



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF)**  
**GENİNDEKİ VAL66MET POLİMORFİZMİNİN SAĞLIKLI**  
**POPÜLASYONDAKİ DAĞILIMI**

**ÖZNUR ERDOĞAN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM**

**MANİSA-2015**





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF)**  
**GENİNDEKİ VAL66MET POLİMORFİZMİNİN SAĞLIKLI**  
**POPÜLASYONDAKİ DAĞILIMI**

**ÖZNUR ERDOĞAN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU

(Jüri Üyesi)

Prof. Dr. Necip KUTLU

(Jüri Üyesi)

**MANİSA-2015**



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

**Öğrencinin Adı, Soyadı:**

Öznur ERDOĞAN

**İmza:**

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca desteği ve yönlendirmeleri ile  
yolumu aydınlatan değerli hocam ve danışmanım  
Prof. Dr. F.Sırrı ÇAM'a,

Çalışmam sırasında deneysel aşamalarda yardımları için  
Tıbbi Genetik Laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma,

İlgi ve emeğini üzerimden eksik etmeyen,  
ilham aldığım arkadaşım, ablam Münevver'e;  
çok kıymetli dostlarım Handan ve Hatice'ye,

Her zaman yanımda olup bana inanan aileme;  
verdikleri emek, imkân ve şefkat için,

Tüm içtenliğimle teşekkür eder ve şükranlarımı sunarım.

Öznur ERDOĞAN

Manisa/2015

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ÖZET.....	1
SUMMARY .....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. NÖROTROFİNLER .....	5
2.1.1. Nörotrofinlerin Sentezi ve Mekanizması .....	6
2.1.2. Nöroplastisite ve Nörogenез .....	8
2.2. BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF) .....	11
2.2.1. BDNF ve Hastalıklarla İlişkisi .....	14
2.2.2. BDNF Val66Met Tek Nükleotit Polimorfizmi .....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	18
3.1. GEREÇ.....	18
3.1.1. Kimyasallar .....	18
3.1.2. Cihazlar .....	20
3.1.3. Diğer Araç ve Gereçler.....	20
3.2. YÖNTEM.....	20
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	20
3.2.2. DNA'nın Çoğaltılması (PCR) .....	22
3.2.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) .....	23
3.2.4. İstatistiksel Analiz .....	25
4. BULGULAR .....	26
5. TARTIŞMA .....	27
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	30
7. KAYNAKLAR .....	31

ÖZGEÇMİŞ ..... 40

**EK-1** ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

**EK-2** ETİK KURUL KARARI





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörler .....	6
Şekil 2.2. Nörotrofinlerin Yin ve Yang aktivitesi .....	7
Şekil 2.3. Nörotrofin-reseptör kompleksi ve etkinleşen yollar .....	8
Şekil 2.4. Stres ve antidepresan tedavinin zıt etkisi .....	10
Şekil 2.5. BDNF geni kromozom yerleşimi.....	11
Şekil 2.6. BDNF gen yapısı ve transkript oluşumu.....	11
Şekil 2.7. pro- ve olgun BDNF salınımı .....	12
Şekil 2.8. pro- ve olgun BDNF sinyal yolları.....	13
Şekil 2.9. BDNF ve TrkB etkileşimi.....	13
Şekil 3.1. DNA izolasyon basamakları .....	21
Şekil 3.2. Restriksiyon enzim kesim bölgesi .....	24
Şekil 3.3. BDNF geni rs6265 polimorfizmini içeren agaroz jel görüntüsü .....	25

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan primerler.....	22
Tablo 2. PCR reaksiyon koşulları .....	23
Tablo 3. RFLP için kullanılan enzim, distile su ve PCR ürünü miktarları .....	24
Tablo 4. Genotip ve allel frekansları.....	26
Tablo 5. BDNF Val66Met genotiplerinin dağılımı.....	26
Tablo 6. Diğer Popülasyonlardaki allel oranları .....	28
Tablo 7. rs6265'in 1000 Genom projesinin Faz-III sonuçları .....	29



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>A</b>	: Adenin nükleotidi
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Trifosfat
<b>G</b>	: Guanin nükleotidi
<b>HWE</b>	: Hardy Weinberg Eşitliği
<b>JNK</b>	: Jun kinaz
<b>NGF</b>	: Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor)
<b>NT</b>	: Nörotrofin
<b>LTD</b>	: Uzun dönem depresyon (Long term depression)
<b>LTP</b>	: Uzun dönem potensiasyon (Long-term potentiation)
<b>p75NTR</b>	: pan-nörotrofin reseptör
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>PI3K</b>	: Fosfatidil İnozitol 3 kinaz
<b>PLC-<math>\gamma</math>1</b>	: FosfolipazC- $\gamma$ 1
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RestrictionFragmentLengthPolymorphism)
<b>rpm</b>	: rotatory per minute
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
<b>MAPK</b>	: Mitojen Aktif Protein Kinaz
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>Met</b>	: Metiyonin amino asiti
<b>NF-kB</b>	: Nükleer faktör kapa B
<b>Trk</b>	: Tropomiyozin-ilişkili kinaz reseptörü
<b>Val</b>	: Valin amino asiti



## ÖZET

**Tezin Başlığı:** Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Genindeki Val66Met Polimorfizminin Sağlıklı Popülasyondaki Dağılımı

**Öğrencinin Adı:** Öznur ERDOĞAN

**Danışmanı:** Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM

**Anabilim Dalı:** Tıbbi Biyoloji

**Amaç:** Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) geni Val66Met polimorfizmi, psikiyatrik hastalıklara yatkınlık oluşturmada sorumlu tutulan bir gen varyantıdır. Bu polimorfizmin prevalansı çeşitli ırklara ve etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir. Çalışmanın amacı, Türkiye'nin batısında yer alan sağlıklı gönüllülerden oluşturulan bir örnekleme Val66Met genotiplerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu araştırmaya 18 ile 55 yaş arasında, herhangi bir klinik hastalığı (metabolik, psikiyatrik, alkol bağımlılığı) olmayan ve farmakolojik tedavi görmeyen 200 sağlıklı gönüllü (116 erkek ve 84 kadın) dahil edildi. Katılımcılardan sağlanan kan örnekleri BDNF Val66Met polimorfizmi açısından incelendi. Genotipler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve sınırlayıcı enzim kesimleri ile saptandı.

**Bulgular:** BDNF geni Val66Met polimorfizmine ait genotip frekansları GG: %68,5 GA: %30,5 AA: %1,0 olarak bulundu. Bu polimorfizmin allel sıklıkları ise G: %83,75 ve A: %16,25 olarak saptandı.

**Sonuçlar:** Bu çalışmada, BDNF Val66Met polimorfizmi için Türk popülasyonu allel ve genotip sıklık değerleri Kafkas ırkı ile benzerlik taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Tek nükleotid polimorfizmi, BDNF, Val66Met, Sağlıklı gönüllü, Türk popülasyonu

## SUMMARY

**Thesis Title:** Prevalence of the Brain Derived Neurotrophic Factor Gene Val66Met Polymorphism in a Healthy Turkish Population

**Student name:** Öznur ERDOĞAN

**Advisor:** Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM

**Department:** Medical Biology

**Objectives:** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism is a gene variant that is implicated especially in terms of neuropsychiatric diseases susceptibility. The prevalence of this polymorphism is different in various races and ethnics. The aim of study was to investigate Val66Met genotypes in a sample of healthy volunteers from the west part of Turkey.

**Material and Methods:** 200 healthy volunteers who were between 18 and 55 years old were included in this study. They had no clinical diseases (metabolic, psychiatric and alcohol dependency) and no pharmacological treatments. Blood samples were recruited from this participants have been examined in terms of the BDNF gene Val66Met polymorphism. Genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion.

**Results:** It was found that the frequencies of BDNF gene Val66Met polymorphism genotypes were GG: 68.5%, GA: 30.5%, and AA: 1.0% respectively. The allele frequencies of this polymorphism were for G allele: 83.75% and A allele; 16.25%.

**Conclusions:** In conclusion, this study demonstrates that the allele and genotype frequency values for the BDNF gene Val66Met polymorphism in Turkish population are similar to those in Caucasians.

**Key words:** Single nucleotide polymorphism, BDNF, Val66Met, Healthy volunteer, Turkish population

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan genom projesinin sonuçlarına göre insanların genetik yapıları bakımından aralarında %0,1'lik bir fark bulunmaktadır. Bu sayısal olarak önemsiz gibi görünen fark, aslında ~3,2 milyar baz çifti uzunluğundaki DNA dizisi düşünüldüğünde anlam kazanmaktadır. Bu açıdan tek bir bazın bile değişmesi birçok durumda gen ekspresyonunda önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Bu nedenle genetik varyasyonlar, insanlar arasındaki genetik farklılığın ve çeşitliliğin önemli bir unsuru olarak karşımıza çıkmaktadır.

Genetik varyasyonlar içerisinde önemli bir yere sahip olan tek nükleotit polimorfizmleri (SNP-single nucleotide polymorphism) hastalıkların oluşmasında patolojik süreçlerin anlaşılmasında işlevsel bir araç olarak kullanılmaktadır. Kişiyeye ve topluma özgü fenotiplerin ayrımı hastalık ve sağlık temeli üzerinde bu DNA belirteçleri ile araştırılabilmektedir. Günümüzde sınırlı sayıda tanımlaması yapılan SNP belirteci bulunmaktadır (Burchard ve ark. 2003).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), son zamanlarda psikiyatrik hastalıklar açısından öne çıkan bir büyüme faktörüdür. BDNF'nin kandaki miktarı stres, depresyon, şizofreni, yaş, egzersiz, öğrenme, antidepresan tedavi gibi çeşitli durumlardan etkilenebilmektedir (Aydemir ve Deveci 2009; Bath ve ark. 2013). BDNF'nin ifadesi ve salınımindaki değişimler anksiyete, duyu durumu ve yeme bozuklukları gibi mental hastalıkların patolojisi ile ilişkilendirilmektedir.

BDNF geni üzerinde bulunan SNP'lerden biri olan Val66Met polimorfizmi (NCBI-dbSNP rs6265) sıklıkla çalışılmaktadır. Bu polimorfizm olgun BDNF'yi etkilemezken BDNF'nin öncül formu olan pro-BDNF'yi etkilemektedir. pro-BDNF bölgesini kodlayan dizide Guanin (G) nükleotidinin yerini Adenin (A)'in alması ile kodon valin (Val) amino asiti yerine metiyonin'i (Met) sentezleyerek pro-BDNF yapısında farklılığa neden olur. Bu farklılığın BDNF'nin sentez ve salınımını etkileyebileceği çeşitli yayınlarda ifade edilmiştir (Egan ve ark. 2003; Chen ve ark. 2004).

BDNF Val66Met polimorfizminin yapısal (hipokampal ve ventriküler hacim) ve işlevsel (bilişsel işlevler) beyin değişikliklerine neden olabileceği beyin görüntüleme çalışmalarında gösterilmektedir (Eker ve ark 2005).

