

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK OLGULARINDA, GDNF
(GLİA KÖKENLİ NÖROTROFİK FAKTÖR)
GENİNİN SNP'LER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

ROGHAİYEH SAFARI

**MOLEKÜLER TIP
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2013

DEU.HSI.PhD/2009970211

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK OLGULARINDA, GDNF
(GLİA KÖKENLİ NÖROTROFİK FAKTÖR)
GENİNİN SNP'LER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

**MOLEKÜLER TIP
DOKTORA TEZİ**

ROGHAİYEH SAFARI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Meral SAKIZLI

DEU.HSI.PhD/2009970211

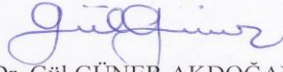
Bu tez, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında
DEÜ 2011.KB.SAG.022 no ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Doktora programı öğrencisi Roghaiyeh SAFARİ '**Bipolar bozukluk olgularında GDNF (Glia kökenli nörotrofik faktör) geninin SNP'ler yönünden incelenmesi**' konulu Doktora tezini 04.11.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

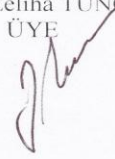
Prof. Dr. Meral SAKIZLI
BAŞKAN



Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
ÜYE



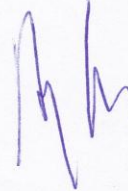
Prof. Dr. Zeliha TUNCA
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU
ÜYE



Doç. Dr. Aydan ÇELEBİLER
ÜYE



Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP
Yedek ÜYE

Doç. Dr. Buket KOSOVA
Yedek ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİ.....	8
2.1. Bipolar Bozukluğu (Mani ve Depresyon Hastalığı)	8
2.2. Bipolar Bozukluğun Tanı Kriterleri.....	8
2.2.1. DSM-IV-TR’de Manik Dönem Ölçütleri.....	9
2.2.2. DSM-IV-TR’de Hipomanik Dönem Ölçütleri.....	10
2.2.3. DSM-IV-TR’de Depresif Dönem Ölçütleri.....	10
2.2.4. DSM-IV-TR’de Bipolar Bozukluk Çeşitleri.....	11
2.3. Bipolar Bozukluğun Epidemiyolojisi.....	12
2.3.1. Genetik Epidemiyoloji.....	13
2.4. Bipolar Bozukluğun Etyolojisi.....	14
2.4.1. Çevresel Faktörler.....	14
2.4.2. Genetik Etyoloji.....	15
2.5. GDNF; Glial Cell Derived Neurotrophic Factor.....	16
2.5.1. <i>GDNF</i> Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı.....	16

2.5.2. GDNF Protein Yapısı ve İşlevi.....	16
2.6. MICU1.....	20
2.6.1. <i>MICU1</i> Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı.....	20
2.6.2. MICU1 Protein Yapısı ve İşlevi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi.....	23
3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma grupları.....	23
3.3. Çalışma Materyalı.....	23
3.4. Araştırmanın Değişkenleri.....	23
3.5. Veri Toplama Araçları.....	23
3.5.1. Bilgi Toplama.....	23
3.5.2. Kullanılan Aletler.....	24
3.5.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	25
3.5.4. Araştırmanın Yöntemi.....	25
3.5.4.1. Denek Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı.....	25
3.5.4.2. Kan Örneklerinden DNA Eldesi.....	26
3.5.4.3. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması.....	27
3.5.4.4. PCR Primerlerinin Dizayn Edilmesi.....	27
3.5.4.5. PCR Standardizasyonu.....	29
3.5.4.6. PCR'ın Hazırlanışı.....	30
3.5.4.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi.....	33
3.5.4.7.1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	33

3.5.4.7.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi.....	33
3.5.4.7.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülemesi.....	33
3.5.4.8. DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları.....	33
3.6. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	34
3. 7. Verilerin Değerlendirmesi.....	34
3.7.1. DNA Dizi Analizlerinin Değerlendirilmesi ve Kullanılan Yöntemler.....	34
3.7.1.1. Blast Analizi.....	35
3.7.1.2. Dizi Analiz Programları.....	35
3.7.1.3. Standart Analiz.....	35
3.7.2. Verilerin İstatistiği.....	35
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	35
3.9. Etik Kurul Onayı.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	37
4.2. DNA İzolasyon ve Ölçümleri.....	39
4.3. PCR Çalışması ve PCR Örneklerinin Görüntülenmesi.....	41
4.4. DNA Dizi Analizi.....	42
4.5. Araştırmada Saptanan Değişiklikler.....	42
4.5.1. rs2075680 SNP.....	43
4.5.2. rs79669773 SNP	51
4.5.3. rs62360370 SNP.....	55
4.5.4. rs78613670 SNP.....	59
4.5.5. rs142426358 SNP.....	60
4.5.6. rs147083416 SNP.....	61

4.5.7. rs115322727 SNP.....	62
4.5.8. Çalışmada Saptanan Yeni SNP'ler.....	63
4.5.9. MICU1 geninde saptanan mutasyon/SNP'ler.....	65
4.6. Çalışmada saptanan SNP'lerin minör allel frekansları.....	67
4.7. GDNF geninde saptanan SNP'lerin bipolar bozukluğun başlangıç yaş üzerindeki etkisi.....	68
5.TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
7. KAYNAKLAR.....	76
8. EKLER.....	86
Ek-1:Genetik Çalışma –Hastalar ve Birinci Derece Akrabalar İçin Bilgilendirilmiş Olur Formu.....	86
Ek-2: Primerlerin DNA Dizisi Üzerindeki yerleşkesi.....	88
EK-3:Etik Kurul Onayı.....	91
EK-4:Özgeçmiş.....	92

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Bipolar Bozukluğun Genetiği.....	13
Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Aletler.....	24
Tablo 3. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Melzemeler.....	25
Tablo 4. GDNF Geninin 3'UTR (Untranslated Region) Bölgesi İçin Tasarlanan Primer Çiftleri.....	27
Tablo 5. MICU1 İçin Tasarlanan Primer Çiftleri.....	29
Tablo 6. Bağlanma Sıcaklığı İçin Kullanılan Gradyent.....	29
Tablo 7. Çift Primerlerin PCR Profilleri.....	30
Tablo 8. GDNF Geninin 5'yukarı Bölgesine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları	31
Tablo 9. GDNF 3'UTR1.Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.....	31
Tablo 10. GDNF 3'UTR2.Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları...	31
Tablo 11. GDNF 3'UTR3.Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları...	31
Tablo 12. GDNF 3'UTR4.Çift Primere PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.....	32
Tablo 13. MICU1, 1.Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.....	32
Tablo 14. MICU1, 2.Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.....	32
Tablo 15. MICU1, 3.Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.....	32
Tablo 16. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	34
Tablo 17. Çalışmanın Hasta Grubuna Ait Kod, Cinsiyet ve Hastalığın Başlangıç Yaşı.....	37

