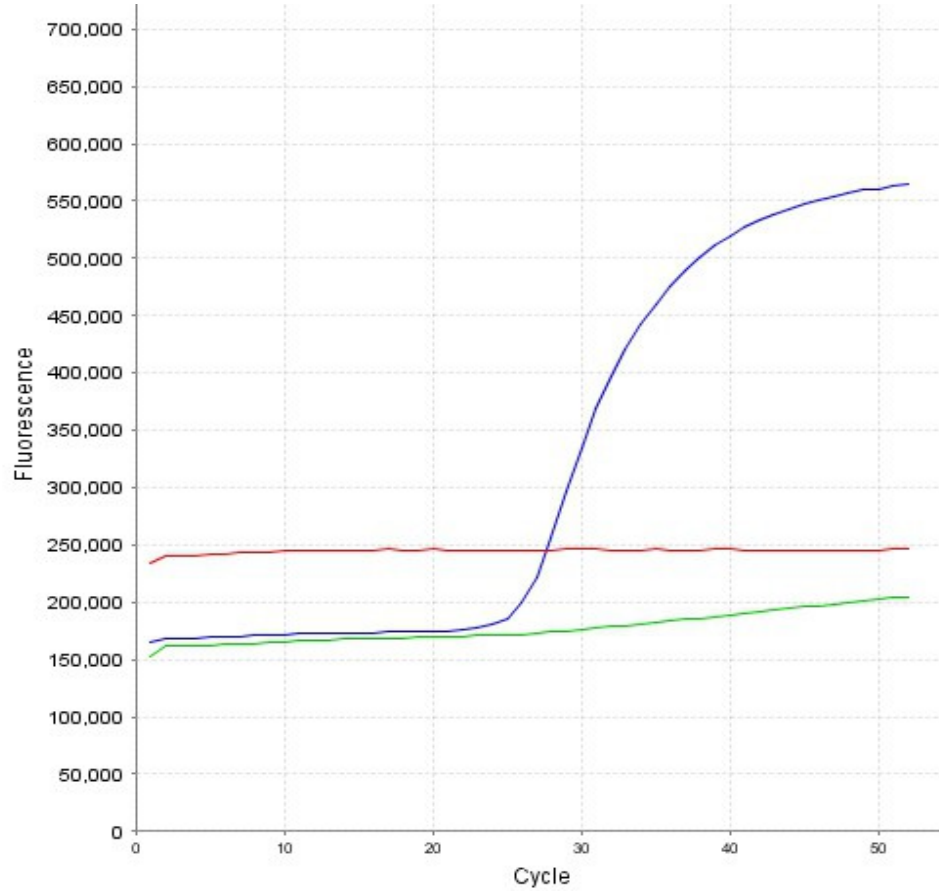
Çizelge 3.13. Genotipleme deneyinde her bir örnek için Real Time PCR karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı.

Reaksiyon Bileşeni	
Genomik DNA	2 µl
2X TaqMan Master Mix	12,5 µl
Primer-F	900 nM x 2,5 µl
Primer-R	900 nM x 2,5 µl
Prob T (FAM)	200 nM x 0,8 µl
Prob G (Yakima Yellow)	200 nM x 1,6 µl
Steril distile H ₂ O	3,1 µl
Toplam Hacim	25 µl

3.4.4. Genotipleme Deneyinin Ardından Genotip Tayini

SDS 2.0.3 yazılımı ile logaritmik çizelgede gerçek zamanlı çoğalım eğrilerinin analizi yapılarak genotipler belirlendi. Real Time PCR cihazı ile elde edilen amplifikasyon eğrileri ile örneklerin genotipi tayin edildi. Polimorfik allelleri taşıyan ve 5` ucunda prob bağlı DNA oligonükleotidin floresan ışığa miktarının birim PCR termal döngüsüne göre artış eğrisinin Şekil 3.12'dekine benzer bir şekilde sigmoidal olması

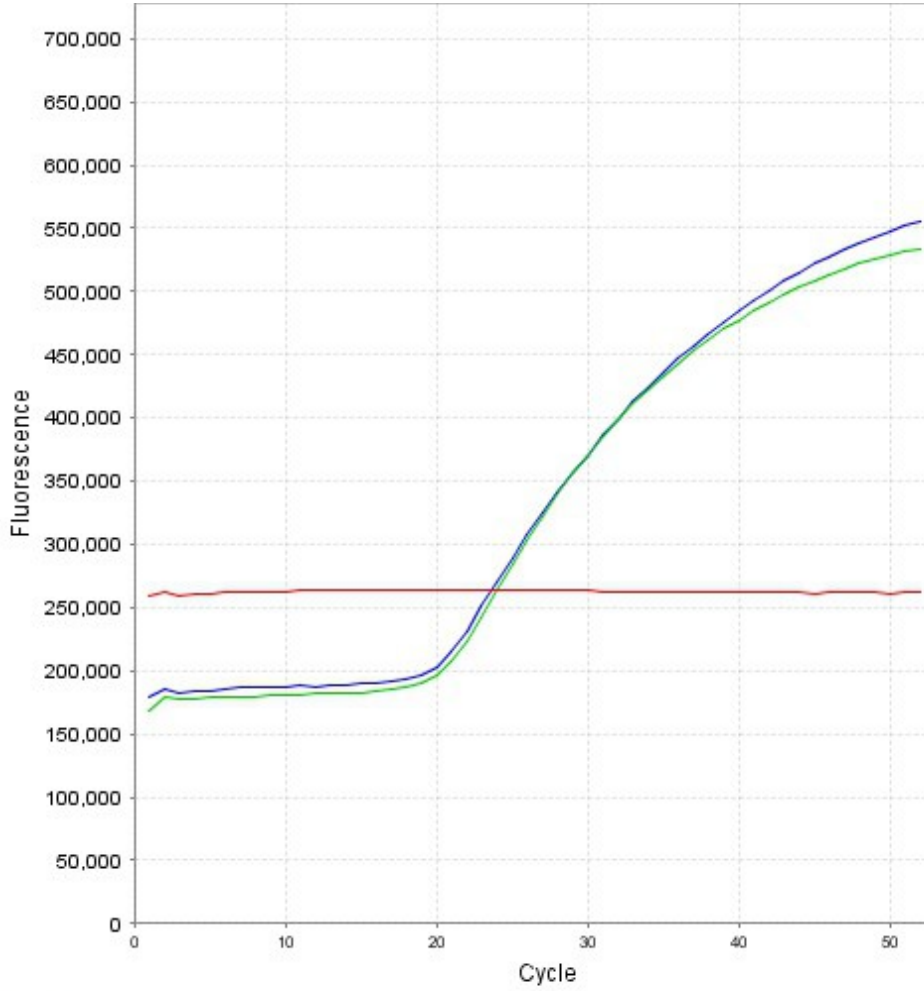
beklenmektedir. Çünkü DNA çift zincirli moleküler yapıya sahip olduğundan, her bir döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkmaktadır ve bunun sonucu olarak üssel bir fonksiyon grafiği elde edilmesi gerekir. Ancak reaksiyon sonunda ortamdaki PCR bileşenleri tükeneceğinden eğri plato evresine girer ve yatay seyreder.



Şekil 3.12. *GEMIN3* rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot TT genotipi.