Mutant alleli homozigot taşıyan Met/Met genotipine sahip bireylerin bellek işlevlerinde ve hipokampus aktivasyonlarında azalmalar olduğu çeşitli yayınlarda belirtilmektedir (Toro ve ark. 2009).

BDNF Val66Met polimorfizmi majör depresyon, bipolar, obsesif-kompulsif bozukluk, şizofreni gibi çeşitli psikiyatrik rahatsızlıklar; obezite ve anoreksiya nervoza gibi yeme bozuklukları; Alzheimer, Parkinson hastalığı, hipokampal işlev ve hafıza bozuklukları üzerinde sıklıkla durulmaktadır (Licinio ve ark. 2009; Sklar ve ark. 2002; Gratacos ve ark. 2007; Hall ve ark. 2003; Ribasés ve ark. 2004; Murer ve ark. 2001; Egan ve ark. 2003).

BDNF Val66Met polimorfizminin popülasyonlara göre allel ve genotip oranları farklılık göstermektedir. Bu polimorfizmin etnik farklılıkları yansıtabilen bir genetik özellik olduğu ileri sürülmektedir (Shimizu ve ark. 2004).

Genetik hastalıklarda gözlenebilen fenotipleri, sağlıklı bir şekilde değerlendirebilmenin temel mekanizmalarından biri de toplumların genel (normal) genotip frekansının belirlenmesidir.

Bu tez araştırmasında, ülkemiz için BDNF genindeki Val66Met polimorfizminin sağlıklı gruptaki (normal) oranlarının saptanması amaçlanmıştır. Irk ve etnik yapıya göre değişiklikler gösterebilen bu polimorfik noktanın Türk toplumuna özgü yönleri çalışma bulguları ve diğer popülasyon sonuçlarıyla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. NÖROTROFİNLER

“Nöron” (sinir hücresi) ve “trophe” (Yunanca; beslenme) kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilen nörotrofik faktörler ya da nörotrofinler, hücre sel süreçleri düzenleyen sinyalle yici aracı moleküllerdir.

Sinir sistemi hücrelerini besleyen Nörotrofik faktörlerin (*polipeptit büyüme faktörlerinin*) farklı bir sınıfını oluşturan nörotrofinler; nöronal ve nöronal olmayan hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını, sağ kalımını ve ölümünü etkileyebilen; sinapsların stabilizasyonunu sağlayan; sinaptik plastisiteyi ve işlevi kontrol eden; akson ve dendrit dallanmalarını düzenleyen küçük dimerik yapıda üyelere sahip bir protein ailesidir (Yano ve Chao 2000). Özellikle başta merkezi sinir sistemi (MSS) olmak üzere çevresel sinir sistemi nöronları ve periferal dokularda bulunan non-nöronal birçok hücre tipinden sentezlenmektedir.

Bu ailenin ilk tanımlanan üyesi sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor; NGF) olmuştur. NGF'nin “trofik” (hayatta kalma ve büyümeyi teşvik) etkileri sempatik ve sensöriyal nöronlar üzerinde gösterilmiştir. Bu gözlem, ayrıca hücre biyolojisi için sinyal iletiminde rol oynayan “büyüme faktörü” kavramının keşfine önemli bir katkı sağlamıştır ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1986/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1986/) Erişim Tarihi, 22 Temmuz 2015).

Nörotrofin ailesinin ikinci üyesi olan Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) ise dorsal kök ganglionunda sinir hücreleri üzerinde etkili olduğu ve hayatta kalma sürelerini uzattığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerden sonra nörotrofin ailesinin insanda bulunan diğer üyeleri; Nörotrofin-3 (NT-3) ve Nörotrofin-4/5 (NT-4/5) tanımlanmıştır (Binder ve Scharfman 2004).

Etkilerini farklı nöron grupları üzerinden gösteren NT'ler, böylece homolog yapıları ve benzer reseptörlere bağlanmaları ile canlı nın yaşam dönemlerine ve fizyolojik ihtiyaçlarına göre çeşitlenen hücre sel süreçlere aracılık ederler.

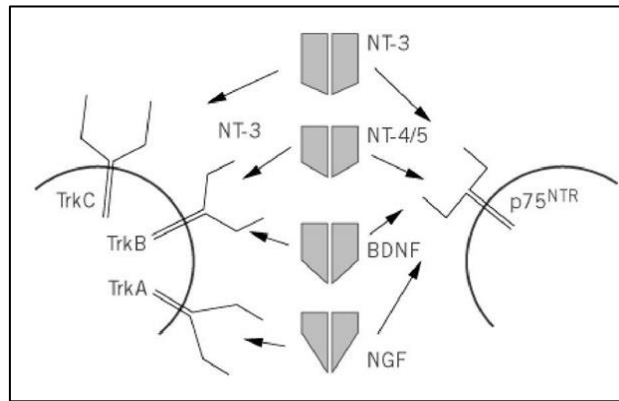
Bu sinyal moleküller, sinir sistemi içerisinde az miktarda bulunmalarına karşı nöronların hayatta kalması için gerekli ve esas moleküllerdir. Bununla birlikte sinir

sisteminin gelişimi boyunca sentezlenen miktarları ile oluşan nöronların kontrolünü yapmaktadır. NT'ler ayrıca, nöronların uyarımı ile dendrit sayısının artmasında ve zayıf dendritlerin imha edilmesinde rol oynamaktadır. Bu şekilde nöronlar arasında yeni ilişkiler kurulabilmesine olanak sağlayan NT'lerin, beyin hücrelerinin esnekliğine katkıda bulunarak öğrenme ve hatırlamayı etkilediği savunulmaktadır.

### 2.1.1. Nörotrofinlerin Sentezi ve Mekanizması

Nörotrofinler, ilk olarak öncül protein (prekürsör; pro-nörotrofin) formunda hücre içinde sentezlenir. Pro-nörotrofinin olgunlaştırılması enzimler aracılığıyla pro kısmının nörotrofinden ayrıştırılması ile olur. Olgun nörotrofin stabil, kovalent olmayan dimerlerden oluşan bir protein yapısına sahiptir. Pro- ve olgun nörotrofinler biyolojik etkilerini bağlandıkları reseptörler üzerinden göstermektedir (Manadas ve ark. 2007). Bu reseptörler; tirozin kinaz ailesinden Trk (tropomiyozin reseptör kinaz) ile tümör nekroz faktör ailesinden p75NTR (pan-nörotrofin reseptör, p75)'dir.

p75NTR'ye tüm olgun NT'ler bağlanabilirken Trk reseptör kinaz için seçicilik söz konusudur. Trk reseptörleri Trk A, B ve C olarak isimlendirilen üç üyesi vardır. Her nörotrofin afinitesine göre seçicilik gösterdiği reseptörüne (NGF, TrkA'ya; BDNF ve NT-4/5 TrkB'ye; NT-3 TrkC'ye) bağlanır. (Şekil 2.1) Bazı durumlarda ise NT-3 daha düşük afinite ile TrkA ve TrkB'ye bağlanabilmektedir (Allen ve Dawbarn 2006).

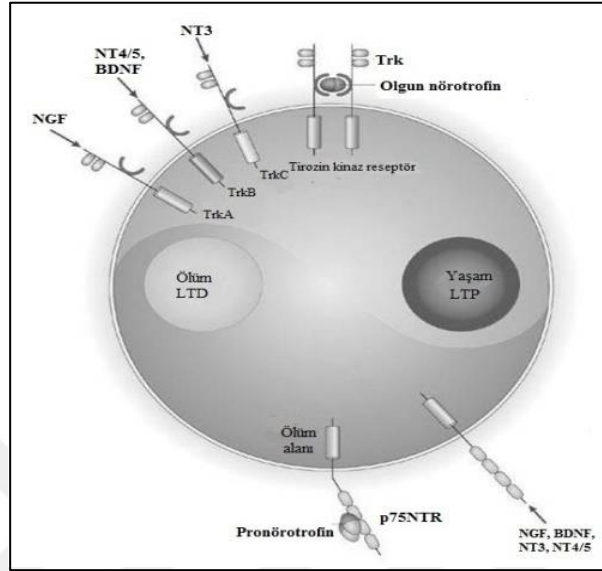


**Şekil 2.1.** Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörler

<http://what-when-how.com>, Erişim tarihi: 6 Haziran 2015

Trk reseptörlerinin aktivasyonu sadece sinir hücrelerinin hayatta kalmasını ve devamlılığını ilgilendirirken p75NTR uyarımı ise hem yaşam, hem de apoptotik yol

için önem arz etmektedir. NT'ler bu şekilde nöronların hayatta kalma- ya da ölüm- döngülerini, aktive ettikleri sinyal yollarını düzenlemektedir (Lu ve ark. 2005) (Şekil 2.2).

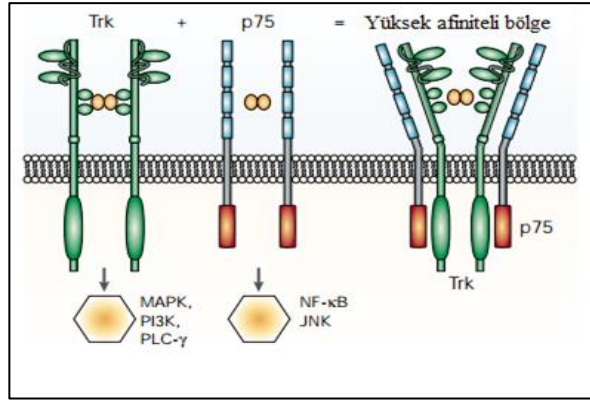


**Şekil 2.2.** Nörotrofinlerin Yin ve Yang aktivitesi

Pro-nörotrofinlerin çoğunun olgun nörotrofinlere karşı zıt biyolojik etkileri vardır. Bu nedenle; pro-nörotrofinlerin proteolitik bölünmesi, bu nörotrofinlerin gidişatını kontrol eden bir işleyişe neden olur.

Trk reseptörlerine özgül NT'nin bağlanmasıyla aktifleşen reseptör dimerize ve fosforile (otofosforilasyon) olur. Özgün tirozin residüllerinin fosforilasyonu ile 3 farklı yolak etkin hale gelmektedir. (Şekil 2.3)

Bunların ilki Ras aktivasyonu ile harekete geçen mitojen aktif protein kinaz (MAPK) sinyal kaskadıdır. Bu yolak nöronal farklılaşmayı ve nörit gelişimini destekler. İkinci olarak, Ras veya Gab1 aracılığıyla aktifleşen fosfatidil inozitol-3 kinaz (PI3K) yolağıdır. Bu kaskadın uyarımı nöronal sağkalıma ve gelişime aracılık etmektedir. Üçüncü olarak, FosfolipazC- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) aktivasyonu sinaptik plastisiteyi destekleyen  $Ca^{+2}$  ve protein kinaz C ile düzenlenen yolları aktive eder. Bu bağlanma nöronal sağ kalımı, farklılaşmayı ve sinaptik plastisiteyi sağlamaktadır. Böylece aktifleşen reseptörler sinyal iletimini başlatarak nükleusta transkripsiyon faktörlerini uyarır. Gen ekspresyonu böylece kontrol edilmiş olur.