Tablo 18. Çalışmanın Kontrol Grubuna Ait Kod ve Cinsiyet	37
Tablo 19. Çalışmanın Akraba Grubuna Ait Kod, Cinsiyet.....	38
Tablo 20. Çalışma Gruplarının Başlangıç yaş Ortalaması, Erkek/Kadın Oranı, Başlangıç yaşı Yüzdesi.....	38
Tablo 21. DNA Örneklerinin Pikodrop Ölçümleri	39
Tablo 22. Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	43
Tablo 23. GDNF Geninin Ekson 1'den Önce 5'UTR ve 3'UTR Bölgelerine Ait Bulunan SNP'lerin, Kromozom Yerleşimleri, Allele and Genotip Frekansları ve Bipolar Bozukluğu ile İlişki Analizlerinin Sonucu.....	49
Tablo24. İlişki Analizleri Bipolar Bozukluğu Hasta Grubu ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasında GDNF rs2075680 SNP'nin (5:37840642) Allel Frekansında Anlamlı Fark Olduğunu Gösterdi.....	51
Tablo 25. rs79669773 T>C SNP (5:37814765) Bipolar Bozukluğu Üzerinde Etkisi Yoktur.....	52
Tablo 26. rs62360370 SNP (5:37814489) Erkek Hasta Grubu ve Erkek Sağlıklı Grubu Arasında Anlamlı Aark Aösterdi.....	59
Tablo 27. Saptanan SNP'lerin Çalışmada Hesaplanan ve 1000 Genom Projesinde Saptanan Minör Allel Frekansları.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Bipolar Bozukluğunda Gen-Çevre Etkileşimi (Smith D et al, 2012).....	15
Şekik 2. <i>GDNF</i> 'nin Kromozom Yerleşimi (http://genome.ucsc.edu).....	16
Şekil 3. GDNF Monomer (A) ve Homodimerinin (B) Yapısı (Wang X, 2012)	17
Şekil 4. Gelişim Sırasında GDNF Ligand Ailesinin <i>invivo</i> Somatik Algi ve Motor Nöronlardaki Etkisi (Airaksinen M et al, 2002)	18
Şekil 5. GDNF –Ligand Ailesi ve Reseptör Etkileşimi (Airaksinen M et al, 2002).....	19
Şekil 6. RET'e Bağlı GDNF-GFR1 Sinyal İletimi (Airaksinen M et al, 2002).....	19
Şekik 7. <i>MICU1</i> 'in Kromozom Yerleşimi (http://genome.ucsc.edu).....	20
Şekil 8. Mitokondri iç Zarında Yerleşik Olan Ca^{2+} Akın Mekanizmaları (Pan et al, 2011).	21
Şekil 9. MICU1 Proteinin Hücre Stresi ve ROS Yapımı Üzerindeki Etkisi (Mallilankaraman K,2012)	22
Şekil 10. MICU1 Proteini 1. Kalsiyum Bağlanma Bölgesi (sarı ile gösterilmiştir) (http://www.uniprot.org/blast)	28
Şekil 11. MICU1 Proteini 2. Kalsiyum Bağlanma Bölgesi (sarı ile gösterilmiştir) (http://www.uniprot.org/blast)	28
Şekil 12. Bazı Olgulara Ait DNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüsü	39
Şekil 13. Bazı Olguların 5'UTR Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz jel Görüntüsü.....	41
Şekil 14. Bazı Olguların 3'UTR 4. Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz jel Görüntüsü.....	41
Şekil 15. Bazı Olguların 3'UTR 3. Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz jel Görüntüsü.	42

Şekil 16. rs2075680 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	44
Şekil 17. rs79669773 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	53
Şekil 18. rs62360370 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	56
Şekil 19. rs78613670 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	60
Şekil 20. rs142426358 T>C SNP'nin <i>GDNF</i> Geninin Olduğu Bölge ve hsa-mir-216a Arasındaki Homoloji.....	61
Şekil 21. rs142426358 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	61
Şekil 22. rs147083416 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	62
Şekil 23. rs115322727 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan Değişiklikler ve Denek Kodları.....	63
Şekil 24. BG310 Sağlıklı Gönüllüde Saptanan Yeni Değişiklik ve Kullanılan Referans Dizi.....	64
Şekil 25. BG518 ve BG554 Hastalarda Saptanan Yeni Değişiklik ve Kullanılan Referans Dizi.....	65
Şekil 26. MICU1 proteinin amino asit dizisinin türler arası karşılaştırılması.....	66

KISALTMALAR

BB: Bipolar Bozukluk

GDNF: Glial Derived Neurotrophic Factor (Glia Kökenli Nörotrofik faktör)

SNP: Single Nukleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizm)

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ICD: International Classification of Disease (Hastalıkların Uluslararası Sınıflandırılması)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir Reaksiyonu)

APA: Amerikan Psychiatric Association (Amerikan Psikiyatri Birliği)

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual Disorders-IV

DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual Disorders-IV- Text Revision

GFR α : GDNF Family Receptor- α (GDNF Ailesi Reseptör- α)

GFLs: GDNF Family Ligands (GDNF ailesi ligandları)

GPI çıpa: Glycosylphosphatidylinositol çıpa

SFK: Src-family kinase (Src-Ailesi kinaz)

MICU1: Mitochondrial Calcium Uptake 1 (Mitokondri kalsiyum alımı 1)

MCU: Mitochondrial Calcium Uniporter (Mitokondri kalsiyum uniporter)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

TBE: Tris/Borate/EDTA

OD: Optik Dansite

MAF: Minor Allele Frequency (En küçük Allel Frekansı)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

L95 : Lower 95% confidence interval (Düşük %95 Güvenirlilik Aralığı)

U95: Upper 95% confidence interval (Yüksek %95 Güvenirlilik Aralığı)

GA: Güven Aralığı

GOO: Göreceli Olasılıklar Oranı

ÖZET

Doktora Tezi

BİPOLAR BOZUKLUK OLGULARINDA, GDNF (GLİA KÖKENLİ NÖROTROFİK FAKTÖR)
GENİNİN SNP'LER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

(Roghayeh Safari)

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Doktora Programı

Bipolar bozukluk (BB) manik ve depresif epizotlarla ilerleyen ciddi bir psikiyatrik bozukluktur. Bipolar Bozukluk genellikle, psikoz, madde kullanımı, psikososyal uyumsuzluk ve intihar gibi kötü sonuçlara neden olur. Beyaz ırkta hastalığın görülme sıklığı %1,5-3,9 gibi yüksek değerlerdedir. Hastalığın %20'si intiharla sonuçlanmakla birlikte, tedavi edilmemiş bedensel sorunlardan dolayı da hastaların ömrü %30 oranında kısalmaktadır. Ayrıca bu kronik hastalık bireye ailesine ve topluma önemli sosyoekonomik yük getirmektedir.