Şekil 3.12'de mavi renkli eğri T allelini taşıyan DNA fragmanın, yeşil renkli eğri A allelini ve kırmızı renkli yatay çizgi arka plandaki ışımaya belirten ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyayı temsil etmektedir ve analiz sırasında floresan ışımının normalize edilebilmesi için gerekli referans ışımaya yapar. Bu çizgi arka plandaki bazal düzeydeki floresan ışımaya temsil etmektedir. ROX ışımaya bağlı olarak da her deneysel setup otomatik kendine bir bazal seviye belirlemektedir. A allelini taşıyan prob Yakima Yellow'la ve C alleli ise FAM (5-Karboksifloresin) ile

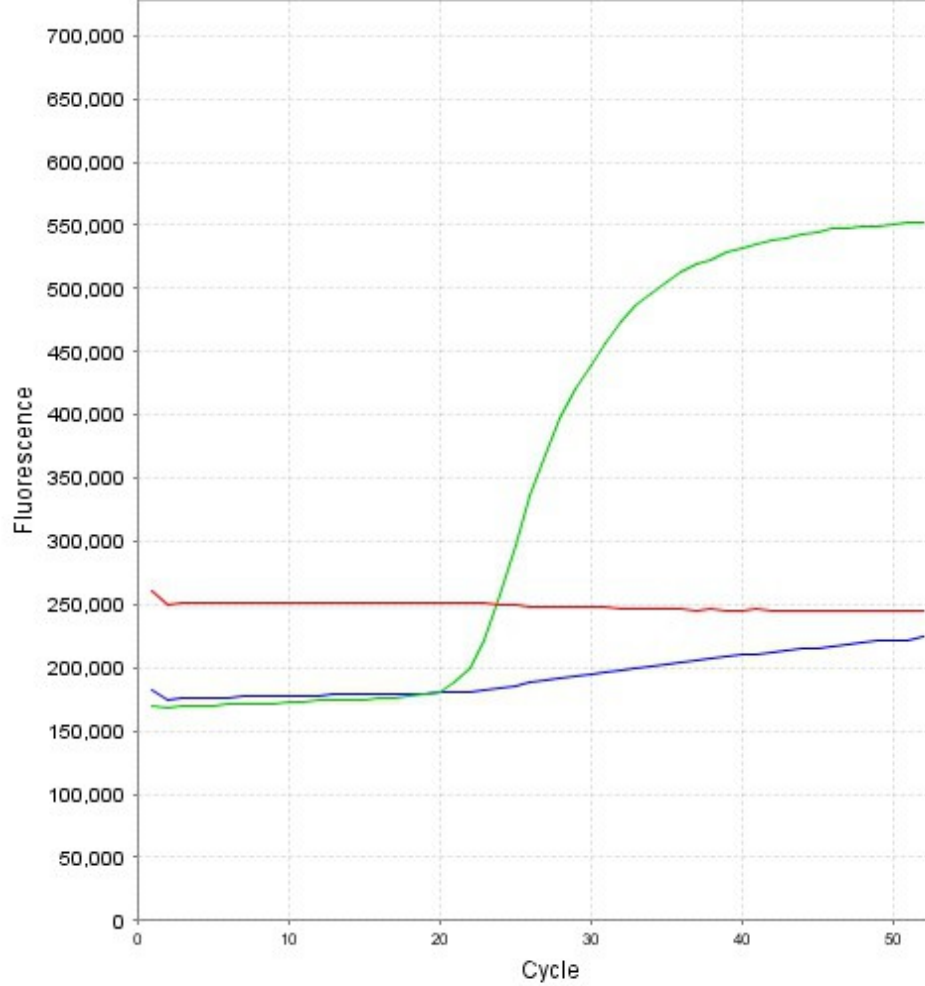
işaretlenmiştir. Bu durumda genotip heterozigot CA olarak değerlendirildi. Şekil 3.13'te Şekil 3.14'e kıyasla daha erken bir döngüde floresan ışımaya eşik değeri aştığı için iki kuyucukta yer alan DNA örneklerinin konsantrasyonları arasında bir farklılık olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.13. *GEMIN3* rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde heterozigot TA genotipi

GEMIN3 rs4961280 polimorfizmi için genotipleme deneyi sonunda elde edilen yarı logaritmik floresan ışımaya Real Time PCR döngü sayısı multicomponent grafiği Şekil 3.14'teki gibi elde edilmiştir. A allelini taşıyan prob Yakima Yellow'la işaretlenmiş ve T alleli FAM ile işaretlenmiştir. Atasal allel olan T için eşik değeri geçebilecek

oranda ışına ölçülemediğinden grafikte sadece A allelinin amplifikasyon eğrisini görmekteyiz. Bu durumda rs4961280 için genotip homozigot AA olarak değerlendirildi.



Şekil 3.14. *GEMIN3* rs4961280 polimorfizmi T>A için genotipleme deneyi sonucunda elde edilen multicomponent grafiğinde homozigot AA genotipi

3.5. Genotip Verilerinin Düzenlenmesi ve İstatistiksel Analizi

Alkol bağımlısı grubun ve kontrol grubunun genotip ile allel verileri “Ki-kare (Chi-square)” veya “Likelihood ratio” testleri ile analiz edilmiştir. Genotip ile allel frekansı bakımından vaka ve kontrol gruplarının “Hardy-Weinberg” dengesinde olup olmadıkları kontrol edildi. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verildi. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış ve analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vaka-Kontrol Grubuna Ait Genotip Dağılımları ile Allel Frekansları

Bu vaka kontrol çalışmasında 123 alkol bağımlısı ve 135 sağlıklı kontrole ait periferik kandaki lökositlerden izole edilen DNA örnekleri üzerinde miRNA oluşum yolağı gen polimorfizmlerinin Real Time PCR ile genotipleme yapılmıştır. Ardından alkol bağımlısı (vaka grubu) ve sağlıklı bireylerden (kontrol grubu) elde edilen genotip ve allel dağılımları uygun istatistiksel yöntemlerle analiz edilip hastalık durumuyla ilgili polimorfik alleller arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı değerlendirildi. Çizelge 4.1`de gösterildiği üzere vaka ve kontrol grubuna ait yaş dağılımları ile cinsiyet dağılımları (p=0,295) benzerdir. Çizelge 4.2 ile Çizelge 4.3`te sırasıyla polimorfizmlere ait genotip dağılımları ve allel frekansları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Vaka ve kontrol gruplarının demografik özellikleri.

	Alkol Bağımlısı (n=123)	Sağlıklı Kontrol (n=135)
Cinsiyet (K/E)	8/115	15/120
Yaş (ortalama±ss)	35.19±10.18	34.53±14.22
Kısaltmalar: E erkek, K kadın, ss standart sapma		

Çizelge 4.2. Vaka ve kontrol gruplarının ilgili gen bölgelerindeki polimorfizmlerin genotip dağılımları.

Gen Adı	SNP Referans No	Majör>Minör Allel	Genotip	Alkol Bağımlısı	Sağlıklı Kontrol	P-Değeri
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	rs10719	C>T	CC/CT/TT	50/43/15	52/57/14	0,587
<i>DGCR8</i>	rs1640299	G>T	GG/GT/TT	49/39/33	27/64/27	0,002*
<i>XPO5</i>	rs11077	A>C	AA/AC/CC	53/47/21	45/58/16	0,292
<i>RAN</i>	rs14035	C>T	CC/CT/TT	48/42/9	63/45/11	0,779
<i>DICER1</i>	rs3742330	A>G	AA/AG/GG	97/21/3	89/29/2	0,401
<i>DICER1</i>	rs13078	A>T	TT/TA/AA	72/19/3	90/23/3	0,962
<i>TARBP2</i>	rs784567	C>T	CC/CT/TT	37/39/42	32/51/31	0,169*
<i>AGO1 (EIF2C1)</i>	rs595961	A>G	AA/AG/GG	69/49/0	95/26/0	0,001*
<i>AGO2 (EIF2C2)</i>	rs4961280	A>C	AA/AC/CC	73/35/2	105/26/2	0,085
<i>GEMIN3 (DDX20)</i>	rs197388	A>T	TT/TA/AA	59/25/4	80/24/7	0,504*
<i>GEMIN4</i>	rs910924	C>T	CC/CT/TT	73/19/2	59/32/4	0,064

* Vaka veya kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesinde değildir.