**Şekil 2.3.** Nörotrofin-reseptör kompleksi ve etkinleşen yollar

p75NTR tümör nekroz reseptör üst ailesinin bir üyesidir ve bu reseptör ailesine benzer olarak sitoplazmik bölgesinde “ölüm” alanı içermektedir. p75NTR-nörotrofin kompleksi, Nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve Jun kinaz (JNK) olmak üzere iki ana sinyal yolağını düzenlemektedir.

JNK yolağı ile uyarılan P53, nöronal apoptosize yol açan genleri aktive ederken NF-κB yolağının sinyallenmesi ise nöronal sağ kalımı destekleyen birçok genin transkripsiyonuyla sonuçlanmaktadır.

### 2.1.2. Nöroplastisite ve Nörogenез

Sinir sisteminin gelişim sürecine bakıldığında gebeliğin ilk haftalarında nöronal migrasyon (göç) başlamakta ve ikinci üç aylık dönemin (trimester) sonuna doğru ise nöronların büyük bir kısmı oluşmaktadır.

Eskiden inanılanın aksine bugünkü bilgiler ışığında nörogenезin doğum sonrası dönemlerde de devam ettiği, bununla birlikte nöronların kendilerini onarabildikleri ve yenileyebildikleri kanıtlanmıştır (Uzbay 2004). Yetişkin beyinde nörogenезin varlığı koku merkezinde (olfactory bulb) ve hipokampusta gösterilmiştir. Nörogenез; zengin çevresel uyaran, öğrenme, egzersiz, östrojen ile nörogenез artarken yaş, stres, opioidler, eksitatuar amino asitler ile azalmaktadır (Gönül ve ark. 2002).

Sinir sisteminin çevresel değişikliklere uyumunda nöronların sinaptik etkinliği rol oynamaktadır. Bu şekilde çeşitli çevresel uyaranlara karşı adaptif bir yanıt olarak oluşan nöroplastisite, beyinde nöronlar ve oluşturdukları sinapslar üzerinden yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler stres kaynaklı olarak

uzun dönem depresyona (LTD) yol açabileceği gibi öğrenme süreçlerinde uzun dönem potansiyalizasyonu (LTP) sağlayabilmektedir.

Nöroplastisite özellikle önemli santral işlevlerin gelişebilmesinde ve sinir sistemi ile ilişkili hastalıkların tedavisinde (hasarın geri çevrilmesi ile) önemli bir etkiye sahiptir (Uzbyay 2004). Böylece uyarılma ve inhibisyon arasındaki dengeyi sağlayarak santral sinir sisteminin özgün parçalarının yeniden düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Nöroplastisite ya da nöral esneklik, sinir sisteminin kendini yenileme yeteneği, çevresel uyarılara göre sinir hücre ve sinaps oluşması ile öğrenme, hatırlama ve unutma yetilerinin şekillenmesi şeklinde de tanımlanabilir (Gürpınar ve ark. 2007).

Beyinde nöroplastik değişiklikler hipokampus başta olmak üzere korteks, septum ve amigdalada görülmektedir (Uzbyay 2004). Hipokampusun gelişmesinin, dendritlerin gelişmesi, sinapsların yeniden yapılanması gibi süreçlerin hayatın ilk yıllarında en fazla olmakla beraber, erişkinlikte de devam ettiği gösterilmiştir (Kotan ve ark. 2009).

Hipokampus; duygudurum kontrolünden sorumlu limbik sistem içinde yer alan ayrıca öğrenme ve bellekle ilgili işlevlerle ilişkili bir yapıdır. Ayrıca neokortekste kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesi işlemi olan bellek birleştirilmesinde de önemli bir rolü vardır (Wittenberg ve Tsien 2002; Aydemir ve Deveci 2009).

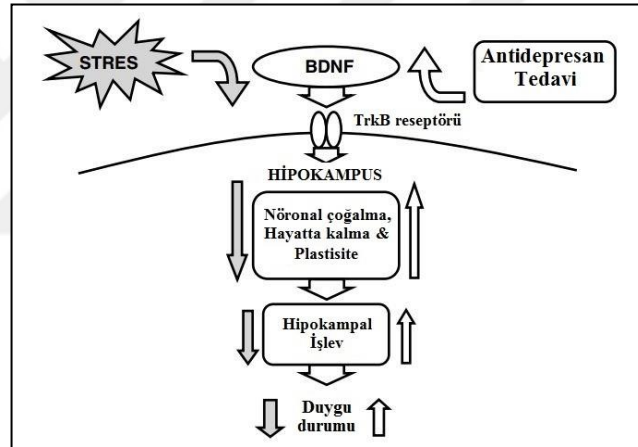
Sol hipokampus özellikle epizodik hafıza ile ilişkili iken, sağ hipokampus spasyal hafıza ile ilişkilidir. Her türlü zihinsel egzersiz ile hipokampus hacminde ve nörogenezde artma görülürken Major Depresif Bozukluk (MDB) ve stresle ilişkili durumlarda hipokampus hacminde ve nörogenezde azalma olduğu çeşitli görüntüleme yöntemlerinde gösterilmiştir (Eker ve ark. 2005).

Özellikle korteks ve hipokampal nöronlar tarafından üretilen BDNF, sinaptik transmisyon ve hücreyel uyarılabilirliği etkileyerek LTP gibi sinaptik değişiklikleri modüle etmektedir. Depresyonda nöroplastisitenin bozulması, BDNF düzeylerindeki azalma ile ilişkilendirilmektedir (Yulug ve ark.2009).

Hipokampus ve kortekste yüksek miktarda salınan ve nöronal farklılaşma (nöroplastisite) açısından önemli olan BDNF'nin stres koşullarında serumda ve hipokampusta azaldığı bulunmuştur (Kotan ve ark. 2009; Karege ve ark.2002).

Nöroplastisite ile beyin dinamik ve şekillendirilebilir bir durumdadır. Santral sistemin yeniden yapılanması, moleküler ve hücresele seviyede başlar ve santral sinir sisteminin tümünde değişikliklere neden olabilir.

Son yıllarda elde edilen bazı bulgular, BDNF'nin nöronal plastisiteyi çift yönlü olarak düzenleyebildiğini göstermektedir. Bu durum, nörotrofik faktörlerin depresyonun hem patofizyolojisinde, hem de tedavisinde etkin olduğunu göstermektedir (Gümrü ve Arıcıoğlu 2012). Yapılan birçok çalışma majör depresyonda BDNF serum ve plazma seviyelerindeki azalmadan bahsetmektedir (Karege ve ark. 2002; Shimizu ve ark. 2004). (Şekil 2.4)



**Şekil 2.4.** Stres ve antidepresan tedavinin zıt etkisi

Gelen uyarının şiddeti ve süresi ile merkezi sinir sisteminde primer olarak yanıt verecek bölgenin özelliklerine bağlı olarak bu değişikliklerin biri, birkaçı veya hepsi ortaya çıkabilir. Sonuçta oluşan nöroplastisitenin niteliği ve ortaya çıkaracağı yeniden şekillenme de bu etkenlere bağlıdır (Kotan ve ark. 2009).

Hipokampus, nöroplastisitesi en yüksek beyin bölgelerinden biridir. Zihinsel egzersiz ile hipokampal hacimde ve yeni nöron oluşumu anlamına gelen nörogenezde artma görülebilirken, sürekli stres durumları hipokampal hacimde ve hipokampal nörogenezde azalmaya neden olur (Duman ve Monteggia 2006).

## 2.2. BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF)

BDNF, beyin gelişimi ve plastisitesi için gerekli bir büyüme faktörüdür. Yapılan in vitro deneylerle ilk olarak BDNF'nin duyuşal nöronlarda büyüme tetiklediğı gösterilse de daha sonrasında yapılan çalışmalar ile BDNF'nin motor nöronlar, kolinerjik nöronlar, GABAerjik, dopaminerjik, ganglion ve duyuşal nöronların da büyüme ve sağ kalımını desteklediğı belirlenmiştir.

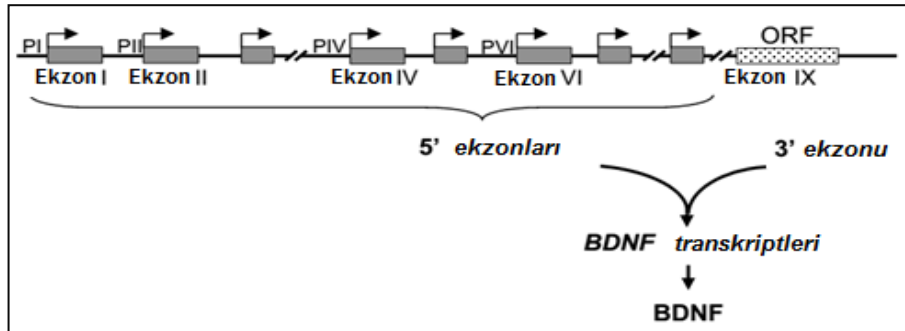
BDNF geni 247 amino asitlik proteinini kodlar ve 13 kDa ağırlığındadır. Beyinde özellikle serebral korteks ve hipokampüste yaygın bulunmaktadır (Gürpınar ve ark. 2007).

66.166 bazdan oluşan bu gen, 11. kromozomun kısa kolu (p) üzerinde; (11p14.1) bulunur ve yaklaşık 67 kb büyüklüğündedir. Bu kromozomda 27.654.893 ile 27.722.058 baz çiftler arasına lokalize olarak bulunur (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BDNF>, Erişim tarihi Haziran 2015).



**Şekil 2.5.** BDNF geni kromozom yerleşimi  
([www.psychiatry.som.jhmi.edu](http://www.psychiatry.som.jhmi.edu), Erişim tarihi 7 Haziran 2015)

İnsan BDNF geni 11 ekzon ve her biri gelişimsel olarak düzenlenen ve dokuya özgü dokuz fonksiyonel promotor bölgesine sahiptir. Bu promotor bölgesi, dört kısa 5' ekzona ve olgun BDNF proteinini sentezleyen 1 tane 3' ekzondan oluşmaktadır (Pruunsild 2007).