Multigenik, multifaktoryal olması nedeniyle genetik yönden kesin verilere ulaşılamamasına rağmen kalıtsal geçiş olasılığı %60-80'nin üzerindedir. Gerek bağlantı analizleri ile kromozomal lokasyon gerekse, çeşitli moleküler genetik yöntemlerle aday genlerin tek nükleotid mutasyon/polimorfizmlerinin belirlenmesi yönünde yoğun araştırma yapılmıştır. Ancak, manik-depresif hastalığın çok sayıda genin birleşik etkisiyle ve çevre koşullarına bağlı olarak ortaya çıktığı görüşü kuvvetlenmiştir. Genetik mekanizmaların iyi anlaşılması hastalığın erken belirlenmesi ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek için bir yol göstererek hastalıktan dolayı ölümlerin azalmasını yanı sıra bireysel ve toplumsal hasarların da önüne geçilebilir.

Çalışmamız, beyin yapılanmasında ve korunmasında önemli rolü olduğu bilinen GDNF (Glial Kökenli Nörotrofik Faktör) ve kalsiyum homeostazını denetleyerek sinir hücrelerinin ölüm ve sağ kalımında önemli görev aldığı bilinen MICU1 (Mitokondri kalsiyum Alımı 1) moleküllerinin bipolar bozuklukla ilişkisinin olabileceği hipotezi üzerine kuruldu. Bu amaçla GDNF yapımının denetiminde önemli olabilecek dizi farklılıklarını araştırmayı öngördük. Bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz GDNF geninin 5'yukarısı ve 3'UTR bölgeleri ile MICU1 geninin kalsiyum bağlama bölgelerinin mutasyon/polimorfizm yönünden araştırılması ve eğer varsa, hastalıkla ilişkilerinin yorumlanmasını amaçladık.

Dokuz Eylül Üniversitesi psikiyatri bölümüne gelen DSM IV (*Diagnostic and Statistical Manual Disorders-IV*) tanı kriterlerine uygun altmışaltı gönüllü hasta, yirmi yedi birinci derece akraba ve elli altı sağlıklı gönüllüden DNA elde etmek için kan alınmış ve DNA elde edildikten sonra PCR (Polimeraz zincir reaksiyon) ile ilgili bölgeler çoğaltılmış ve DNA dizi analizi ile tarandıktan sonra saptanan SNP'ler ile hastalığın ilişkisi yorumlanmıştır.

Sonuç olarak GDNF geninde on SNP saptanmıştır. SNP'lerin üç'tanesi ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. GDNF genin 5'yukarısında saptanan rs2075680 C>A polimorfizmi hasta grubu ve sağlıklı gönüllü grubu arasında anlamlı olarak farklı görünmüştür. Bu fark erkek grupları arasında anlamlı fark göstermesine rağmen kadın gruplar arasında fark anlamlı değildir. Yapılan incelemede MICU1 geninde kalsiyum bağlanma bölgelerinde hiç bir mutasyon/SNP görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Bipolar bozukluk, GDNF, MICU1, SNP

ABSTRACT

Doctorate Thesis

THE EFFECT OF GLIAL DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR MUTATIONS/POLYMORPHISMS ON THE DEVELOPMENT OF BIPOLAR DISORDER

(Roghaiyeh Safari)

Dokuz Eylul University Health Science Institute

Molecular Medicine Department

PhD Program

Bipolar disorder is a serious psychiatric disorder with manic and depressive episodes. Psychosis, substance abuse, psychosocial disturbances and suicide are the most frequent consequences. Bipolar disorder has a high incidence, such as 1,5 to 4% in Caucasians.

Twenty percent of the disease results in suicide, and because of untreated physical problems the life of patients is 30% shorter. In addition, this chronic disease bring important socio-economic burden to the individual, family and society.

Although its genetic background is not solved yet, probably because of its multi factorial character, heritability chance predicted as 60-80%. Conclusion of the heritable character of the disease is followed by new approaches like; linkage analysis to detect candidate chromosomal locations and search for candidate genes in these locations. Results demonstrated that manic-depressive illness was caused by the combined effects of many genes plus environment. Understanding the underlying mechanisms and specifying genes has great importance in early detection and for new treatment strategies.

The aim of this project is to search for mutations/polymorphisms in 5'upstream and 3'UTR of GDNF (Glial Derived Neurotropic Factor) gene and calcium binding sites of MICU1 (Mitochondrial Calcium Uptake 1) gene that we suspect its involvement in this disease. For this study we collected blood samples to isolate DNAs from sixty six bipolar patients who were diagnosed according to DSM-V diagnostic criteria at the Psychiatry Clinic of Dokuz Eylul University Medical Faculty, twenty seven healthy relatives and fifty six healthy volunteers.

Consequently this study demonstrated ten alterations GDNF genes 3 of them was new alterations. The SNP at the upstream of GDNF showed significantly difference between healthy

group and patient group. Interestingly this difference was only between male groups. In this study no SNP found at calcium binding sites of MICU1 gene.

Key words: Bipolar disorder, GDNF, MICU1, SNP

1-GİRİŞ VE AMAC

Bipolar Bozukluk (BB); ırktan, sosyoekonomik durumdan ve cinsiyetten bağımsız olarak tüm toplumlarda görülen, ciddi ve yaygın bir duygu durum bozukluğudur (Kupfer D, 2005; Craddock N ve ark., 2013). BB, manik, hipomanik ve depresyon gibi şiddetli duygu durum bozukluklarıyla karakterize, genellikle, psikoz, madde kullanımı, psikososyal uyumsuzluk ve intihar gibi kötü sonuçlara neden olan şiddetli bir psikiyatrik bozukluktur. Bipolar bozukluğunda manik ve depresyon evreleri belli bir düzen olmadan yinelenen epizotlarla gözükmetedir (Barnet J ve ark., 2009; Siegel G ve ark., 2006).

Bipolar bozukluğun sıklığı tüm alt gruplarını göz önüne aldığımızda %3-4 dür (Kupfer D, 2005). NIMH (*National Institute of Mental Health*)'nin verilerine göre 14- 18 yaşındaki gençlerin %1'i bipolar bozukluk taşımaktadır. Dünyada en çok maluliyete neden olan on hastalıktan biri olan BB, Dünya Sağlık Örgütü tarafından maluliyete neden olan altıncı hastalık olarak gösterilmiştir (Kupfer D, 2005), Hastalığın %20'si intiharla sonuçlanmaktadır. Ayrıca bedensel sorunlardan dolayı BB hastalarının ömrü %30 oranında kısalmaktadır (Fagiolini, 2009).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, genel tıbbi durumlardan bipolar bozukluğu olan bireylerin, BB taşımayan hastalara oranla daha çok etkilendiğini göstermiştir (Kupfer D, 2005). Sonuç olarak, bipolar bozukluk taşıyan bireylerdeki somatik sorunlar sıktır, az tanınır ve iyi tedavi edilmez. Hastalık, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmasına rağmen, maalesef şu ana kadar hastalığı tedavi edici bir ilaç yoktur ve elimizde olan tüm ilaçlar sadece hastalığın bazı belirtilerini geçirebilmekte ve bazı fonksiyonları düzeltebilmektedir (Alaerts M ve ark. 2009).