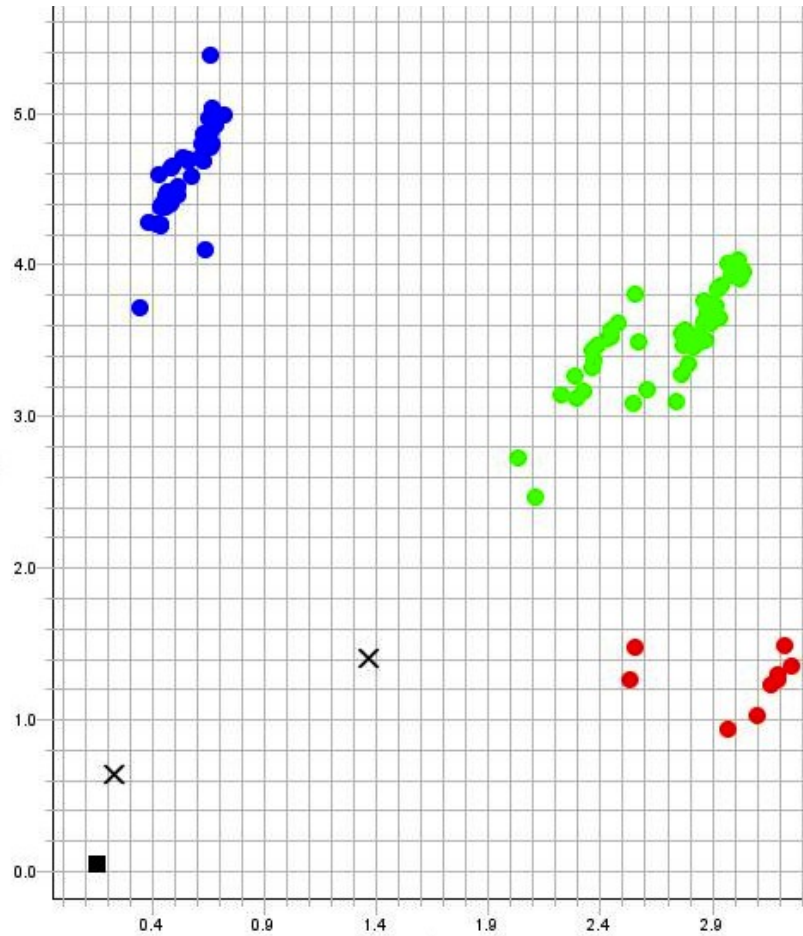
Vaka ve kontrol gruplarının *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *TARBP2*, *AGO2*, *GEMIN3* ve *GEMIN4* polimorfizmlerinin genotip dağılımları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (Çizelge 4.2). Hasta grubunda *DGCR8*, *TARBP2*, *GEMIN3* ve *AGO1*'e ait genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Kontrol grubunda ise sadece *GEMIN3*'e ait genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesinde değildir. *AGO1* rs595961 (A>G) bakımından alkol bağımlısı (p=0,004) grup Hardy-Weinberg dengesi göstermezken kontrol (p=0,185) grupları Hardy-Weinberg dengesindedir. Gruplardan biri Hardy-Weinberg dengesinde, biri değilken karşılaştırma yapılması uygun değildir. Fakat *AGO1* rs595961 (A>G) bakımından AG genotipi alkol bağımlısı olma riski arasında anlamlı bir ilişki vardır (p=0,001). *DGCR8* rs1640299 bakımından alkol bağımlısı grup Hardy-Weinberg dengesi göstermezken (p=0,001) kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesindedir (p=0,357). *DGCR8* GG genotipi ile alkol bağımlısı olma riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p=0,002).

Çizelge 4.3. Vaka ve kontrol gruplarına ait ilgili gen bölgelerindeki polimorfizmlerin allel dağılımları gösterilmiştir.

Gen	SNP referans no	Majör>Minör allel	Alkol Bağımlısı	Sağlıklı Kontrol	P-Değeri	MAF Hastalarda Gözlenen / Referans (örneklem genişliği)*
<i>RNASEN (DROSHA)</i>	rs10719	C>T	143 / 73	161 / 85	0,864	0,338 / 0,470 (1029)
<i>DGCR8</i>	rs1640299	G>T	137 / 105	118 / 118	0,147	0,434 / 0,392 (857)
<i>XPO5</i>	rs11077	A>C	153 / 89	148 / 90	0,814	0,368 / 0,380 (831)
<i>RAN</i>	rs14035	C>T	138 / 60	171 / 67	0,622	0,303 / 0,297 (650)
<i>DICER1</i>	rs3742330	A>G	215 / 27	207 / 33	0,622	0,112 / 0,148 (223)
<i>DICER1</i>	rs13078	A>T	163 / 25	203 / 29	0,808	0,133 / 0,110 (241)
<i>TARBP2</i>	rs784567	C>T	113 / 123	115 / 113	0,582	0,521 / 0,246 (538)
<i>AGO1 (EIF2C1)</i>	rs595961	A>G	187 / 49	216 / 26	0,003	0,208 / 0,471 (1031)
<i>AGO2 (EIF2C2)</i>	rs4961280	A>C	181 / 39	236 / 30	0,043	0,177 / 0,144 (314)
<i>GEMIN3 (DDX20)</i>	rs197388	A>T	143 / 33	184 / 38	0,673	0,188 / 0,225 (492)
<i>GEMIN4</i>	rs910924	C>T	165 / 23	150 / 40	0,021	0,122 / 0,166 (364)

MAF: Minör Allel Frekansı *dbSNP (1000 Genom Projesindeki örneklem genişliği)

Vaka ve kontrol gruplarının *RNASEN*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *TARBP2* ve *GEMIN3* polimorfizmlerinin allel frekansları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.3). Tablo üzerinde allel frekansı ile alkol bağımlılığı arasında anlamlı ilişki bulunan polimorfizmlerin P-değeri koyu olarak yazılmıştır. *GEMIN4*'e ait rs910924 polimorfizmi için atasal olmayan T alleli sağlıklı bireylerde hastalara oranla anlamlı düzeyde daha sıklıkla gözlenmiştir ($p=0,021$). *AGO1* ve *AGO2*'ye ait sırasıyla rs59596 ($p=0,003$) ve rs4961280 ($p=0,043$) ile hastalık durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca *AGO1* rs595961 bakımından alkol bağımlısı grup “Hardy-Weinberg” dengesi göstermemiştir. Buna rağmen allel frekansı hesaplanmış ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Öte yandan, *AGO2* genotip dağılımında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir, fakat *AGO2* rs4961280 için C atasal alleli sağlıklı kontrol grubuna kıyasla alkol bağımlısı grupta ($p=0,043$) daha az sıklıkta olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. *RNASEN* (*DROSHA*) rs10719 polimorfizmi C>T için genotipleme deneyi sonrasında elde edilen örnek allelik diskriminasyon grafiği.