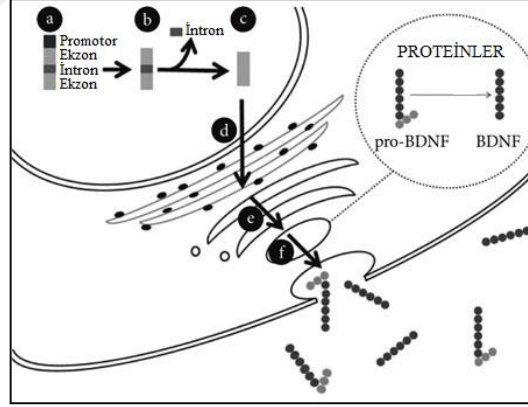
**Şekil 2.6.** BDNF gen yapısı ve transkript oluşumu

İnsan BDNF geni sekiz tanesi 5'-ekzon (gri kutular) ve bir adet 3'-ekzon (noktalı kutu) olmak üzere dokuz ekzondan oluşmaktadır. 3'-ekzon (Ekzon IX) açık okuma çerçevesine (open reading frame; ORF) sahiptir. Şekilde BDNF'nin major ekzonları (Ekzon I, II, IV ve VI) ile promotorları okla gösterilmiştir (Hu ve ark. 2010).

İnsan BDNF geni, her biri kendine özgü promoter bölgesine sahip; ancak farklı derecelerde tek bir 3' terminal eksona bağlanan (splays) en az altı tane 5' eksona sahiptir. 3' terminal kodonu, farklı BDNF pre-mRNA' ların birleşmesine olanak sağlayan tek işlevsel splays akseptör bölgesini içermekte ve olgun mRNA'nın tüm sekansını kodlamaktadır. Böylece, BDNF ekspresyonunu transkripsiyon düzeyinde düzenleyebilecek büyük bir potansiyel oluşmaktadır (Lu ve ark. 2003).

Ekzon 4; en çok akciğer ve kalpte eksprese olurken, ekson 1,2,3 transkriptleri en çok beyinde bulunur. Ekzon 3 içeren transkript, hipokampus ve kortekste nöronal aktivite kontrolünde önemli etkiye sahiptir. BDNF geninde çoklu promotorların bulunması, BDNF'nin ekspresyonunu, transkripsiyonunu, mRNA stabilitesini, translasyonunu, hücrel taşıyım ve dağılımını kontrol etmektedir (Egan ve ark. 2003).

BDNF sentezinin ilk aşamasında proBDNF kovalent olmayan dimer şeklinde bağlıdır. Post-translasyonel modifikasyonlarla bu öncül proteinin proteolitik enzim kesimi gerçekleştirilerek 27 kDa'lık olgun protein elde edilmektedir. (Şekil 2.7)

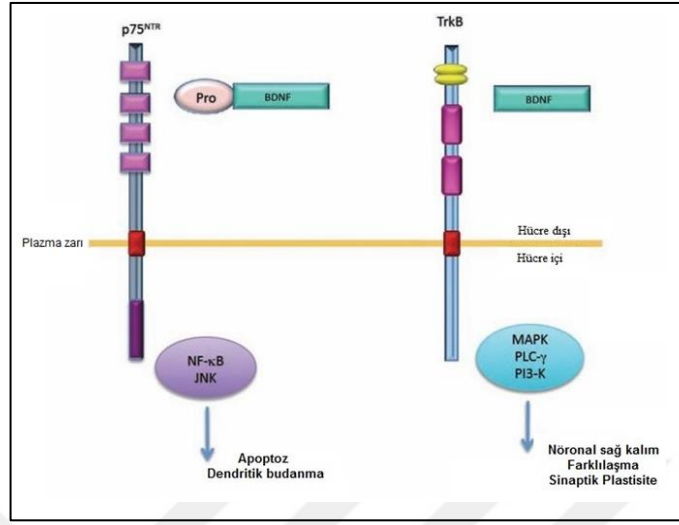


Şekil 2.7. pro- ve olgun BDNF salınımı

Olgun ve proBDNF olarak sinyal iletiminde farklı yolların aktifleşmesine aracılık ederler. pro-BDNF, p75 nörotrofin reseptörüne bağlanmaktadır. Bunun sonucunda aktifleşen reseptörü apoptotik hücrel süreçleri başlatmaktadır. Uyarılan NF- $\kappa$ B ve JNK yolları nöronların dentritik budanmasında etkili olmaktadır. Olgun BDNF ise TrkB reseptörüne bağlanarak farklı sinyal yollarını aktifleştirir (Chao 2003).

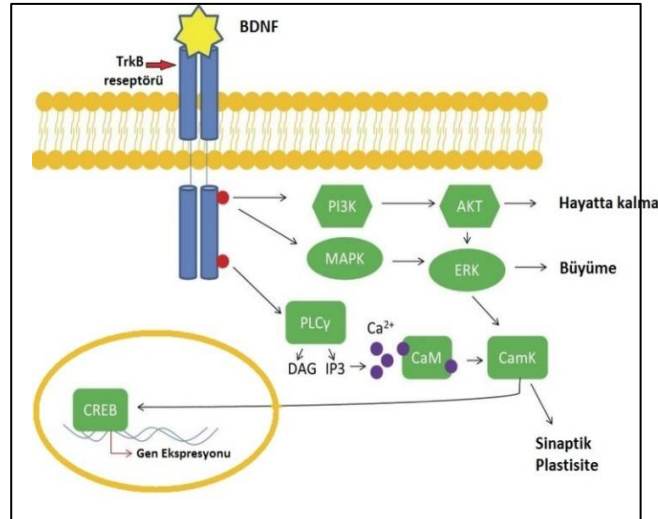


Pronörotrofinlerin ve olgun nörotrofinlerin biyolojik aktiviteleri Şekil 2.8'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. pro- ve olgun BDNF sinyal yolları

BDNF-TrkB etkileşimi nöronal sağ kalım, farklılaşma ve sinaptik plastisite gibi sinir hücrelerinde yaşamsal faaliyetlerin yürütülmesini sağlamaktadır (Şekil 2.8). Özellikle Ras/MAPK ve PI3K/Akt yolları bir dizi büyüme ve sağ kalımı etkileyen hücre içi sinyal yollarını uyarmaktadır (Reichardt 2006). BDNF, hücre sağ kalımını desteklemesinin yanı sıra, nörotransmitter modülatörü olarak da nöronal plastisitede yer almaktadır.



Şekil 2.9. BDNF ve TrkB etkileşimi

BDNF, TrkB reseptörüne bağlandığında öncelikle reseptör dimerize olur ve ardından reseptörün kendini fosforillemesi ile aktivasyon gerçekleşir. TrkB'nin sitoplazmik kısmındaki tirozin residüllerinde gerçekleşen fosforilasyon 3 önemli yolağın sinyallemesini yapar (Şekil 2.9).

- 1- MAPK yolağı: Nöronal farklılaşma, nörit gelişimi
- 2- PI3K yolağı: Hücre sağ kalım
- 3- PLC yolağı: sinaptik plastisite

BDNF'nin etkilediği sinyal yolları ve sistem düşünüldüğünde, bu faktörün salınımının azalması ya da bozulması durumu özellikle psikiyatrik hastalıklara konu olmaktadır (Autry ve Monteggia 2012).

### **2.2.1. BDNF ve Hastalıklarla İlişkisi**

Beynin tecrübe ve çevresel koşullara kendini adapte edip değiştirme yeteneği uzun ve kısa vadede sinaptik bağlantılara bağlıdır. Nöronal aktivite tarafından sinapsların sayısının ve dayanıklılığının değiştirilebileceği kanıtlanmıştır. Sinapsların aktivite-bağımlı değişimi, beyinin bilişsel kısımlarında ve gelişiminde kritik rol oynar. BDNF mRNA'sının, felce uğratılmış deney hayvanlarının hipokampusünde ciddi miktarda artışı, BDNF geninin aktivite-bağımlı transkripsiyonunu ilk destekleyen gözlem olmuştur. Sonrasında BDNF mRNA ekspresyonunun öğrenme ve hafızayla ilişkisinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır.

Nöronal aktivitenin, sinaptik esneklikte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Sinaps aktivitesi, esnekliği ve nörotrofik regülasyon arasındaki ilişkinin halen bazı belirlenmemiş kısımları bulunmasına rağmen, araştırmalar büyük bir hızla ilerlemektedir. En baskın hipoteze göre; Aktivite-bağımlı sinaptik değişimler, nörotrofinler aracılığıyla gerçekleşir. BDNF'yi ele alacak olursak, nöronal aktivite ile BDNF geninin transkripsiyonu, mRNA'sının taşınması, BDNF proteininin dendritlere geçişi ve salgılanması kontrol edilir (Egan ve ark. 2003).

Fiziksel aktivite, koşma, diyetel kısıtlamalar, uyku, sirkadiyan ritmi gibi fizyolojik durumlar BDNF gen ekspresyonunu etkiler. Bununla beraber, nöronal aktiviteyi etkileyen Alzheimer, iskemi, depresyon, stres gibi çeşitli patolojik durumlarda da BDNF'nin mRNA seviyesi etkilenir.

Ayrıca BDNF'nin diğere görevleri de; nöronal canlılık ve farklılaşma, sinaptik iletişim ve esneklik, transmitter sentezi, metabolize edilmesi ve salgılanması, post-sinaptik iyon kanalı akışı, dopaminerjik ve serotonerjik nöronların gelişimi ve canlılığının sağlanması şeklindedir (Jönsson ve ark. 2006).

BDNF, özellikle Dopamin 2 reseptör ailesine dâhil olan D3 reseptörünün ekspresyonunu da kontrol eder. Böylece beynin kortikal bölgesi, BDNF ve dopamin mekanizması arasındaki ilişki oldukça önemlidir. (Guillin ve ark. 2007)

Son dönem yapılan çalışmalar, BDNF seviyelerinde meydana gelen değişimin bağımlılıkla ilişkili mekanizmalarda önemli bir modülatör olarak yer alabileceğine değinmektedir. BDNF nöroadaptasyon süreçlerine de katkıda bulunarak bağımlılığın gelişimine yardımcı olur (McGough ve ark. 2010).

BDNF geni olmayan [homozigot BDNF (-/-)] ratlarda bazı periferik duyu nöronlarının gelişmediği ve bu hayvanların 3 haftadan daha uzun süre yaşayamadıkları, heterozigot ratların ise obez oldukları, nöbet eşiğinin yükseldiği ve uzamsal öğrenmenin (spatial learning) bozulduğu gösterilmiştir (Binder ve Scharfman 2004). Beyinde en fazla BDNF eksprese edilen bölge olan hipokampüste yapılan çalışmalarda, BDNF'nin nöron fonksiyonundaki rolünü gösteren çok fazla bulgu açığa çıkarılmıştır. Hipokampal kesitlere BDNF uygulanmasının spontan presinaptik ateşleme oranı ile post-sinaptik akımların sıklığını ve amplitüdünü önemli şekilde artırdığı gösterilmiştir (Levine ve ark. 1995).

Bu süreçler içinde en çok değerlendirilenler ise dopaminerjik ve serotonerjik sistemlerdir (Matsushita ve ark. 2004). Aile temelli bir ilişkilendirme çalışmasında BDNF'nin bipolar bozukluk için potansiyel bir yüksek risk alleli olduğu belirlenmiştir (Sklar ve ark. 2002).