Hastalığın seyrinde özellikle başlangıçta intihar riski daha fazla olur. Bundan dolayı bipolar bozukluğu erken tanımak ve en iyi şekilde idare etmeyi öğrenmek intihardan kaynaklanan ölüm riskini azaltabilir. Bipolar hastalığın mortalite ve morbiditesini azaltmak için hem tanı hem de tedavi açısından, hastalığın etiyoloji ve patofizyolojisini anlamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, genetik mekanizmaların iyi anlaşılması, özellikle ilişkili genlerin saptanması, hastalığın erken belirlenmesi ve yeni tedavi yaklaşımları için önemlidir.

Ne yazık ki bipolar bozukluğun patofizyolojisi, çok kapsamlı araştırmalara rağmen, hala belirsizdir (Tadafumi ve ark., 2007). Aile, ikiz ve evlat edinme çalışmaları, genetik faktörlerin önemli role sahip olduğunu tespit etmiştir, ancak implike genler ya da genetik risk faktörleri

ortaya henüz çıkarılamamıştır (Kato T, 2007; Offord J, 2012). Bağlantı (*Linkage*) analizi, tüm genom asosiyasyon (*Genom Wide Association -GWA*) ve aday genom çalışmaları, bipolar bozukluğu gibi kompleks hastalıklarda implike olan genleri araştırmak için var olan moleküler genetik çalışma türleridir (Alaerts M ve ark., 2009; Offord J, 2012). Kromozomlarda aday bölge çalışmaları sonucunda hemen tüm kromozomlarda bağlantı saptanmıştır (Alerts M ve ark., 2009). Birçok farklı genin, her biri küçük etkiyle BB'nin etiyolojisini etkilediği düşünülmektedir (Offord J, 2012).

Bipolar bozukluğu olan hastalarda beyin görüntüleme araştırmaları hipokampus, prefrontal korteks ve amigdalanın hacminde değişiklik ve çoğu zaman azalma göstermektedir (Bremner ve ark., 2000; Caetano ve ark., 2006; Drevets ve ark., 1997; Sheline ve ark., 1999). Postmortem beyin çalışmaları, nöron/glia hücrelerinde atrofi ve beynin kortikal bölgesinde azalma gibi anatomik değişiklikler göstermiştir (Cotter ve ark., 2001; Ongur ve ark., 1998; Rajkowska ve ark., 1999). Bu çalışmalar duygu durum bozukluklarında nöronların yapı ve plastisitesinde anomalilerin olduğunu göz önüne sermiştir (Otsuki k ve ark., 2008).

Nörotrofik faktörlerin sinir sisteminde, nörogenezis, nöronal büyüme, diferansiyasyon ve plastisite gibi çoklu etkileri vardır (Otsuki k ve ark., 2008). Her gün gelişmekte olan kanıtlara göre, glia kökenli nörotropik faktör (Glial cell line-Derived Neurotrophic factor-GDNF) ve diğer nörotrofik faktörler duygu durum bozukluklarının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Nibuya ve ark., 1999; Smith ve ark., 1995). GDNF dopaminerjik nöronların dejenerasyonunu, *invitro* ve *invivo* ortamlarda önlemektedir (Yoong f ve ark., 2006). GDNF glial hücrelerinde salgılanan bir protein olup, embriyonik orta beyin ile, dopaminerjik spinal motor, kranial sensor, simpatik ve adrenerjik nöronların hayatta kalmasında, apoptozun önlenmesinde ve diferansiyasyonunda önemli rol almaktadır (Lee k ve ark., 2001). Nörodevelopmental hipoteze göre ve bipolar bozukluğun anatomik değişikliklerine bakıldığında göre GDNF geni bipolar bozukluğun genetik çalışması için iyi bir gendir. kromozom 5p12-p13.1 de yerleşmiş olan GDNF geni üç eksondan oluşmuştur (Shindelhaver ve ark.,1995). GDNF proteininin iki reseptörü belirlenmiştir; Nöronlarda yaygın olarak bulunan GFR α 1 reseptörü ve diğer hücrelerde daha yaygın olan RET protoonkogen ürünü (Souza RP ve ark.,2010 ;Wang HJ ve ark.,2008). RET homodimeri daha sonra bir sürü değişik hücre içi sinyal yollarını aktifleştirir. Sonuç nöron hücrelerinin hayatta kalması ve diferansiyasyonudur (Kodam, 2008).

Bu projede, sinir sisteminde nörogenezis, nöronal büyüme, diferansiyasyon, hayatta kalma, plastisite ve apoptozu önleme gibi çoklu etkileri olan glia kökenli nörotropik faktör (GDNF) geni araştırmanın bir konusudur. Bipolar bozukluğu olan hastalarda GDNF geninde ekspresyonu denetleyen bölgelerde önemli SNP'ler olabilir ve bu SNP'lerin hastalık ile ilişkisi bulunabilir.

Bu hipotezi sınamak amacı ile projemizde bipolar bozukluğu olan bireylerde GDNF geninin ifade 'sini değiştirebilme potansiyelinde olabilen SNP'ler incelenip ve hastalığın üzerinde etkisi araştırılmıştır. Bunun için GDNF'nin 3'UTR bölgesinde miRNA'ların potansiyel bağlanabileceği bölgeler ve genin birinci eksonun 5'yukarısı ve "TATAA" kutusunu barındıran ve transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgeler SNP yönünden taranmış ve saptanan SNP'lerin ilişkileri hastalık ile değerlendirilmiştir.

Hücre içi kalsiyum hücre için yaşamsaldır. Kalsiyum homestazında ki bozukluklar kalp yetmezliği, nöron dejenerasyonu ve diyabet gibi hastalıklara neden olmaktadır (Pan ve ark. 2011). Ayrıca beyin hücreleri ve glial hücreler ile yapılan çalışmalar mitokondri kalsiyum (Ca^{2+}) alımı ve bırakılmasının bu hücrelerin ölüm ve sağkalım, metabolizma ve aktivitesinde önemli rol aldığını göstermiştir (Simpson ve ark.1997). Beyin hücrelerinde mitokondri, Ca^{2+} tamponu olarak görev almaktadır ve hücreleri Ca^{2+} artış veya azalmasından dolayı meydana gelen hasarlardan koruduğu belirlenmiştir. Ca^{2+} etkili dinamiğini sağlamak için çeşitli Ca^{2+} taşıyıcı proteinleri hücrenin farklı bölgelerinde koordine bir şekilde çalışmaktalar. Genel bir fikir birliği olarak mitokondrinin iç zarında yerleşmiş olan MCU (*Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter*) mitokondride Ca^{2+} akını için en önemli sorumlu taşıyıcıdır. MCU'nun düzenlenmesinde MICU1'in görev aldığı bilinmektedir. MICU, MCU proteinine fiziksel olarak bağlıdır ve Ca^{2+} alımı için anahtar düzenleyici role sahiptir (Perocchi,2010; Baughman,2011). MICU geni10q22.1'de yerleşmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Metaanaliz sonuçlarında 10q11.21-22.1 bölgesinin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceğinin görülmesini (Segurado R ve ark., 2003) ve MICU1'in Ca^{2+} homestazındaki önemli rolünü göz önüne alarak bu çalışmanın ikinci hipotezini *MICU1*'in kalsiyum bağlama bölgelerine ait SNP'lerin bipolar hastalık ile ilişkisi var şeklinde tanımladık.