Şekil 4.1'de 96 kuyucuklu reaksiyon tabağındaki genotip tayini yapılamayan kuyucuklar çarpı işareti (X) ile işaretlendi. Grafiğin sol alt köşesindeki siyah kare negatif kontrol kuyucuğunu temsil etmektedir. Mavi renkli daireler CC genotipinde, kırmızı renkli olanlar ise TT genotibindeki kuyucukları gösteriyor. Allelik diskriminasyon grafiğinde yatay eksene yakın ve sağ köşeye doğru homozigot TT olarak tayin edilen kuyucuklar bulunurken düşey eksene yakın sol üst köşeye yayılan grupta homozigot CC genotipli örneklerin kuyucukları bulunuyor. Yatay eksen T allelini ve düşey eksen C allelini temsil etmektedir. Allelik diskriminasyon grafiğinin köşegeni üstünde yer alan yeşil renkli daireler heterozigot CT genotipli örneklerin bulunduğu kuyucukları belirtmektedir.

5. TARTIŞMA

Alkol bağımlılığı birden fazla genetik faktörün etkisinde ortaya çıkan ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu heterojen kompleks bir genetik hastalık olarak kabul edilmektedir. Şu ana kadar alkol bağımlılığının genetik altyapısını ortaya çıkarmaya çalışan araştırmalar bağlantı analizleri, aday gen yaklaşımı ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları olarak üç genel kategoriye ayrılabilir. Aday gen çalışmalarında da genellikle alkol metabolizmasından sorumlu enzimlere, dopaminerjik, serotonerjik ve diğer nörotransmitter sistemlerde görevli bileşenlere ait gen bölgeleri üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Vaka ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ile allel frekansı kıyaslaması yapılarak, genetik olarak düzensizlik riski taşıyan bireyler belirlenebilir. Öncelikle hipoteze dayalı bir aday gen grubu seçilir, ardından hasta ve kontrol grupları arasında bu gen grubundaki polimorfizmlerin allel frekanslarında bir farklılık olup olmadığı araştırılır. Bu araştırmada miRNA oluşum yolağındaki gen polimorfizmleri hücre içi miRNA seviyelerinde geniş çaplı değişime neden olup alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında rol alabilir hipotezinden yola çıkıldı. Aday gen grubu olarak *RNASEN*, *DGCR8*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1*, *AGO1*, *AGO2*, *GEMIN3*, *GEMIN4* ve *TARBP2* seçildi ve bu genlere ait polimorfizmler üstünde vaka kontrol çalışması yapıldı. Araştırmanın sonuçlarına göre; *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* ve *GEMIN3* polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile alkol bağımlısı olma riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. *AGO2* rs4961280 ve *AGO1* rs595961 G allelinin alkol bağımlısı olma riskini anlamlı oranda değiştirdiği bulunurken ($p=0,043$), *GEMIN4* rs910924 için T alleli ile alkol bağımlısı olma arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0,021$). *AGO1* rs595961 ($p=0,001$) ve *DGCR8* rs1640299 ($p=0,002$) genotip dağılımlarında hasta grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu bulundu.

Literatür taraması sonunda; şu ana kadar olgun miRNA oluşum yolağında yer alan gen polimorfizmleri ile alkol bağımlılığı riski arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. MikroRNA oluşum yolağı SNP'leri üzerinde yapılan vaka kontrol çalışmalarının tümü çeşitli kanser riskleri ile polimorfizmler arasındaki ilişkileri araştırmıştır. Farklı kanser tipleri üzerinde miRNA oluşum yolağındaki gen

polimorfizmleriyle ilgili yapılan vaka kontrol çalışmalarında miRNA oluşum yolağında yer alan gen polimorfizmleri ile kanser riski değişimi arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur (91-93). Bu çalışmaların sonuçları farklı çalışmalarda tekrarlanırken bazı ilişkiler tekrarlanamamıştır.

AGO proteinleri, GEMIN3 ve GEMIN4'le beraber miRNA ile bütünleşerek karmaşık bir ribonükleoprotein yapısını oluştururlar (90). Şekil 2.3'te gösterildiği üzere bu yapıya RISC kompleksi adı verilir ve olgun miRNA'nın oluşumundan sorumlu önemli bileşenlerdir. GEMIN3 ve GEMIN4'ün pre-miRNA'nın işlenmesi sırasında prekürsör miRNA'nın RISC kompleksine yüklenmesinde kritik göreve sahip olduğu düşünülmektedir. *GEMIN4*'ün promotor bölgesinde yer alan rs910924 polimorfizminin fonksiyonel bir etkisi olduğu deneysel olarak gösterilmemiştir. Fakat bu polimorfizm promotor bölgede yer aldığı için *GEMIN4*'ün ekspresyon seviyesini etkileyebilir ve böylece olgun miRNA'nın hücre içi seviyesinde değişimleri tetikleyebilir. Bu durumun in vitro deneylerle GEMIN4 ekspresyon seviyelerinde değişimin olup olmadığı gösterilebilir. Özellikle alkol bağımlılığında rol alan miRNA'ların seviyelerinde değişimin olması bulgularımızı destekleyecektir. Böbrek hücreli kanser hastaları üzerinde yapılan bir vaka kontrol çalışmasında miRNA oluşum yolağında yer alan genlerin polimorfizmlerinin genotip dağılımları ile kanser durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu araştırmanın sonuçlarına göre *GEMIN4*'e ait 2 SNP (rs2740348 ve rs7813) böbrek hücreli kanser riskinde anlamlı oranda bir azalma ile ilişkili olduğu bulunmuş (91). Yemek borusu kanseri üstüne yapılan diğer bir vaka kontrol çalışması sonuçlarına göre de miRNA oluşum yolağında yer alan gen polimorfizmleri içinden *GEMIN4*'e ait rs197414 ile artmış yemek borusu kanser riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş (92). Prostat kanserli hastalarda yapılan bir vaka kontrol çalışmasında da *GEMIN4* rs7813 için TT genotipli bireylerde hastalığın daha ciddi seyretme riski olduğu, buna karşın rs3744741 T alleli taşıyanların ise kötü prognoza sahip olma açısından düşük risk grubunda olduğu rapor edilmiş (93). Yapılan diğer bir çalışmada ise artmış mesane kanseri riski ile *GEMIN3*'e ait rs197414 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş (11). Yumurtalık kanseri olan hastalar ve sağlıklı kontroller arasında yapılan çalışmada miRNA oluşum yolağında yer alan gen polimorfizmleri ile tedaviye yanıt, yaşam süresi ve kanser riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş. Araştırmada 13 adet polimorfizm ile anlamlı bir ilişki saptanmışken bunlar arasından

GEMIN4'ün rs2740351 ve rs7813 polimorfizmleri ile en kuvvetli ilişkinin olduğu rapor edilmiş (94). Fakat daha sonra yapılan geniş çaplı bir başka araştırmanın sonucuna göre *GEMIN4*'e ait rs2740349, rs2740351 ve rs7813 polimorfizmleri ile yumurtalık kanser riski arasındaki ilişkilerin şans eseri elde edildiği öne sürülmüş ve bu polimorfizmlerle herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamış (13).