### **2.2.2. BDNF Val66Met Tek Nükleotit Polimorfizmi**

BDNF beyinde striatal nöronların hayatta kalmasını sağlayan temel etkenlerden nörotrofin ailesine üye bir proteindir (NCBI:627). Sinir sistemi ve özgün nöron popülasyonları üzerinde etkili olan bu protein işlevsel olarak enerji metabolizması, davranış, ruh sağlığı, öğrenme, bellek, stres, ağrı ve apoptoz gibi süreçler için gereklidir.

BDNF geninde 40'tan fazla tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptanmıştır. Bu SNP'ler arasında BDNF Val66Met polimorfizmi (NCBI-dbSNP:rs6265 ya da G196A) sıklıkla çalışılmaktadır (Kaymaz ve ark. 2013). İşlevsel bir SNP olan bu polimorfizm kodlanan gen bölgesinde yer almaktadır. mRNA üzerinde 66. kodonda bulunan bu varyant proBDNF'yi oluşturur. Bu polimorfizmin yabancıl tipi; Val (G; Guanin) allelini, mutant tipi ise Met (A; Adenin) allelini oluşturmaktadır.

Met66 varyantı proBDNF'nin işleyişini ve nöronlar aktivite bağımlı salınımını etkilemektedir (Egan ve ark. 2003). Ancak, BDNF'deki bu değişiklik kendini olgun proteinden proteolitik yıkım ile ayrılan prekürsör peptidinde (proBDNF) gösterdiği için, olgun BDNF proteininin biyolojik aktivitesini etkilememektedir.

Egan ve ark. larının in vitro ve in vivo yaptıkları çalışmalar ile met allelin, BDNF'nin uyarıma bağlı salınımını ve intrasellüler fonksiyonlarını etkileyerek, anormal hipokampal fonksiyon ve daha zayıf sözel epizodik hafızaya neden olabileceğini ifade etmişlerdir (Egan ve ark. 2003). Karşılaştırmalı olarak hayvan modelleri ve insanda BDNF polimorfizmlerinin sinaptik plastisite üzerine etkilerinin paralellliğini vurgulayan çalışmalar yapılmıştır (Chen ve ark. 2004).

BDNF Val66Met polimorfizminin motor öğrenmeye etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, öğrenme becerileri dört gün boyunca test edilen bireyler arasında mutant allel (Met) taşıyanların polimorfizm taşımayan bireylere oranla daha fazla hata yapma sayılarına sahip olduğu görülmüştür (McHughen ve ark 2010). Böylece kısa süreli öğrenme ve hatırlama becerileri üzerinde bu polimorfizmin etkili olabileceği üzerinde durulmuş, beyinde motor sistem işleyişi ve kısa süreli plastisite açısından farklılıklara yol açabileceği gösterilmiştir.

A allelinin, öğrenme (zeka) gibi bilişsel beyin faaliyetleri azalttığı; bağımlılık, içe kapanma ve intihar eğilimi göstermede arttırdığı yönünde çalışmalar vardır (Marinos ve ark. 2014).

Gratacos ve arkadaşlarının yaptıkları meta-analiz çalışmasında duygudurum bozuklukları ile BDNF polimorfizminin ilişkisinin incelenmiş ve genel olarak beyaz ırktan Amerikalı ve Avrupalıların yer aldığı çalışmalarda Val66Val polimorfizminin, Asyalıların yer aldığı çalışmalarda ise Val66Met polimorfizminin ağırlıklı olarak saptandığını bildirmektedir (Gratacos ve ark. 2007).

Sklar ve ark.larının aile tabanlı 136 kişide yaptıkları çalışmada bipolar bozuklukta Met allel frekansının daha düşük olduğu ifade edilmiştir (Sklar ve ark. 2002).

Hünnerkopf ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada met/met genotipi ile nevrotik yapı arasında daha düşük bir ilişki olduğu ve dolayısı ile val allelinin depresyon ve anksiyete bozuklukları için artmış risk sebebi olabileceğini öne sürülmüştür (Hünnerkopf ve ark. 2007).

Miyajima ve ark.larının çalışmasında ise tüm kognitif testlerde met allel varlığında kognitif performansın azaldığı ve met allellerinin non demansif bireylerde koruyucu rolünün olmadığı gösterilmiştir (Miyajima ve ark. 2008).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu tez araştırması; Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hafsa Sultan Hastanesi, Tıbbi Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hasta grubu içermeyen ve tek grupta yürütülen bu tez araştırmasına, rastgele seçilen 18-55 yaş arasındaki 86 kadın ve 116 erkek birey olmak üzere 200 sağlıklı kişi katılmıştır. Katılımcıların seçimi ve numunelerin toplanması işlemleri; Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yerel Etik Kurul onayının alınması ile başlamıştır.

Normal popülasyonun (sağlıklı) örneklenmesinde çalışmaya katılım Celal Bayar Tıp Fakültesi çalışanları, öğrencileri ve Kan Merkezine başvuran bağışçılar arasından sağlanmıştır. Her katılımcıdan araştırma için hazırlanan aydınlatılmış onam formları imzalatılarak rıza beyanları alınmıştır.

#### **3.1. GEREÇ**

Moleküler genetik yöntemlerinden PCR-RFLP (Polimeraz zincir reaksiyonu-sınırlayıcı fragman uzunluk polimorfizmi)'nin uygulandığı bu çalışmada biyolojik materyal olarak sağlıklı gönüllülerden toplanan venöz kan örnekleri kullanılmıştır. DNA izolasyonu, PCR, restriksiyon enzim kesimi, elektroforez ve jel görüntüleme aşamaları için gerekli kimyasallar, malzemeler ve cihazlar aşağıdaki alt başlıklarda listelenmiştir.

##### **3.1.1. Kimyasallar**

- Qiagen DNA İzolasyon Kiti
- dNTP Mix (SolisBioDyne)
- Primer (Metabion; F ve R)
- Hot Start Taq DNA Polimeraz (5 unite/ $\mu$ l)
- Taq DNA polimeraz (SolisBioDyn)
- MgCl<sub>2</sub> (SolisBioDyne)
- Agaroz (Bioshop)
- TBE Buffer (10X Gibco)
- 100 bç DNA Ladder (Solis Bio Dyne)

- DNA loading dye (Solis BioDye)
- Etidyum Bromür
- PCR Buffer (SolisBioDyne)
- Restriksiyon Enzimi (NEB)

*PmI1* 5'... CAC↓GTG...3'  
3'... GTG↑CAC...5'

### **Tamponlar**

TBE (Tris-Borik Asit-EDTA), agaroz jel hazırlamak için 1X ve elektroforez tamponu olarak kullanmak için 10X olarak hazırlanır.

#### 10X TBE hazırlanışı;

- TBE tamponu (10X) ; 108 g Tris baz, 55 g Borik asit, 9.3 g EDTA
- 108 gram Tris baz + 55 gram Borik asit + 9,3 gram EDTA; tartılarak hepsi bir kaba konur ve üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklenir.

#### 1X TBE hazırlanışı;

TBE tamponu (1X); 100 ml 10X TBE tampona 900 ml distile su eklenerek derişim 10 kat seyreltilir.

### **Agaroz Jel**

- %2'lik agaroz jel hazırlamak için ticari toz agarozdan 2 g tartılır.
- Erlenide 100 ml 1X TBE tamponuna 2 g toz agaroz ilave edilerek mikro dalga fırında eritilir.
- Homojen bir eriyik haline gelen karışım, ılıklaştıktan sonra 5 µl Ethidyum Bromür (EtBr) eklenerek çalkalanır.
- Karışım yükleme kuyularını oluşturacak tarağın da takılı olduğu jel tablasına (tray) dökülür.
- Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılır.

### **Ethidyum Bromür**

10 mg/ml stok solüsyon elde etmek için, 1 g etidyum bromid 100 ml steril distile suda çözülür ve karanlık ortamda 4°C'de saklanır.

### 3.1.2. Cihazlar

- Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C)
- Hassas terazi
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich mikro 120)
- Mikrodalga fırın (Premier)
- Etüv (Nüve EN 500)
- Isıtıcı blok (Giosan-Dry block)
- Vortex (Biosan Combispin)
- DNA Thermal Cyclers (NyxTechnik ve SensoQuest)
- Nanodrop (Maestro Gen)
- Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (NyxTectik)
- Jel Görüntüleme Sistemi (NyxTechnik)

### 3.1.3. Diğer Araç ve Gereçler

- Steril ependorf tüpler
- Steril PCR tüpleri
- Otomatik pipetler
- Steril plastik pipet uçları
- Steril eldiven

## 3.2. YÖNTEM

Sağlıklı bireyler; birbirleri akrabalık ilişkisi bulunmayan, kronik herhangi bir hastalığı olmayan (sistemik, psikiyatrik, alkol bağımlılığı) ve farmakolojik tedavi almayan gönüllü katılımcılar arasından seçildi.

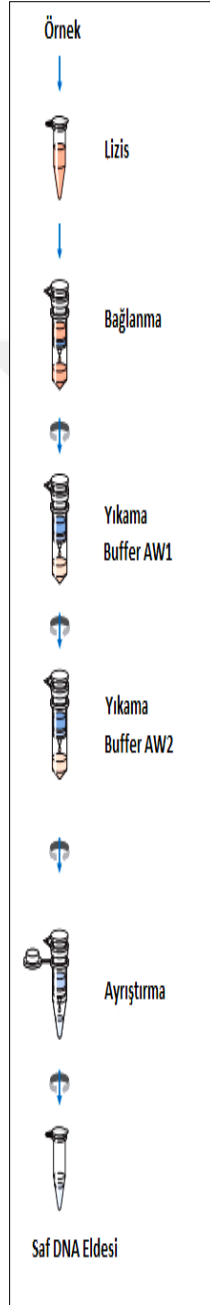
### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Kan örnekleri 5 ml'lik EDTA'lı tüplere alınarak, +4°C'de muhafaza edildi. Toplanan numunelerin DNA izolasyonları aynı gün içerisinde yapıldı. Kandan DNA saflaştırma işlemi "QIAamp DNA Blood Mini Kit" ile aşağıda belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi.



Kan örneklerinin alınından hemen sonra DNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri ise sonraki işlemler için -20°C’de kaldırılarak saklandı.

### DNA İzolasyon Protokülü (Spin Protokol)



- 200 µl kan örneği tüplere alınarak içerisine AL Buffer ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi.
- Tüpler 10-15 sn vorteksledikten sonra 56°C’de 15 dk ısıtıcı blokta bekletildi. inkübasyona bırakıldı.
- 210 µl ethanol (%96) ilave edildi ve 10-15 sn süresince vorteks yapıldı.
- Tüplerin içeriği spin kolonlara aktarıldı ve 8000 rpm’de (rotatory per minute) 1 dk santrifüj edildi.
- Kolondaki alt faz atıldıktan sonra filtreli kısım yeni tüpe aktarılarak 500 µl AW1 wash buffer ilave edildi ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Tekrar aynı şekilde filtreli kısım steril tüpe aktarılarak 500 µl AW2 wash buffer ilave edildi ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreli kısım steril tüpe alınıp üzerine bir şey koymadan 14000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
- Spin kolon 1,5 ml’lik yeni steril ependorf tüplerine yerleştirildikten sonra ayrı yerde sıcaklığı 56°C olacak şekilde ısıtıcı blokta bekletilen elüsyon tamponundan (elation buffer; AE Buffer) 200 µl ilave edildi.
- Sonrasında ise ependorf tüpleri 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi ve spin kolonlar atıldı.
- Ependorf tüpünde kalan (süzülen) içerik ile DNA izolasyon işlemi tamamlandı.