Bu hipotezi denemek amacı ile projemizde bipolar bozukluğu olan bireylerde *MICU1*'in kalsiyum bağlama bölgelerinde SNP taraması yapıldı ve hastalık ile ilişkisi değerlendirildi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Bipolar Bozukluğu (Manik ve Depresyon Hastalığı):

Depresyon ve manik kavramları tıbbın kendisi kadar eskidir. Eski günlerden günümüze bu durumu tanımlamak için büyük çabalar gösterilmiştir. ‘Manik’ Yunanca ’da öfke ve gazap ‘melankoli’ ise keder, uykusuzluk ve mutsuzluk demektir. M.S. birinci yüzyılda Soranus maniye melankoli ile nöbetleşe seyreden azalıp çoğalan bir hastalık olarak tanımlamıştır (Işık, 2003). Aretaeus (M.S. 150) maninin ana belirtilerini bugün bilindiği şekilde tanımladı. Manik ile melankolinin bağlantısı, Jean Pierre Falret ‘Folie Circulaire’ (döngüsel ruh hastalığı) ve Lules Baillarger’nin ‘Folie a la Double Forme’ (çifte biçimli ruh hastalığı) kavramı ile yeniden keşfedilmiştir (Burton N, 2012).

1930 yılında Bleuler, depresif ve manik sendromları ‘afektif bozukluk’ başlığı altına getirmiştir (Işık, 2003). 1959’da Leonard Kraepelin, manik depresif hastalığın tanısının iki alt gruba bölünmesini önerdi: manik ve depresif epizotlar ile giden durum ‘bipolar bozukluk’ ve sadece manik ya da sadece depresif epizotlar ile giden ‘unipolar bozukluk’ (Işık, 2003). 1970’li yıllarda bu durumların hepsi duygu durum bozukluğu olarak betimlenmiştir (Burton N, 2012).

Günümüzde bipolar bozukluk dönüşümlü, tekrarlanan manik ve hipomanik epizot daha sonra depresif epizot ile karakterize şiddetli bir psikiyatri bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Manik ve depresif epizotların arasında normal duygu durum yaşanabilir (Goodwin Fk,1991).

2.2. Bipolar Bozukluğun Tanı Kriterleri:

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından, 1992 yılında insan hastalıklarının tanı ve tedavisinin standardize edilmesi amacı ile ICD-9 (International Classification of Diseases) geliştirildi. ICD- 9’a göre bipolar bozukluk *mental* bozuklular başlığının ve psikoz alt başlığının altında kategorize edildi. 1999’da ICD-10 güncellenerek, bipolar bozukluğu ‘*Mood (Affective) disorder*’ başlığı altında topladı (<http://www.who.int/classifications/icd/en/>).

Yaygın olarak kullanılan diğer tanı kriteri, DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual Disorders-IV) Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) tarafından 1994 yılında geliştirildi ve 2000’de metin revizyonu ‘Text Revision’ (DSM-IV-TR) olarak güncellendi (American Psychiatric Association Proposed Revision, 2011).

2.2.1. DSM-IV-TR'de Manik Dönem Ölçütleri:

DSM-IV-TR'de Manik Dönem Ölçütleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır (APA, 2000; Simavi V, 2004; <http://www.psychiatry.org>):

A. En az bir hafta (hastaneye yatırılmayı gerektiriyorsa herhangi bir süre) süren, olağandışı ve sürekli kabarmış, taşkın ya da iritabil, aşırı bir duygu durumun olması.

B. Duygu durum bozukluğu sırasında, aşağıdaki belirtilerden en az üçünün belirgin olarak bulunması:

- 1) Benlik saygısında abartılı artma
- 2) Uyku gereksiniminde azalma (örneğin sadece üç saatlik bir uykudan sonra kendisini dinlenmiş hisseder)
- 3) Her zamankinden daha konuşkan olma ya da lafa tutma
- 4) Fikir uçuşmaları ya da düşüncelerin sanki yarışıyor gibi birbirlerinin peşi sıra gelmesi yaşantısı
- 5) dikkat dağınıklığı yani dikkat önemsiz ya da ilgisiz bir dış uyarana kolaylıkla çekilebilir
- 6) Amaca yönelik etkinlikte artma (toplumsal yönden, işte ya da okulda, cinsel açıdan)
- 7) Kötü sonuçlar doğurma olasılığı yüksek, zevk veren etkinliklere aşırı katılma ör. Elindeki bütün parayı alışverişe yatırma, düşüncesiz cinsel girişimlerde bulunma ya da aptalca iş yaptırımları yapma

C. Bu duygu durum bozukluğu mesleki işlevsellikte, olağan toplumsal etkinliklerde ya da başkalarıyla olan ilişkilerde belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da kendisine veya başkalarına zarar vermesini önlemek için hastaneye yatırılmayı gerektirecek

D. Bu belirtilerin bir madde kullanımına ör. Kötüye kullanılabilen bir ilaç, tedavi için kullanılan bir ilaç ya da diğer bir tedavi yöntemi ya da genel bir tıbbi durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı olmaması.

2.2.2. DSM-IV-TR'de Hipomanik Dönem Ölçütleri:

DSM-IV-TR'de Hipomanik Dönem Ölçütleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir (APA, 1994; Simavi V, 2004; <http://www.psychiatry.org>):

- A. Olağan, depresif olmayan duygu durumdan açıkça farklı, en az dört gün, gün boyu süren, sürekli, kabarmış, taşkın ya da iritabil ayrı bir duygu durum döneminin olması
- B. Manik epizottaki belirtileri görülür.
- C. Bu epizot sırasında, kişide belirtilerin olmadığı zamanlardakinden çok farklı olarak işlevsellikte belirgin bir değişiklik olur.
- D. Duygu durum bozukluğu ve işlevsellikteki belirgin bir değişiklik olur.
- E. Bu epizot, toplumsal ya da mesleki işlevsellikte belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da hastaneye yatırılmayı gerektirecek denli ağır değildir.
- F. Bu belirtiler bir maddenin (ör. Kötüye kullanılabilen bir ilaç, tedavi için kullanılan bir ilaç ya da diğer bir tedavi yöntemi) ya da genel bir tıbbi durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.