MikroRNA'ların alkol yoksunluk sendromuyla ilişkili nöroadaptasyon sürecinde nasıl bir role sahip olduğu henüz ortaya çıkarılmamıştır. Ödül yolu olarak adlandırdığımız mezolimbik dopaminerjik nöronların bulunduğu bölgelerde merkezi sinir sistemindeki bileşenlerin miRNA aracılığıyla ekspresyonları denetleniyor olabilir. Ayrıca, alkole karşı gelişen tolerans bu denetleme yoluyla gelişiyor olabilir. Alkol bağımlılığı riski ile *GEMIN4* ve *AGO2* gen bölgeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunan polimorfizmleri taşıyan bireylerde hücre içi olgun miRNA düzeylerinde değişim ortaya çıkabilir. Fakat şimdiye kadar bu gen bölgelerindeki polimorfizmlerin fonksiyonel etkisinin olup olmadığı deneysel olarak ortaya konmamıştır. Bu polimorfizmlerin etkisiyle olgun miRNA seviyelerindeki dalgalanmalar transgenik hayvanlar üzerinde yapılacak araştırmalarla gösterilebilir. Daha önce nörotransmitter sistem reseptörlerinin alt birimlerini ve hücre içi sinyal moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimin alkole karşı gelişen yanıtta nasıl bir değişikliğe neden olduğu knock-out ve transgenik fareler üzerinde yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (95). Transkripsiyon faktörleri, kromatin modifikasyonu ve RNA işlenmesi aracılığıyla bağımlılık yapan maddelere karşı nöroadaptasyon geliştiği düşünülmektedir (18). MikroRNA'lar sinaptik plastisite üzerinde epigenetik mekanizmalar aracılığıyla veya transkripsiyon faktörlerini hedef alarak değişime neden olup, kalıcı bazı davranışsal değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Diğer yandan Şizofreni hastalık durumuyla süperior temporal gyrus ve dorsolateral prefrontal kortekste miRNA ekspresyonunda global bir artış olduğu gözlenmiş. Bu değişimin, klasik miRNA işlenmesindeki artışın ve *DGCR8* bileşenindeki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (96).

Genotip dağılımları bakımından *DGCR8* rs1640299 için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı düzeyde bir farklılık gözlenmedi. Bu polimorfizm gen bölgesi olarak 3'-UTR bölgesinde yer aldığı için mRNA stabilitesinde bir değişime neden olmuş olabilir. Ayrıca farelerde *DGCR8*'in tek kopya olması durumunda, işlevinde yetersiz kalması sonucunda miRNA ekspresyonunda azalmanın olduğu, sinirsel ve davranışsal

yetersizliklerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (97). Özellikle ilişkilendirme çalışmalarında nöropsikiyatrik hastalıklar ile 22q11.2 bölgesi arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. *DGCR8*'in komşuluğunda yer alan 22q11.21 bölgesindeki *HTF9C*'ye ait rs1633445 ile Şizofreni hastaları arasında dikkatini uzun süre odaklayamama arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (98). Şizofreni hastalarıyla yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasının sonuçlarına göre de Şizofreni ile ilişkili olduğu bulunan sekiz büyük delesyon arasından dördünün 22q11.2 bölgesini kapsadığı bulunmuştur (99). Ayrıca *DGCR8* ile *COMT* kromozomal lokasyon olarak birbirlerine yaklaşık 400 baz çifti kadar uzakta yer almaktadır. Alkol bağımlılığı riski ile anlamlı ilişki bulduğumuz SNP'lerin komşuluğundaki bazı lokusların beraber aynı haplotip üzerinde aktarılması hastalık riskinde değişime neden olmuş olabilir.

Model organizma olarak farelerin seçildiği bir araştırmada Ago2 eksikliğinde miRNA oluşum yolağında pre-miRNA oluşumunda aksaklığın olduğu ve ardından miRNA ekspresyonunda azalmanın gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca Ago2'nin seçici davranıp sadece bir grup miRNA'nın üzerinde etkisi olduğu sonucuna varılmış (100). Ago2 kokain bağımlılığında spesifik miRNA'ların oluşumunda yer alarak sinir hücrelerinin plastisitesinde belirleyici olan gen ekspresyonunda kalıcı bazı değişikliklere neden olarak kokain kullanımının arkasındaki motifin düzenleyicisi görevi görebilir (101). *AGO2* rs4961280 promotor bölgede yer aldığı için *AGO2* ekspresyonunda neden olacağı bir değişiklik ile alkol bağımlılığının gelişmesinde yer alan nöroadaptasyon süreçlerinde yaratacağı etkiler alkol bağımlılığının gelişmesine katkı sağlamış olabilir. Bununla ilgili model organizmalar üzerinde *AGO2* rs4961280 'nin fonksiyonel bir etkisinin olup olmadığı araştırılabilir.

Klasik miRNA oluşum yolağı basamaklarından bazıları atlanıp olgun miRNA oluşumu gerçekleşebilmektedir (102). Bu klasik olmayan yolla elde edilebilen olgun miRNA'lar eğer alkol bağımlılığının ortaya çıkmasına katkı sağlıyorsa klasik yolaktaki genetik değişimler sonucunda ortaya çıkabilecek hücre içi geniş çaplı miRNA değişiminin alkol bağımlılığının üzerinde etkisinin olduğu varsayımıyla çelişmektedir.

Alkole karşı gelişen toleransın ve ardından ortaya çıkan yoksunluk sendromunun nedeni olarak ödül yolu üzerindeki miRNA denetimi sorumlu olabilir. Öte yandan yaklaşık 35 miRNA'nın ekspresyon düzeyleri alkol bağımlısı gruba ve sağlıklı bireylerden oluşan gruba ait postmortem beyin örnekleri üzerinde yapılan kıyaslamaların

ardından alkol bağımlısı grupta miRNA ifadesinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. miRNA ekspresyonu farklılık gösteren miRNA'lar üzerinde online hedef bulma uygulamaları yardımıyla yapılan çalışmada ilgili miRNA'ların hedefinde ağırlıklı olarak nöronal plastisite süreçlerinde yer alan hücresel bileşenlerin olduğu bulunmuştur (103). Ayrıca bazı nöropsikiyatrik hastalıklarda miRNA disregülasyonu gözlenmiştir (96). Sonuçta miRNA disregülasyonu ile karakterize olan nöropsikiyatrik hastalıkların ortaya çıkmasında miRNA oluşum yolu polimorfizmleride pay sahibi olabilir.

Alkol bağımlılığı klinik tabloları açısından heterojen bir yapıya sahiptir. Bu yüzden alkol bağımlılığı farklı alt tiplere ayrılmaya çalışılmıştır. Cloninger sınıflandırmasına göre alkol bağımlılığı iki alt tipe ayrılmıştır. Bunlardan biri erken başlangıçlı olup antisosyal kişilik bozukluğuyla seyrettiği ve diğeri de geç başlangıçlı olup aşırı alkol içme problemlerine karşı suçluluk ve endişe duymanın görüldüğü alt tip olarak tanımlanmıştır (104). Bu çalışmada alkol bağımlılığının alt tiplerine bakarak hastalar sınıflandırılmamıştır. Bu yüzden alkol bağımlısı alt grupların genotip ve allel dağılımları ile arasındaki ilişki değerlendirilemedi. Ayrıca alkol bağımlısı grubun ilaç kullanma durumuyla ilgili elimizde bir veri olmadığı için hastaların ilaç tedavisine olan yanıtları veya hastalığın ciddi seyredip etmediği gibi değişkenler ile polimorfizmler arasında bir ilişkinin varlığı değerlendirilemedi. Bu saydığımız verilerin teminiyle yapılacak istatistiksel analizler sonucunda alkol bağımlılığının alt tipleriyle bu polimorfizmler arasındaki ilişkiler bulunabilir. Araştırmanın başında hasta örneklemini oluşturulurken kişilik bozukluğu ve nöropsikiyatrik hastalığa sahip olma dışlanma kriteri olarak kabul edildi. Fakat bu kriterlere uyulmadıysa bu durumda psikiyatrik hastalığın ya da kişilik bozukluğunun sonucunda gelişen alkol bağımlılığı tipleri ile klasik alkol bağımlısı grubun karışması genetik araştırma açısından vaka grubunun homojenliğini ortadan kaldırmaktadır. Etnik köken ve cinsiyet dağılımı bakımından hasta grubumuz ve sağlıklı kontroller birbiriyle uyumludur.