Şekil 3.1. DNA izolasyon basamakları

### 3.2.2. DNA'nın oğaltılması (PCR)

BDNF geni 2.ekzonda yer alan Val66Met polimorfizmini (NCBI-dbSNP rs6265) belirlemek için kullanılan ileri ve geri primerler Tablo-1'de yer almaktadır.

**Tablo 1.** Kullanılan primerler

Primerler (5'→3' Sekans)
İleri primer (F); 5' ACT CTG GAG AGC GTG AAT GG 3'
Geri primer (R); 5' AGA AGA GGA GGC TCC AAA GG 3'

BDNF'nin hedef bölgesini çoğaltımda seçilen primerler için PCR reaksiyonlarının koşulları aşağıda belirtildiği gibi uygulandı;

- PCR buffer (1X); 3 µl
- MgCl<sub>2</sub> (1,5mM) ;1,8 µl
- dNTP mix (0,2mM); 0.3 µl
- Primerler (İleri/Geri); (0,3µM); 0.45 µl
- Hot Taq DNA Polymerase (2,2 U); 0.44 µl
- Genomik DNA; 4 µl
- Distile su; 19,56 µl

PCR grade su ile 30 µl ye tamamlandı ve PCR işlemine gerçekleştirmek için, PCR cihazı (SensoQuest) aşağıda belirtilen sıcaklık ve srelere göre ayarlandı. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Bu şekilde elde edilen karışım Tablo-2'de gösterildiği gibi PCR cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tepkime sonunda; rs6265 için 197 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edildi.

**Tablo 2.** PCR reaksiyon koşulları

PCR basamakları	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	13 dk	1
Denatürasyon aşaması	95 °C	30 sn	38
Hibridizasyon (Bağlanma)	57 °C	30 sn	38
Sentez (Uzama)	72 °C	33 sn	38
Son sentez	72 °C	7 dk	1

PCR reaksiyonları ile elde edilen amplifikasyon sonuçlarının kontrolü için, PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile izlendi. İşlem basamakları şu şekildedir;

- %2'lik agaroz jel hazırlanarak içerisine 1,5 cm kalınlıkta olacak şekilde traye döküldü.
- Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi.
- Polimerizasyon sonrası tarak çıkarıldı.
- 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler ilk kuyucuğa 10 µl marker (100 bç'lik DNA Ladder) ve 10 µl örnek + 6 µl DNA Loading dye olacak şekilde jel kuyucuklarına yüklendi.

Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyaalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek 90 volt akımda 100 dk elektroforez cihazında yürütüldü. Süre sonunda jel çıkartılarak elektroforez görüntüleme cihazında UV ışığı altında görüntü alındı.

### **3.2.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Ürünler her enzime uygun olmak üzere, 10X NE Buffer tampon çözeltisi, enzim, PCR ürünü ve steril distile su ile total reaksiyon volümü 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Val66Met polimorfizmi için PCR ürünleri uygun ısı ve sürelerde inkübe ve inaktive edildi (Tablo 3). Daha sonra kesim ürünleri agaroz jelde yürütülüp, görüntülendi ve kaydedildi.

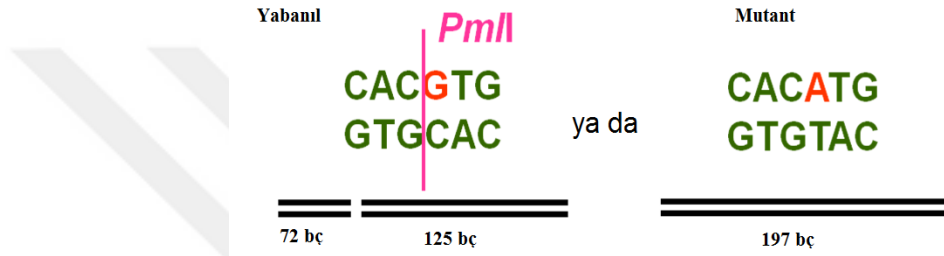
**Tablo 3.** RFLP için kullanılan enzim, distile su ve PCR ürünü miktarları

	Enzim	PCR ürünü	NE buffer	Su	İnkübasyon	İnaktivasyon
rs6265	0.8 µl <i>PmlI</i>	10µl DNA	4 µl	25,2 µl	37°C, 15 dk	65°C, 20 dk

PCR ürünüde kesim için *PmlI* enzimi kullanıldı.

5'... CAC↓GTG...3'

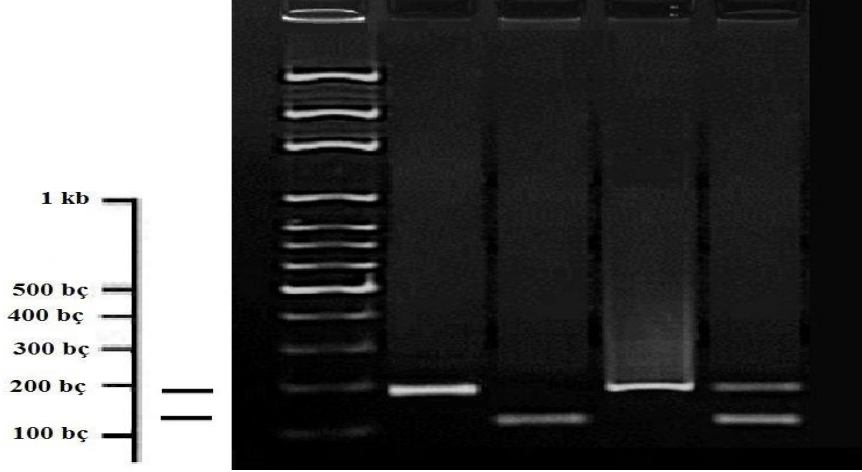
3'... GTG↑CAC...5'



**Şekil 3.2.** Restriksiyon enzim kesim bölgesi

Enzim yabanıl allelin olduğu (G; Val) diziyi kesmektedir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında değerlendirildi. Her iki allelinde bu mutasyonu taşıyan homozigot bireylerde (AA; met/met) kesilmemiş PCR ürünü tek band (197bç-197bç); baz değişimini tek allelde taşıyan GA (val/met) için heterozigot bireylerde biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde ve diğerleri onun altında iki band (197bç-125bç-72bç); GG (val/val) için homozigot 72 bç/125bç-72bç/125bç kesim ürünü tespit edildi.

Kesim ürünlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Agoroz jel hazırlandıktan sonra elektroforez tankına konarak üzerine 1X TBE ilave edildi. İlk kuyucuğa 10 µl marker (100 bç lik DNA Ladder), sonrakilere ise 10 µl örnek + 6 µl DNA Loading dye yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek 100 volt akımda 100 dk elektroforez cihazında yürütüldü. Süre sonunda jel çıkartılarak elektroforez görüntüleme cihazında UV ışığında görüntüsü alındı.



**Şekil 3.3.** BDNF geni rs6265 polimorfizmini içeren agaroz jel görüntüsü

- 1 : DNA markır: 100 bç
- 2 : AA met/met: 197 bç-kesilmemiş PCR ürünü
- 3 : GA val/met: 197 bç/125 bç, 72 bç
- 4 : GG val/val: 125, 72 bç

Elektroforez sonrasında elde edilen bant bölgeleri ladder'a göre analiz edildi ve polimorfizm taşıyıp taşıyamalarına göre mutant, heterozigot ve yabanıl olarak tespit edildi. Veriler kayıt altına alınarak istatistiksel analizle allel ve genotip frekansları belirlendi.

#### **3.2.4. İstatistiksel Analiz**

Hesaplanan BDNF Val66Met genotip frekanslarının Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğunu kontrol etmek için ki-kare iyi uyum testi (chi square goodness of fit test) kullanıldı. Değerlendirmelerde  $p < 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Hesaplamalarda SPSS programının 11.0 sürümü kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

BDNF Val66Met polimorfizminin sağlıklı popülasyondaki dağılımını inceleyen bu çalışmada 200 birey yer almıştır. Genotip verileri jel görüntülerinin yorumlanmasıyla toplanmıştır.

Genotip dağılımı; 137 kişide GG (%68,5), 61 kişide GA (%30,5) ve 2 kişide AA (%1) olarak saptanmıştır. Allel frekansları ise: G alleli için %83,75 ve A alleli için %16,25 olarak bulunmuştur (Tablo 4).

**Tablo 4.** Genotip ve allel frekansları

Sağlıklı kişiler	BDNF genotip sıklığı			Allel sıklığı	
	Val/Val GG	Val/Met AG	Met/Met AA	G (Val)	A (Met)
Toplam (n= 200)	137 (%68,5)	61 (%30,5)	2 (%1)	83,75	16,25
Kadın (n= 84)	54 (%64,3)	29 (%34,5)	1 (%1,2)	81,5	18,5
Erkek (n=116)	89 (%76,7)	26 (%22,4)	1 (%0,9)	87,9	12,1

\*G= Val/Val ve Val/Met,

\*\*A= Met/Met ve Val/Met

Çalışmaya dahil edilen katılımcıların 84'ü kadın (%48), 116'sı erkek (%52) bireyden oluşmaktadır. BDNF genindeki Val66Met polimorfizmi cinsiyet yönünden incelendiğinde Val (G) allel frekansının kadınlarda %81,5 ve erkeklerde %87,9 olarak belirlenmiştir. Polimorfizmin cinsiyete bağlı bir dağılım göstermediği görülmüştür. Ayrıca genotip oranları Hardy-Weinberg eşitliğine (HWE) uyum açısından gözlenen ve beklenen genotip oranları kıyaslanmıştır (Tablo 5). Çalışılan bu toplumda genotip dağılımı  $p>0,05$  ile Hardy-Weinberg eşitliğine uyduğu saptanmıştır. ( $\chi^2 =0,407$ ,  $df=1$ ;  $p= 3,841$ )

**Tablo 5.** BDNF Val66Met genotiplerinin dağılımı

Genotip	n (200)	Gözlenen Frekans (%)	Beklenen Frekans (%) $\chi^2 =0,407$
GG (val/val)	137	68,5	70,14
GA (val/met)	61	30,5	27,22
AA (met/met)	2	1	2,64

## 5. TARTIŞMA

Sağlıklı gönüllülerle yapılan ve toplam 200 bireyin dahil edildiği bu çalışmada incelenen BDNF geni, rs6265 veya G196A olarak bilinen, Val66Met polimorfizmine ait allel frekansı Val (G) alleli için %83,75 ve Met (A) alleli için %16,25 olarak saptanmıştır.