2.2.3. DSM-IV-TR'de Depresif Dönem Ölçütleri:

DSM-IV-TR'de Depresif Dönem Ölçütleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır (APA, 1994; <http://www.psychiatry.org>):

A. İki haftalık bir dönem sırasında, daha önceki işlevsellik düzeyinde bir değişiklik olması ile birlikte aşağıdaki belirtilerden beşinin (ya da daha fazlasının) bulunmuş olması; belirtilerden en az birinin ya depresif duygu durum ya da ilgi kaybı veya artık zevk alamama olması gerekir.

- 1- Hemen her gün, yaklaşık gün boyu süren depresif duygu durum
- 2- Hemen her gün, yaklaşık gün boyu süren, tüm etkinliklere karşı (ya da çoğuna) ilgide belirgin azalma veya artık bunlardan eskisi gibi zevk alamaması
- 3- Kilo alımı ya da kilo kaybı
- 4- Hemen her gün, uykusuzluk ya da aşırı uyku olması

- 5- Hemen her gün, psikomotor ajitasyon ya da retardasyonun olması
 - 6- Hemen her gün, yorgunluk-bitkinlik ya da enerji kaybının olması
 - 7- Hemen her gün, değersizlik, aşırı ya da normal dışı suçluluk duygularının olması
 - 8- Hemen her gün, düşünme ya da düşüncelerini belirli bir konu üzerinde yoğunlaştırma yetisinin azalması ya da karasızlık
 - 9- Yineleyen ölüm düşünceleri, yineleyen intihar etme düşünceleri ve intihar etmeye yönelik tasarılarının olması.
- B. Bu belirtiler, klinik açıdan belirgin bir sıkıntıya veya toplumsal-mesleki alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında bozulmaya neden olur.
- D. Madde kullanımı ve genel tıbbi durumun etkileri ekarte edilmiş olmalıdır,
- E. Yaş'a bağlı durum ekarte edilmelidir.

2.2.4. DSM-IV-TR'de Bipolar Bozukluk Çeşitleri:

- 1- Bipolar I bozukluğu
- 2- Bipolar II bozukluğu
- 3- Siklotimik bozukluk
- 4- Başka bir şekilde tanımlanmamış bipolar bozukluk (Philips ML ve Kupfer DJ, 2013).

Bipolar I bozukluğu en az bir manik epizodunun olduğu depresif dönem/dönemler ile karakterizedir. Bipolar II bozukluğunda hipomanik epizotların (en az dört gün süren) yanı sıra tekrarlayan majör depresyon atakları da görülmektedir. Siklotemik bozukluk olan kişilerde hafif düzeyde duygu durum oynamaları olur. Bu kişiler durgun oldukları zaman daha kendi içlerine kapanık, içe dönük, karamsar, ağlamaklı biri olurlar ve üretkenlikleri düşer. Coşkun oldukları zaman daha enerji dolu, daha fazla insan içine giren, daha övünge ve şakacı biri olurlar (Philips ML ve Kupfer DJ, 2013; <http://www.psychiatry.org>):

2.3. Bipolar Bozukluğun Epidemiyolojisi:

Her ne kadar epidemiyoloji çalışmaları bipolar I bozukluğunun sıklığını yetişkin gruplarda yaklaşık %1 civarında göstermişler ise de, daha yeni çalışmalar hastalığın alt gruplarının, öğrenenin bipolar II ve siklotimik bipoların sıklığını %4'den daha yüksek bir oranla göstermiştir (Judd ve Akiskal, 2003; Kupfer D, 2005). *NIMH'nin (National Institute of Mental Health)* verilerine göre 14-18 yaşındaki gençlerin %1'i bipolar bozukluk taşımaktadır. Bipolar I kadın ve erkeği eşit oranda etkiliyor görünmesine karşın bipolar II kadınlarda daha yaygındır (Goodwin Fk,1991). Bipolar bozuklu erkeklerde genelde manik evresi ile başlamasına rağmen kadınlarda depresyon epizodu ile başlama olasılığı daha fazladır. Erkeklerde daha çok manik epizotları ile seyir ederken kadınlarda daha çok depresyon epizodu şeklinde seyreder (Arnold L, 2003; Kennedy N, 2005; Diflorio A, 2010).

BB dünya da en çok maluliyete neden olan on hastalıktan biri olup (Kupfer D, 2005), Dünya Sağlık Örgütü tarafından 15 ve 44 yaş aralarında maluliyete neden olan altıncı hastalık olarak gösterilmiştir (Murray and Lopez, 1997; Daniel J, 2012). Amerika Birleşik Devletlerinde hastalığın yıllık maliyeti kırk beş milyar dolar kadar yüksek miktarlarda tahmin edilmiştir (Daniel J, 2012) Hastalığın %20'si intiharla sonuçlanmakla birlikte, tedavi edilmemiş bedensel sorunlardan dolayı da BB hastalarının ömrü %30 oranında kısalmaktadır (Fagiolini, 2009).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, bipolar bozukluğu olan bireylerin, bazı genel tıbbi durumlardan, BB taşımayan hastalara oranla daha çok etkilendiğini göstermiştir (Kupfer D, 2005). Örneğin bu hastalarda kalp damar rahatsızlıkları 1,5-2 kat daha fazla ve dört-yedi yıl daha erken yaşlarda görülmekte olup, kalp damar hastalığından kaynaklanan ölümler daha yüksek oranlarda olmaktadır. Uluslararası Hastalık Sınıflaması-*ICD (International Classification of Disease)*'ye göre bipolar bozukluk tanısı konmuş bireylerde hipertansiyon (%34,8), iskemik kalp hastalığı (%10,5) ve damar hastalıkları (%2,9) anlamlı olarak daha yüksek oranlarda bulunmaktadır (Fiedorowicz J ve ark., 2008). Benzer şekilde bipolar popülasyonunda saptanan tip 2 diyabetin sıklığı da normal popülasyona göre üç kat daha fazladır (McIntyre R ve ark., 2008; Kesebir R ve ark., 2010). Diyabetin manik depresif hastalarda daha sık görülmesinin, bipolar bozukluktan mı yoksa uygulanan tedaviden mi kaynaklandığı henüz tam olarak

aydınlatılmamasına rağmen, son yıllarda manik depresif olan bireylerde glikoz metabolizmasında da anomali olduğu saptanmıştır (Ruzickova M ve ark., 2003; Kesebir R ve ark., 2010).

Bipolar bozuklukta ilaç ve hastalıkla ilişkili hareketsizlik; kas-iskelet travmaları, hiperkoagülasyon, diyabet miletus, yasa dışı ilaç kullanımı, şişmanlık ve sigara içme gibi birkaç risk faktörü ortaya çıkardığından, bu popülasyonda solunum sistemi hastalıkları ek tanısı görülebileceği de öngörülebilir (Yang SY ve ark., 2013). Sonuç olarak, bipolar bozukluk taşıyan bireylerdeki somatik sorunlar sıktır, zor tanınır ve tedavisi zordur. Hastalık, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmasına rağmen, maalesef şu ana kadar hastalığı tedavi edici bir ilaç geliştirilememiştir ve elimizde olan tüm ilaçlar sadece hastalığın bazı belirtilerini geçirebilmekte ve bazı fonksiyonları düzeltebilmektedir (Alaerts M ve ark.,2009).