Örnekleme genişliğinin büyük olmamasından dolayı allel frekansı ve genotip dağılımları ile hastalık durumu arasında şans eseri bir ilişki bulunmuş olabiliriz. Bu yüzden anlamlı bulduğumuz ilişkilerin doğrulanması açısından bu araştırmadan tamamen bağımsız daha geniş bir örneklem grubunda bulguların tekrarlanması gereklidir. Ayrıca genotipleme sonuçlarının tutarlı olduğunu göstermek açısından bir grup örnek üzerinde Real Time PCR veya farklı bir yöntem olarak kütle spektrometresi,

sekanslama veya RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analiziyle ilgili polimorfizmler için bir dublikasyon çalışması yapılabilir.

Bu araştırma alkol bağımlılığında miRNA'ların hangi görevle yer aldığını ve düzensizliğin etiolojisini açıklamada yol gösterici olacaktır. Alkol bağımlılığı tamamıyla genetik faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan bir hastalık olmadığı için çevresel faktörlerin hasta grubunda alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında nasıl bir tetikleyici görevi olduğu bilinmemektedir. Genetik araştırmalar nöropsikiyatrik hastalıkların etiolojisinde yer alan yolların keşfedilmesine yardımcı olacaktır. Bu sayede elde edilen bilgiler hastalıkların tanı ve tedavi süreçlerine de önemli katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. *RNASEN*, *XPO5*, *RAN*, *DICER1* ve *GEMIN3* polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımları ile alkol bağımlısı olma riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. *AGO2* rs4961280 ve *AGO1* rs595961 G allelinin alkol bağımlısı olma riskini anlamlı oranda değiştirdiği bulunurken ($p=0,043$) *GEMIN4* rs910924 için T alleli ile alkol bağımlısı olma arasında da anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,021$).

2. *AGO1* rs595961 ($p=0,001$) ve *DGCR8* rs1640299 ($p=0,002$) genotip dağılımlarında hasta grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu bulundu.

3. Alkol bağımlılığı multigenik kalıtım gösterdiğinden tek bir genetik faktörden ziyade birden fazla lokus hastalığın etiyolojisinde yer aldığı için tüm genomu kapsayacak şekilde SNP belirlenmesi ya da alkol bağımlısı bireylerin tüm genomunun sekanslanması ile alkol bağımlılığı riski ile ilişkilendirilebilecek lokuslar ortaya çıkarılabilir. Alkol bağımlılığının altında yatan genetik faktörlerin bulunması ile beraber farklı ilaç hedefleri bulunabilir ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilir.

4. miRNA oluşum yolağında alkol bağımlılığı riski ile anlamlı bir ilişki bulunan lokuslar ile miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyonun olup olmadığı transgenik hayvanlar üzerinde yapılacak araştırmalarla ortaya çıkarılabilir.

5. Kompleks hastalıkların altında yatan faktörlerin ortaya çıkarılması için sistem biyolojisinden yararlanılması son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Sistem biyolojisinin geliştirdiği yeni analiz yöntemleriyle alkol bağımlılığı gibi kompleks hastalıkların yazılımlar aracılığıyla (in silico; in silico) modellenmesi yapılarak hücre içindeki farklı biyolojik olayların birbiriyle etkileşerek nasıl alkol bağımlılığına neden olduğu açıklanmaya çalışılmaktadır.

6. Yeni nesil sekanslama teknolojileriyle artık tüm genomun sekanslanması daha kısa sürede, daha doğru bir şekilde ve daha az bir maliyetle tamamlanabilmektedir. Alkol bağımlısı bireylerin tüm genom sekanslamasıyla elde edilecek sekans bilgilerinin analiz

edilmesi aday risk lokusların tespit edilebilmesine olanak sağlayacaktır. Geniş bir hasta örnekleminde genomun tümünü kapsayacak bir DNA sekanslamasının yapılması alkol bağımlılığı riski ile ilişkili olabilecek popülasyonda sık veya ender rastlanan alleller ile kopya sayısı varyasyonları (insersiyon/delesyon) ortaya çıkarabilir. Gelecekte kişilerin tüm genom sekans bilgilerinden yararlanarak alkol bağımlılığı gibi kompleks genetik hastalıklarda risk teşkil eden lokuslar belirlenebilirse kısa sürede tanı konması ve kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Morse RM, Flavin DK.** The definition of alcoholism. The Joint Committee of the National Council on Alcoholism and Drug Dependence and the American Society of Addiction Medicine to Study the Definition and Criteria for the Diagnosis of Alcoholism. *JAMA*, **1992**; 268(8): 1012-4.
2. **Anderson P, Baumberg B.** Avrupada Alkol Kullanımı Halk Sağlığı Bakış Açısıyla: Avrupa Komisyonu için Rapor. http://ec.europa.eu/health-eu/doc/alcoholineu_sum_tr_en.pdf, (Çeviri) Erişim Tarihi: 06.05.2012.
3. **Prescott CA, Kendler KS.** Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *American Journal of Psychiatry*, **1999**; 156(1): 34-40.
4. **Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM.** Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*, **2005**; 123(6): 1133-1146.
5. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **2004**; 116(2): 281-97.
6. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **2005**; 120(1):15-20.
7. **Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, Siegelmann HT, Treistman SN.** Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron*, **2008**; 59(2): 274-287.
8. **Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD.** Patterns of Gene Expression in the Frontal Cortex Discriminate Alcoholic from Nonalcoholic Individuals. *Neuropsychopharmacology*, **2006**; 31(7): 1574-1582.
9. **Wu Q, Law PY, Wei LN, Loh HH.** Post-transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor (MOR1) via its 3' untranslated region: a role for microRNA23b. *FASEB Journal*, **2008**;22(12):4085-4095.
10. **Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, Willoughby D, Wahlestedt C, Konkright MD, Kenny PJ.** Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, **2010**; 466(7303):197-202.
11. **Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X.** Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Research*, **2008**; 68 (7): 2530-2537.
12. **Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, Wu X.** Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Molecular Carcinogenesis*, **2010**; 49 (2): 183-9.

13. **Permeth-Wey J, Chen Z, Tsai YY, Lin HY, Chen YA, Barnholtz-Sloan J, Birrer MJ, Chanock SJ, Cramer DW, Cunningham JM, Fenstermacher D, Fridley BL, Garcia-Closas M, Gayther SA, Gentry-Maharaj A, Gonzalez-Bosquet J, Iversen E, Jim H, McLaughlin J, Menon U, Narod SA, Phelan CM, Ramus SJ, Risch H, Song H, Sutphen R, Terry KL, Tyrer J, Vierkant RA, Wentzensen N, Lancaster JM, Cheng JQ, Berchuck A, Pharoah PD, Schildkraut JM, Goode EL, Sellers TA.** MicroRNA Processing and Binding Site Polymorphisms are not Replicated in the Ovarian Cancer Association Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **2011**; 20 (8): 1793–1797.
14. **Edwards G, Marshall EJ, Cook CCH.** *The Treatment of Drinking Problems: A guide for the Helping Professions*. 4th edition, Cambridge University Press. Cambridge. **1982**.
15. **American Psychiatric Association (APA).** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision*. APA. Washington DC. **2000**.
16. **Gonzales RA, Job MO, Doyon WM.** The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacology and Therapeutics*, **2004**; 103(2): 121–146.
17. **Di Chiara G, Bassareo V.** Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*, **2007**; 7(1): 69–76.
18. **Nestler EJ.** Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, **2001**; 2(2): 119–128.
19. **Koob GF, Sanna PP, Bloom FE.** Neuroscience of addiction. *Neuron*, **1998**; 21(3): 467–476.
20. **Pandey SC.** The gene transcription factor cyclic AMP responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacology and Therapeutics*, **2004**; 104(1): 47–58.
21. **Kalsi G, Prescott CA, Kendler KS, Riley BP.** Unraveling the molecular mechanisms of alcohol dependence. *Trends in Genetics*, **2009**; 25(1): 49–55.
22. **Uhl G, Blum K, Noble E, Smith S.** Substance abuse vulnerability and D2 receptor genes. *Trends in Neuroscience*, **1993**; 16(3): 83-8.
23. **Gelernter J, Goldman D, Risch N.** The A1 allele at the D2 dopamine receptor gene and alcoholism. A reappraisal. *JAMA*, **1993**; 269(13): 1673-7.
24. **Noble EP.** The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol*, **1998**; 16(1): 33-45.
25. **Gorwood P, Batel P, Gouya L, Courtois F, Feingold J, Adès J.** Reappraisal of the association between the DRD2 gene, alcoholism and addiction. *Eur Psychiatry*, **2000**; 15(2) :90-6.