Ülkemizde Kaymaz ve ark.ları tarafından yapılan bir çalışmada; BDNF Val66Met polimorfizmi 376 sağlıklı (kontrol) bireyde mutant AA genotipinin dağılımı %1,6 ve A allel sıklığı ise %15 olarak belirlenmiştir (Kaymaz ve ark. 2013). Bulgularımız bu çalışma verileri ile örtüşmektedir.

Petryshen ve ark.larının farklı popülasyonlarda BDNF Val66Met polimorfizmini incelemeleri ile Met allel frekansının coğrafyaya ve etnik yapıya göre %0 - %72 arasında dağılım gösterdiğini ifade etmişlerdir (Petryshen ve ark. 2010).

Özdemir ve ark.ları tarafından ülkemizde yapılan bir çalışmada sağlıklı grupta G allel frekansı %86; A allel frekansı ise %14 olarak saptanmıştır (Özdemir ve ark. 2013). Yine ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada ise bu değerler sırasıyla G alleli için %87,1 ve A alleli için %12,9 olarak bulunmuştur (Sözügüzel ve ark. 2008).

Eker ve ark.larının 28 sağlıklı gönüllüde gri madde değişimini incelediği bir çalışmada katılımcıların 20'sinde GG, 8'inde ise GA genotipi saptanmış olup AA homozigot mutant genotipine rastlanmamıştır (Eker ve ark. 2005).

100 sağlıklı Koreli bireyin incelendiği bir çalışmada A allelini taşıyan bireylerin GG yabanıl genotipine sahip bireylere göre daha düşük serum BDNF düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir (Bhang ve ark. 2011).

556 Hırvat ve 244 Koreli sağlıklı gönüllü üzerinde yapılan bir çalışmada BDNF Val66Met polimorfizminin Korelilerde: 57 kişide Met/Met (AA %23,4), 112 kişide Val/Met (GA %45,9) ve 75 kişide Val/Val (GG %30,7); Hırvatlarda ise: 19 kişide Met/Met (AA %3,4), 180 kişide Val/Met (GA %32,4) ve 357 kişide Val/Val (GG %64,2) saptanmıştır (Pivac ve ark. 2009).

Harrisberger ve ark.ları tarafından 2014 yılında İsviçre’de sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bir çalışmada 413 Val/Val genotipi (GG %64,2), 204 Val/Met genotipi (GA %31,7) ve 26 Met/Met (AA %4,1) genotipi saptamışlardır.

Karnik ve ark.larının ABD’de Avrupalı 116 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada G allel frekansı %82,8 ve A allel frekansı ise %17,2; Huang ve ark.larının yine ABD’de Avrupalı 128 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada G allel frekansı %86,4; A allel frekansı ise %13,6; Goodyer ve ark.larının İngiltere’de 401 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada G allel frekansı %80,5; A allel frekansı ise %19,5; Lemos ve ark.larının Portekiz’de 287 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada G allel frekansı %80,3; A allel frekansı ise %19,7; Dmitrzak-Weglazz ve ark.larının Polonya’da 585 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise G allel frekansı %81,2; A allel frekansı ise %18,8 olarak saptanmıştır (Kokaeva ve ark. 2013) (Tablo 6).

**Tablo 6.** Diğer Popülasyonlardaki allel oranları

Ülke	Yayın	A alleli	G alleli
Rusya n=204	Kokaeva ve ark. 2013	0,265	0,735
Almanya n=153	Marziniak ve ark. 2008	0,239	0,761
USA (Washington) n=116	Karnik ve ark. 2010	0,172	0,828
Büyük Britanya n=401	Goodyer ve ark. 2010	0,195	0,805
Portekiz n=287	Lemos ve ark. 2010	0,197	0,803
USA(Teksas) n=128	Huang ve ark. 2007	0,136	0,864
Polonya n=585	Dmitrzak ve ark. 2010	0,188	0,812
Almanya n=445	Musil ve ark. 2012	0,207	0,793

Asya toplumunda Çin ve Japon gruplarında yapılan iki çalışmada ise, polimorfik met (A) allelinin sıklığı sırasıyla %61,6 ve %37,2 olarak bulunmuştur (Matsushita ve ark. 2004).

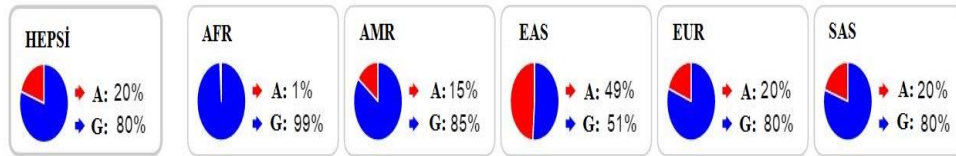
1000 Genom projesinde rapor edilen faz-III sonuçlarına göre; BDNF Val66Met polimorfizminin toplum geneli frekans değerleri; Avrupa toplumunda val (G) alleli için %80,3 ve met (A) alleli için %19,7 olduğu gösterilmiştir (Tablo 7) (Şekil 5.1.) (www.ensembl.org, Erişim tarihi 3 Haziran 2015)



**Tablo 7.** rs6265'in 1000 Genom projesinin Faz-III sonuçları

Popülasyon	Allel: frekansı (kişi)	Genotip: frekans (kişi sayı)
HEPSİ	G: 0,799 (4000) A: 0,201 (1008)	G G: 0,667 (1669) G A: 0,264 (662) A A: 0,069 (173)
AFR	G: 0,989 (1308) A: 0,011 (14)	C C: 0,979 (647) C A: 0,021 (14)
AMR	G: 0,847 (588) A: 0,153 (106)	C C: 0,718 (249) C A: 0,259 (90) A A: 0,023 (8)
EAS	G: 0,512 (516) A: 0,488 (492)	C C: 0,270 (136) C A: 0,484 (244) A A: 0,246 (124)
EUR	G: 0,803 (808) A: 0,197 (198)	G G: 0,642 (323) G A: 0,322 (162) A A: 0,036 (18)
SAS	G: 0,798 (780) A: 0,202 (198)	G G: 0,642 (314) G A: 0,311 (152) A A: 0,047 (23)

Kısaltmalar; AFR: Afrikalı, AMR: Amerikalı, EAS: Doğu Asya, EUR: Avrupalı, SAS: Güney Asya



**Şekil 5.1** Major Popülasyon gruplarında G ve A allelinin dağılımı (1000 Genom Projesi)

BDNF genotipi açısından olgularımızda polimorfik A allelinin oldukça düşük olduğu görülmüş, Avrupa toplumu ile daha yüksek oranda uyumlu olduğu gösterilmiştir. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bulgularımızın Avrupa ve beyaz ırktan Amerikalılarla yapılan çalışmaların verileriyle daha büyük benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte her ne kadar örneklem grubu aynı coğrafi bölgede yaşayan insanlardan oluşsa da, etnik kökenlerinin sorulmamış olması çalışmamız açısından bir kısıtlılık olarak görülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mental bozuklukların patofizyolojisine nörotrofinlerin etkileri ve sinaptik plastisite deregülasyonları sonucu oluştuğu artarak kabul gören görüşler arasındadır.

Toplumumuzda ve literatürde ilk çalışma olması dolayısıyla elde edilen bulguları sağlıklı olarak karşılaştırabilecek yeterli veri bulunmamakta ve bu bulguları literatüre kazandırmış olmaktadır.

Bu alandaki yapılan çalışmaların, daha geniş hasta grubu ve farklı dokulardaki ifadelerini ve incelemeye dahil edilerek geliştirilmesi ve kapsamının genişletilmesiyle BDNF geni üzerindeki eksik kalan kısımların aydınlatılacağı bu bağlamda öngörülebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical science*. 2006;110:175-191.
- Autry AE, Monteggia LM. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacol Rev*. 2012;64:238–258.
- Aydemir Ö, Deveci A. Stres ile İlişkili Duygudurum Bozukluklarında BTNF Ölçümleri: Klinik Çalışmaların Gözden Geçirilmesi. *Türk Psikiyatri Dergisi*. 2009;20(4):381-394.
- Bath KG, Schilit A, Lee FS. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. *Neuroscience*. 2013;239:149-156.
- Bhang S, Ahn JH, Choi SW. Brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter gene-linked promoter region genes alter serum level of brain-derived neurotrophic factor in humans. *J Affect Disord*. 2011;128(3):299-304.
- Burchard EG, Ziv E, Coyle N, Gomez SL, Tang H, Karter AJ, Mountain JL, Pérez-Stable EJ, Sheppard D, Risch N. The importance of race and ethnic background in biomedical research and clinical practice. *N Engl J Med*. 2003 Mar 20;348(12):1170-1175.
- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-131.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4:299-309.

- Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci.* 2004;24:4401-4411.
- Duman R and Monteggia L. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry* 2006; 59:1116-1127.
- Dmitrzak-Weglarz M, Skibinska M, Slopian A, Szczepankiewicz A, Rybakowski F, Kramer L, Hauser J, Rajewski A. BDNF Met66 allele is associated with anorexia nervosa in the Polish population. *Psychiatric genetics.* 2007;17(4):245-246.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF Val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003;112(2):257- 269.
- Eker Ç, Kitis Ö, Ozan E, Okur H, Eker OD, Ersoy MA, Akdeniz F, Vahip S, Akarsu N, Gönül AS. BDNF gene Val66met polymorphism associated grey matter changes in human brain. *Klinik Psikiyatri Bülteni.* 2005;15(3):104-111.
- Gönül AS, Akdeniz F. Depresyon, nöroplastisite, nörogenesis ve nörotrofik faktörler. *Klinik Psikiyatri.* 2002;4:51-56.
- Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-

related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 61:911-922.

Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature*. 2001;411(6833):86-99.

Gümrü S, Arıcıoğlu F. Neurotrophic Factors and Depression: Pathophysiology and Beyond, *MÜSBED* 2012;2(2):53-56.

Gürpınar D, Almıla E, Levent M. Depresyon ve Nöroplastisite. *Klinik Psikofarmakoloji bülteni*. 2007;17:100-110.

Kotan Z, Sarandöl A, Eker SS, Akkaya C. Depresyon, Nöroplastisite ve Nörotrofik Faktörler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry* 2009;1: 22-26.

Harrisberger F, Spalek K, Smieskova R, Schmidt A, Coynel D, Milnik A, Fastenrath M, Freytag V, Gschwind L, Walter A, Vogel T, Bendfeldt K, de Quervain DJ-F, Papassotiropoulos A, Borgwardt S. The association of the BDNF Val66Met polymorphism and the hippocampal volumes in healthy humans: a joint meta-analysis of published and new data. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2014;42:267-278.

He DY, Neasta J, Ron D. Epigenetic Regulation of BDNF Expression via the Scaffolding Protein RACK1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(25):19043-19050.