2.3.1. Genetik Epidemiyoloji:

Aile çalışmaları bipolar bozukluğun ailelerde biriktiğini göstermektedir. 1960'lı yıllardan beri yayınlanmış araştırmalar birinci derece akrabalarda bipolar bozukluğun tekrarlanma riskini yaklaşık %9 olarak belirtmektedir Tablo 1'de belirtildiği gibi bu oran genel toplumun yaklaşık on katıdır (Smoller CW ve Finn CT, 2003).

Tablo 1. Bipolar Bozukluğun Genetiği (Smoller CW ve Finn CT, 2003).

Genel toplum için risk	%1- %2
Birinci derece akraba için risk	%9
Tekrarlama risk oranı	%7-10
Tek yumurta ikizlerde konkordans	%40-%45
Kalıtım	%80-%85
Sitogenetik/CNV-bağımlı bölge	22q11
Başlıca bağlantılı bölgeler	BDNF, DAOA, DISC1, TPH2, SLC6A4
Tüm genom bağlantı analiz çalışmalarında belirlenen genler	DGKH, CACNA1C, ANK3

Bipolar bozukluğu olan hastaların ailelerinde majör depresif bozukluk üç kat daha fazla görülmektedir (Smoller CW ve Finn CT, 2003). Aile çalışmaları bipolar I ve bipolar II 'nin genetik açıdan kısmen farklı olduklarını göstermektedirler. Ailelerde bipolar II'nin tekrarlanma riski daha önce bipolar II hastası olan ailelerde, önceden bipolar I hastası olan ailelere göre daha fazladır (Gershon ES ve ark., 1982; Andreasen NC ve ark.,1987; Heun R ve Maier W, 1993).

Hastalığın diğer alt tipleri de aile yığılını gösterir. Örneğin erken başlangıçlı bipolar bozukluk geç başlangıç' a göre daha çok ailevi yığılını göstermektedir (Grigoriu-Serbanescu ve ark., 2001; Somanath ve ark., 2002). Kontrollü bir aile çalışmasında birinci derece akrabalarda bipolar I bozukluğun tekrarlama oranı erken başlangıçlı bozuklukta %46,5 'dir (Geller B ve ark., 2006).

Bipolar bozukluğun ailesel doğası genlerin tek başına katkısını belirleyemez, hem genler hem çevresel faktörler ailesel yığılını neden olabilir (Barnett ve ark., 2009). Araştırmacılar tarafından genetik etkileri çevresel faktörlerden ayırmak için iki yöntem kullanılmaktadır; ikiz ve evlat edinme çalışmaları. Bu tür çalışmalar bipolar bozukluğun konkordansının tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlere göre önemli derecede yüksek olduğunu kanıtlamaktadır. Bu konkordans tek yumurta ikizlerinde %38,5-%43 olmasına karşın çift yumurta ikizlerinde %4,5-%5,6'dır (Kendler KS ve ark., 1995; McGuffin P ve ark., 2003; Kieseppa T ve ark., 2004). Bu çalışmalar bipolar bozukluğun kalıtımını %79-%93 olarak göstermişler, bu yüzde genleri

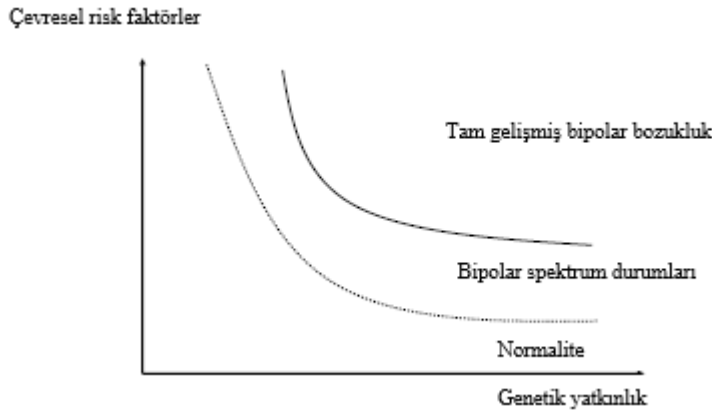
tanımlanmış olan meme kanseri gibi tıbbi hastalıkların kalıtımından oldukça yüksektir (Barnett ve ark., 2009).

2.4. Bipolar Bozukluğun Etiyolojisi:

Çoğu psikiyatrik bozuklukta olduğu gibi bipolar bozukluğun kesin etiyolojisi tanımlanmamıştır, ancak muhtemelen gelişim sırasında genetik yatkınlıklar ile çeşitli çevresel risk faktörleri arasında dinamik etkileşimleri içermesi olasıdır (Smith D ve ark., 2012) (Şekil 1).

2.4.1. Çevresel Faktörler:

Bipolar bozukluk ikiz kardeşe sahip olup hastalığı geliştirmeyen tek yumurta ikizlerine %40 oranında rastlanması gerçeği genetik dışında diğer faktörlerin de önemli olduğunu göstermektedir (Smith D ve ark., 2012). Bir takım çevresel faktörlerin bipolar bozukluğun gelişim riskini artırdığı tanımlanmıştır. Erken çevresel faktörler, örneğin fetal dönem veya doğumda olan komplikasyonlar, ebeveynlerden uzun dönem ayrılmak, ilgisizlik, fiziki ve cinsel kötü kullanım bipolar bozukluğun riskini artması ile ilişkilidir. Geç çevresel faktörler olarak, yasadışı ilaçların kullanımı (Amfetamin ve kokain gibi) ve fiziksel hastalıklar bipolar bozukluk ile bağdaşmaktadır (Smith D ve ark., 2012).



Şekil 1. Bipolar Bozukluğunda Gen- Çevre Etkileşimi (Smith D ve ark., 2012)

2.4.2. Genetik Etiyoloji:

Güncel bilim, genetiğin bipolar bozukluğun gelişiminde baş sorumlu olduğunu ve çok sayıda genin ayrı ayrı küçük etkisinin olabileceği şeklinde kabullenmiştir (Barnett J, 2009). Bu

nedenle ilişki çalışmaları, ilgili gen ve ya genleri bulma çalışmalarına odaklanmıştır. Bipolar bozukluğun patogenezinde biyolojik aday olarak, bağlantı ve sitogenetik çalışmalar sonucunda çok sayıda gen aday olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerin sonucunda özellikle bir kaç genin (BDNF, ANK3, CACNA1C) hastalıkla ilişkisi güçlü bulunmuşsa da hiç biri tam olarak kanıtlanmamıştır (Barnett J, 2009; Craddock N, 2013).