26. **Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT.** Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Human Mutation*, **2004**; 23(6): 540–545.
27. **Smith L, Watson M, Gates S, Ball D, Foxcroft D.** Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: a HuGE gene-disease association review. *American Journal of Epidemiology*, **2008**; 167(2): 125–138.
28. **Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH.** Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *Journal of Neurochemistry*, **1995**; 65(3): 1157–1165.
29. **Tiihonen J, Hallikainen T, Lachman H, Saito T, Volavka J, Kauhanen J, Salonen JT, Ryyanen OP, Koulu M, Karvonen MK, Pohjalainen T, Syvalahti E, Hietala J.** Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Molecular Psychiatry*, **1999**; 4(3): 286–289.
30. **Kauhanen J, Hallikainen T, Tuomainen TP, Koulu M, Karvonen MK, Salonen JT, Tiihonen J.** Association between the functional polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcohol consumption among social drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2000**; 24(2): 135–139.
31. **Foroud T, Wetherill LF, Dick DM, Hesselbrock V, Nurnberger JI, Kramer J, Tischfield J, Schuckit M, Bierut LJ, Xuei X, Edenberg HJ.** Lack of association of alcohol dependence and habitual smoking with catechol-O-methyltransferase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2007**; 31(31): 1773–1779.
32. **Edenberg HJ, Koller DL, Xuei X, Wetherill L, McClintick JN, Almasy L, Bierut LJ, Bucholz KK, Goate A, Aliev F, Dick D, Hesselbrock V, Hinrichs A, Kramer J, Kuperman S, Nurnberger JI, Rice JP, Schuckit MA, Taylor R, Todd Webb B, Tischfield JA, Porjesz B, Foroud T.** Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2010**; 34(5): 840–852.
33. **Buck KJ.** Molecular genetic analysis of the role of GABAergic systems in the behavioral and cellular actions of alcohol. *Behavior Genetics*, **1996**; 26(3): 313–323.
34. **Enoch MA.** The role of GABA_A receptors in the development of alcoholism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **2008**; 90 (1): 95–104.
35. **Breese GR, Criswell HE, Carta M, Dodson PD, Hanchar HJ, Khisti RT, Mameli M, Ming Z, Morrow AL, Olsen RW, Otis TS, Parsons LH, Penland SN, Roberto M, Siggins GR, Valenzuela CF, Wallner M.** Basis of the Gabamimetic profile of ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2006**; 30(4): 731–744.
36. **Sigel E, Baur R, Boulineau N, Minier F.** Impact of subunit positioning on GABAA receptor function. *Biochemical Society Transactions*, **2006**; 34: 868–871.

37. **Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW.** Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Molecular Pharmacology*, **2003**; 63 (1): 53–64.
38. **Loh el-W, Lane HY, Chen CH, Chang PS, Ku LW, Wang KH, Cheng AT.** Glutamate Decarboxylase Genes and Alcoholism in Han Taiwanese Men. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2006**; 30: 1817–1823.
39. **Sherman D, Ward R, Williams R, Peters T.** Emerging markers of predisposition to alcoholism. In *Biological Aspects of Alcoholism (Vol 4)* Tabakoff, B. and Hoffmann, P.L., eds New York: Hogrefe & Huber, **1995**: 85-122.
40. **Chandler LJ.** Ethanol and brain plasticity: receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacology and Therapeutics*, **2003**; 99(3): 311–326.
41. **Ron D ve Jurd R.** The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. *Science’s STKE*, **2005**; 2005 (309): re14.
42. **Mulholland PJ ve Chandler LJ.** The thorny side of addiction: Adaptive plasticity and dendritic spines. *Scientific World Journal*, **2007**; 7: 9–21.
43. **Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A, Liu J, Harris RA.** Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *Journal of Neurochemistry*, **2002**; 81: 802–813.
44. **Flatscher-Bader T, van der Brug MP, Landis N, Hwang JW, Harrison E, Wilce PA.** Comparative gene expression in brain regions of human alcoholics. *Genes Brain Behavior*, **2006**; 5: 78–84.
45. **Mulligan MK, Ponomarev I, Hitzemann RJ, Belknap JK, Tabakoff B, Harris RA, Crabbe JC, Blednov YA, Grahame NJ, Phillips TJ, Finn DA, Hoffman PL, Iyer VR, Koob GF, Bergeson SE.** Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2006**; 103 (16): 6368–6373.
46. **Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L.** Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1998**; 95: 9608–9613.
47. **Arias A, Feinn R, Kranzler HR.** Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. *Drug Alcohol Dependence*, **2006**; 83 (3): 262–268.
48. **Ray LA, Hutchison KE.** Effects of naltrexone on alcohol sensitivity and genetic moderators of medication response: a double-blind placebo-controlled study. *Archives of General Psychiatry*, **2007**; 64: 1069–1077.

49. **Li MD, Burmeister M.** New insights into the genetics of addiction. *Nature Reviews Genetics*, **2009**; 10(4): 225-31.
50. **Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL.** Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, **1996**; 274: 1527–1531.
51. **Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR.** Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics B. Neuropsychiatric Genetics*, **2005**; 133B: 79–84.
52. **Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K, Porjesz B, Li TK, Conneally PM, Nurnberger JI Jr, Tischfield JA, Crowe RR, Cloninger CR, Wu W, Shears S, Carr K, Crose C, Willig C, Begleiter H.** Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics*, **1998**; 81: 207–215.
53. **Wang JC, Hinrichs AL, Stock H, Budde J, Allen R, Bertelsen S, Kwon JM, Wu W, Dick DM, Rice J, Jones K, Nurnberger JI Jr, Tischfield J, Porjesz B, Edenberg HJ, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Begleiter H, Reich T, Goate AM, Bierut LJ.** Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. *Human Molecular Genetics*, **2004**; 13: 1903–1911.
54. **Guze SB, Cloninger CR, Martin R, Clayton PJ.** Alcoholism as a medical disorder. *Comprehensive Psychiatry*, **1986**; 27(6): 501-10.
55. **Dawson DA, Harford TC, Grant BF.** Family history as a predictor of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.*, **1992**; 16(3): 572-5.
56. **McGue M, Pickens RW, Svikis DS.** Sex and age effects on the inheritance of alcohol problems: a twin study. *J Abnorm Psychol.*, **1992**; 101(1): 3-17.
57. **Heath AC, Bucholz KK, Madden PA, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DJ, Dunne MP, Whitfield JB, Martin NG.** Genetic and environmental contributions to alcohol dependence risk in a national twin sample: consistency of findings in women and men. *Psychological Medicine*, **1997**; 27(6): 1381-96.
58. **Gelernter J ve Kranzler HR.** Genetics of alcohol dependence. *Human Genetics*, **2009**; 126(1): 91-9.
59. **Johnson C, Drgon T, Liu QR, Walther D, Edenberg H, Rice J, Foroud T, Uhl GR.** Pooled association genome scanning for alcohol dependence using 104,268 SNP: validation and use to identify alcoholism vulnerability loci in unrelated individuals from the collaborative study on the genetics of alcoholism. *American Journal of Medical Genetics B. Neuropsychiatric Genetics*, **2006**; 141B (8): 844–853.