Hünnerkopf R, Strobel A, Gutknecht L, Brocke B, Lesch KP. Interaction between BDNF Val66Met and Dopamine Transporter Gene Variation Influences Anxiety-Related Traits. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:2552–2560.

Jönsson EG, Bodil EA, Anna S, Agneta G, Bettina K, Arnaldo F, Maria V, Birgit E, Birgitta WH, Johannes S, Sven C, Ingrid A, Göran C, Sedvalla HH, Lars T. Brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) variants and schizophrenia: an association study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30:924-33.

Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry research*. 2002;109(2):143-148.

Karnik MS, Wang L, Barch DM, Morris JC, Csernansky JG. BDNF polymorphism rs6265 and hippocampal structure and memory performance in healthy control subjects. *Psychiatry Res*. 2010;178:425-429.

Kaymaz BT, Altıntoprak AE, Kayahan B, Aktan Ç, Coşkunol H, Kosova B. Türk alkol bağımlılarında beyin kaynaklı nörotrofik faktör Val66Met polimorfizminin alkol bağımlılığına yatkınlık üzerine etkisinin araştırılması. *Anadolu Psikiyatri Derg*. 2013;14(1):1-9.

Kokaeva ZG, Kochetkova TO, Afonchikova EV, Kondratyeva NS, Klimov EA. Brain Derived Neurotrophic Factor Gene (BDNF) Polymorphism among Moscow Citizens. *Russian Journal of Genetics*. 2013;49(12):1250–1253.

Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8074–8077.

Licinio J, Dong C, Wong M-L. Novel Sequence Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Association with Major Depression and Antidepressant Treatment Response. *archgenpsychiatry*. 2009;66(5):488-497.

Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Duarte CB. "Neurotrophin Signaling and Cell Survival." In Interaction between Neurons and Glia in Aging and Disease, edited by J Malva, C Rego, R Cunha, CR Oliveira, 137-172: Springer US, 2007.

Marinos G, Naziris N, Limnaios SA, Drakoulis N. Genes and personality characteristics: Possible association of the genetic background with intelligence and decision making in 830 Caucasian Greek subjects. *Meta Gene*. 2014;2:844–853

Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A. Association Study of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Polymorphism and Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*.2004;28:1609-1612.

McHughen SA, Rodriguez PF, Kleim JA, Kleim ED, Crespo LM, Procaccio V, Cramer SC. BDNF val66met polymorphism influences motor system function in the human brain. *Cereb Cortex*. 2010;20(5):1254-1262.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vosari R. Brain derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;63:71–124.

Myajima F, Ollier W, Mayes A. brain-derived neurotrophic factor polymorphism val66met influences cognitive abilities in the elderly. *genes, brain and behavior*. 2008;7:411–417.

Özdemir K. Mesane Disfonksiyonlu Çocuklarda Tanıda ve Tedavi Yanıtının Değerlendirilmesinde İdrar Sınır Büyüme Faktörü (NGF), Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Düzeyleri İle NGF (Ala35val) ve BDNF (Val66met) Genetik Polimorfizmlerinin Rolü. EÜ. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2013, İzmir (Danışman: Prof. Dr. Sevgi Mir).

- Petryshen TL, Sabeti PC, Aldinger KA, Fry B, Fan JB, Schaffner SF, Waggoner SG, Tahl AR, Sklar P. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry*. 2010;15(8):810-815.
- Pivac N, Kim B, Nedic G, Joo YH, Kozaric-Kovacic D, Hong JP, Muck-Seler D. Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy participants. *Croat Med J* 2009;50:43-48.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90(3):397-406.
- Reichardt, L.F. Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361:1545-1564.
- Ribasés M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderluh M, Cavallini MC, Cellini E, Di Bella D, Erzegoves S, Foulon C, Gabrovsek M, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Kipman A, Komel R, Nacmias B, Remschmid H, Ricca V, Sorbi S, Wagner G, Treasure J, Collier DA, Estivill X. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet* 2004;13(12):1205-1212.
- Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;126:122-123.
- Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, De Paulo JR, Lander ES.



Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry*. 2002;7(6):579-593.

Sözügüzel MD. Şizofreni ve Bipolar Hastalıklarında Rol Oynayan Genlerin Araştırılması. KÜ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Kocaeli (Danışman: Prof. Dr. Ali SAZCI)

Toro R, Chupin M, Garnero L, Leonard G, Perron M, Pike B. Brain volumes and Val66Met polymorphism of the BDNF gene: local or global effects? *Brain Struct Funct*. 2009;213:501-509.

Uzday İT. Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri. Nöroplastisite ve Depresyon. 1. baskı, Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, 2004:89-91.

Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends Neurosci*. 2002;25:501-505.

Yano H, Chao MV. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv*. 2000;74:253-260.

Yulug B, Ozan E, Gonul AS, Kilic E. ve ark. Brain-derived neurotrophic factor, stres and depression: A minireview. *Brain Res Bull*. 2009;78:267-269.

## EKLER

## EK-1

### ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

#### **ARAŞTIRMANIN ADI:**

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Genindeki Val66Met Polimorfizminin Sağlıklı Popülasyondaki Dağılımı

Bu araştırma Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi için yapılacaktır. Hafsa Sultan Hastanesine başvuruda bulunan “sağlıklı” kriterlerine uyan gönüllülerin katılacağı bir çalışmadır. Bunlara uygun olabileceğiniz öngörüldüğü için bu çalışmaya dahil edildiniz. Bu araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Bu form araştırmamız hakkında bilgilendirilmeniz ve kendi isteğinizle katılmayı kabul ettiğinizi beyan etmeniz için hazırlanmıştır.

#### **Araştırma Konusu:**

Beyin kaynaklı büyüme faktörü (BDNF), beyin hücrelerinin büyümesi, farklılaşması, yaşamlarını sürdürmesinde rol oynayan önemli bir büyüme faktörüdür. Bu proteinin psikiyatrik hastalıklarda kan düzeyinde belirgin azalmalar göstermesi bu genin önemine işaret etmektedir. Aynı zamanda sinir sistemini ve insan zihinsel sağlığını koruyan bu protein, sentezlendiği BDNF gen yapısında farklılıklar göstermesi ile etkisini bireyler arasında bazı hastalık/lara karşı duyarlı olmaları açısından genetik risk oluşturduğu düşünülmektedir. Başta depresyon olmak üzere birçok nöropsikiyatrik hastalıkta bu gen üzerinde durulmakta ve suçlanmaktadır. Projenin amacı bu genin farklılık gösterdiği bir noktanın (Val66Met polimorfizmi) sağlıklı bireylerde saptanması ile Türk toplumunun normal bireyleri arasındaki dağılımını ve oranlarını belirlemektir. Araştırmada toplam 200 kişiden kan örneği alınıp çalışılacaktır.

#### **Gönüllü hakları:**

- Araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir.
- Araştırma sırasında istediğiniz anda haber vererek çalışmadan çekilebilir ya da araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
- Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz. Ayrıca çalışmada yapılacak işlemler için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- Yapılacak çalışma herhangi bir tedavi yöntemi değildir.
- Sizden (gönüllüden) damar yolundan kan alınacak ve bu kan örneğinden DNA ayrıştırılarak sadece “Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Genindeki Val66Met Polimorfizminin Sağlıklı Popülasyondaki Dağılımı” adlı çalışmada kullanılacaktır. Size uygulanacak işlemde herhangi bir sağlık riski bulunmamaktadır.
- Çalışma için sizden talep ettiğimiz kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışma sonunda elde edilecek bilgiler başka şahıslarla (üçüncü şahıs ya da şirket/kurumlara) paylaşılmayacaktır.

#### **Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Katılımcı** Adı, soyadı:  
Tel.

İmza:  
Adres.

T.C.  
Celal Bayar Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu  
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	20 / 11 / 2013 / 20478486 - 257					
ARAŞTIRMANIN ADI	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Genindeki Val66Met Polimorfizminin Sağlıklı Popülasyondaki Dağılımı					
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM - Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Genetik A.D					
ARAŞTIRMA EKİBİ	Öznu ERDOĞAN					
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>		YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>		AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma başvuru formu ve gerekli ekleri incelenmiş; Etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Prof. Dr. Necip KUTLU Fizyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Tuncay VAROL Anatomi AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Doç. Dr. Selda BEREKET Antrenörlük Eğitimi AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Gönül Dinç HORASAN Halk Sağlığı AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Doç. Dr. F. Sırrı ÇAM Tıbbi Genetik AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cengiz KIRMAZ Alerji İmmunoloji BD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç. Dr. Peyker TEMİZ Patoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ece ONUR Tıbbi Biyokimya AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Doç. Dr. Artuner DEVECİ Psikiyatri AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Pelin ERTAN Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Canan TIKIZ F. T. R. Algoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemenliği AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Erhun KASIRGA Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Nazlı KÜEY Avukat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Gönül Tezcan KELEŞ Anestezi ve Reanimasyon AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Çiğdem HÜNER Sivil Üye	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mahmut AŞIRDIZER Adli Tıp AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.						
						Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Başkan

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı	Öznur	Soyadı	Erdoğan
Doğ.Yeri	İzmir	Doğ. Tar.	27.07.1986
Uyruğu	T.C.	T.C. No.	
Email	<a href="mailto:oznurerdogn@gmail.com">oznurerdogn@gmail.com</a>	Tel	

## Eğitim Düzey

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yük.Lis.	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji A.D.	2015
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Selma Yiğitalp Lisesi	2003

## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsof Office (Word, Powerpoint, Excel)	İyi
Endnote	Orta

## İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Fen Bilgisi Öğretmeni	Sevgiyle Eğitim Etüt Merkezi	2011-2012

## Katıldığı Kurslar

Laboratuvar Güvenliği Uygulamalı Eğitim, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, MANİSA (11 Mayıs 2012)

Araştırma Planlama ve Analiz Yöntemleri, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, MANİSA (7-19 Mart 2012)

## Bilimsel Toplantılar

- I. Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, (6-7 Nisan 2013) Öğrenci Sunumları; sunu konusu: "Amniyotik Kök Hücrelerin Etik Boyutu"
- II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, (17-20 Nisan 2014) Öğrenci Sunumları; sunu konusu: "Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Genindeki Val66met Polimorfizminin Sağlıklı Popülasyondaki Dağılımı"

## Bildiriler

-Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında İncelenen 500 Kişiyeye Ait Kemik İliği Sitogenetik Verilerinin Değerlendirilmesi" Poster bildirisi, 10. Tıbbi Genetik Kongresi, Tıbbi Genetik Derneği, Uludağ. 19-23 Aralık 2012.

-Tekrarlayan Düşük Öykülü Bir Ailede Dengeli Resiprokal Translokasyon Taşıyıcılığı: t(10;16) Poster bildirisi, 11. Tıbbi Genetik Kongresi, Tıbbi Genetik Derneği, İstanbul. 24-27 Eylül 2014.