60. Treutlein J, Cichon S, Ridinger M, Wodarz N, Soyka M, Zill P, Maier W, Moessner R, Gaebel W, Dahmen N, Fehr C, Scherbaum N, Steffens M, Ludwig KU, Frank J, Wichmann HE, Schreiber S, Dragano N, Sommer WH, Leonardi-Essmann F, Lourdasamy A, Gebicke-Haerter P, Wienker TF, Sullivan PF, Nöthen MM, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Rietschel M. Genome-wide association study of alcohol dependence. *Archives of General Psychiatry*, **2009**; 66: 773–784.
61. Bierut LJ, Agrawal A, Bucholz KK, Doheny KF, Laurie C, Pugh E, Fisher S, Fox L, Howells W, Bertelsen S, Hinrichs AL, Almasy L, Breslau N, Culverhouse RC, Dick DM, Edenberg HJ, Foroud T, Gruzza RA, Hatsukami D, Hesselbrock V, Johnson EO, Kramer J, Krueger RF, Kuperman S, Lynskey M, Mann K, Neuman RJ, Nöthen MM, Nurnberger JI Jr, Porjesz B, Ridinger M, Saccone NL, Saccone SF, Schuckit MA, Tischfield JA, Wang JC, Rietschel M, Goate AM, Rice JP; Gene, Environment Association Studies Consortium. A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**; 107: 5082–5087.
62. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **1993**; 75(5): 843–854.
63. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Post-transcriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, **1993**; 75: 855–862.
64. Ghildiyal M ve Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* **2009**; 10: 94-108
65. Meister G. miRNAs Get an Early Start on Translational Silencing. *Cell*, **2007**; 131(1): 25–28.
66. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, **2007**; 129(6): 1141–1151
67. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, **2004**; 431: 350–355.
68. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, **2004**; 10(12): 1957-66.
69. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **2003**; 425(6956): 415-9.
70. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, **2004**; 18(24): 3016–3027.
71. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **2004**; 432: 231–235.
72. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, **2003**; 17: 3011–3016.

73. **Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **2004**; 303: 95–98.
74. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **2001**; 409: 363–366.
75. **Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R.** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **2005**; 436: 740–744.
76. **Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ.** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **2004**; 305: 1437–1441.
77. **Kadri S, Hinman V, Benos PV.** HHMMiR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models. *BMC Bioinformatics*, **2009**; 10 (Suppl 1): S35.
78. **Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH.** Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, **2006**; 29: 77–103.
79. **Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM.** Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *Journal of Neuroscience* **2008**; 28(17): 4322-30.
80. **Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A.** A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*, **2007**; 317: 1220–1224.
81. **Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, Hillman D, Sugimori M, Llinas R, Greengard P.** Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *Journal of Experimental Medicine*, **2007**; 204: 1553–1558.
82. **Nunez YO ve Mayfield RD.** Understanding Alcoholism Through microRNA Signatures in Brains of Human Alcoholics. *Frontiers in Genetics*, **2012**; 3: 43.
83. **Iwai N ve Naraba H.** Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**; 331 (4): 1439–44.
84. **Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, Sommer SS, Rossi JJ.** SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, **2009**; 15(9): 1640-51.
85. **Wu M, Jolicœur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D, Yu Z, Shen SH.** Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*, **2008**; 29(9): 1710-1716.
86. **Saunders MA, Liang H, Li WH.** Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2007**; 104: 3300–3305.

87. **Ryan BM, Robles AI, Harris CC.** Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer*, **2010**; 10 (6): 389-402.
88. **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.
89. Yakima Yellow. <https://secure.eurogentec.com/product/research-yakima-yellow.html?Sayıry=bel>
Erisim Tarihi: 06.05.2012.
90. **Maniataki E ve Mourelatos Z.** A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes and Development*, **2005**; 19(24): 2979–2990.
91. **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. *Clinical Cancer Research*, **2008**; 14 (23): 7956-62.
92. **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 Prevention Research*, **2008**; 1 (6): 460-469.
93. **Liu J, Liu J, Wei M, He Y, Liao B, Liao G, Li H, Huang J.** Genetic Variants in the MicroRNA Machinery Gene *GEMIN4* Are Associated with Risk of Prostate Cancer: A Case-control Study of the Chinese Han Population. *DNA and Cell Biology*. Baskıda. doi:10.1089/dna.2011.1600.
94. **Liang D, Meyer L, Chang DW, Lin J, Pu X, Ye Y, Gu J, Wu X, Lu K.** Genetic Variants in MicroRNA Biosynthesis Pathways and Binding Sites Modify Ovarian Cancer Risk, Survival, and Treatment Response. *Cancer Research*, **2010**; 70: 9765-9776.
95. **Bowers B.J.** Applications of transgenic and knockout mice in alcohol research. *Alcohol Research & Health*, **2000**; 24(3): 175–184.
96. **Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ.** Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Molecular Psychiatry*, **2010**; 15(12): 1176-89.
97. **Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai WS, Liu H, Hsu R, Wan X, Pavlidis P, Mills AA, Karayiorgou M, Gogos JA.** Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet.*, **2008**;40(6):751-60.
98. **Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chang CC, Yang WC, Wu JY, Hung SI, Chan HY, Chen JJ, Hsieh MH, Hwang TJ, Faraone SV, Tsuang MT, Chen WJ, Hwu HG.** HTF9C gene of 22q11.21 region associates with schizophrenia having deficit-sustained attention. *Psychiatr Genet.*, **2007**; 17(6): 333-8.

99. **Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperaviciute D, Gennarelli M, Strittmatter WJ, Bonvicini C, Rossi G, Jayathilake K, Cola PA, McEvoy JP, Keefe RS, Fisher EM, St Jean PL, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Ruppert A, Fraser G, Crombie C, Middleton LT, St Clair D, Roses AD, Muglia P, Francks C, Rujescu D, Meltzer HY, Goldstein DB.** A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet.*, **2009** ;5(2): e1000373.
100. **O'Carroll D, Mecklenbrauker I, Das PP, Santana A, Koenig U, Enright AJ, Miska EA, Tarakhovskiy A.** A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev.*, 2007; 21(16): 1999-2004.
101. **Schaefer A, Im HI, Venø MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, Kjems J, Kenny PJ, O'Carroll D, Greengard P.** Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *J Exp Med.*, **2010**; 207(9): 1843-51.
102. **Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H.** Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, **2010**; 284(2):95-103.
103. **Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD.** Up-Regulation of MicroRNAs in Brain of Human Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **2011**; 35: 1928–1937.
104. **Cloninger CR.** Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science*, **1987**; 236(4800):410-6.

ÖZGEÇMİŞ

24.07.1984 yılında Niğde'nin Ulukışla ilçesinde doğdu. Ortaokulu Tarsus Abdul Kerim Bengi Anadolu Lisesinde tamamladı. Ardından ilk iki yıl Mersin Fen Lisesi, bir ay Ulukışla 75.Yıl Çok Programlı Lisesi ve son seneyi de Özel Yıldırım Lisesinde tamamlayarak 2002 yılında liseden mezun oldu.

2009 yılında Boğaziçi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Güz döneminden itibaren Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2009 Aralık ayında da aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. Halen Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa devam etmektedir.