2.5. GDNF

2.5.1. GDNF Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı:

İnsan GDNF geni 5p13.2'de yerleşmiş olup (Şekil 2) (Schindelhauer D ve ark., 1995; <http://genome.ucsc.edu>) 5:37,812,778 - 37,839,781 genomik yerleşim göstermektedir (<http://omim.org>). GDNF sırasıyla 174, 177 ve 3459 bp uzunluğunda olan 3 eksondan oluşmaktadır (<http://www.ensembl.org>).



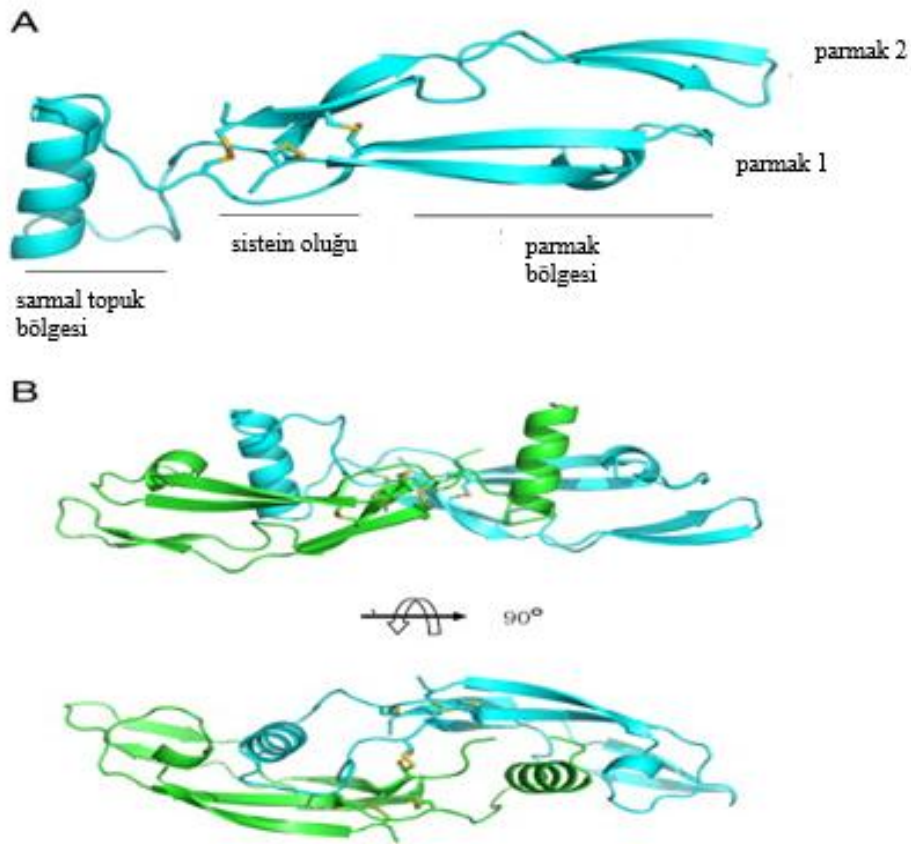
Şekil 2. GDNF'nin Kromozom Yerleşimi (<http://genome.ucsc.edu>).

2.5.2. GDNF Proteinin Yapısı ve İşlevi:

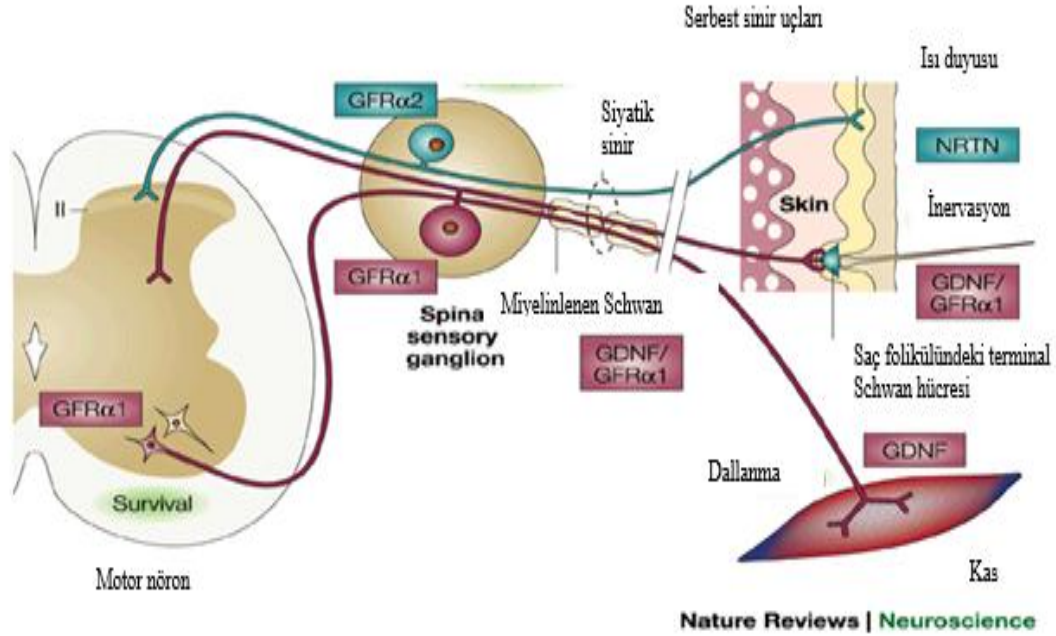
Glia hücrelerinden salgılanan GDNF, santral ve periferel nöronların yaşam, büyüme ve farklılaşmasını etkileyen nörotrofik faktör ailesindendir (Airaksinen M ve ark., 2002). Diğer nörotrofik faktörlere benzer şekilde, GDNF ilk önce 211 aminoasitlik ProGDNF denilen öncü şeklinde sentezlendikten sonra proteolize uğrayarak 134 aminoasitlik olgun GDNF oluşur (Lin ve ark., 1994). Şekil 3'de görüldüğü gibi GDNF molekülü bir sarmal topuk bölgesi, sistein-düğüm motifi ve parmak bölgesi olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Wang X, 2012). GDNF

molekölünün işlevsel bir ligand oluşturması için iki molekül arasında sistein bandı oluşturarak homodimer haline gelmesi gerekir (Wang X, 2012).

Sinaps yapılanması ve plastisitede önemli görevler alan GDNF (Ledda ve ark., 2007) korteks, hipokampus, serebellum, striatum, hipotalamus, orta beyin ve omuriliği kapsayan merkezi sinir sisteminde geniş ölçüde dağılmıştır (Kavamoto ve ark., 2000). Ayrıca *invivo* çalışmaları rekombinant GDNF'nin motor nöronları apoptozdan koruduğunu göstermiştir (Oppenheim R ve ark., 1995). Embriyonik ve postnatal gelişim sırasında yaşam ve büyük olasılıkla uç dallanması için motor nöronlar GDNF'ye gereksinim duyar (Şekil 4) (Airaksinen M ve ark., 2002).

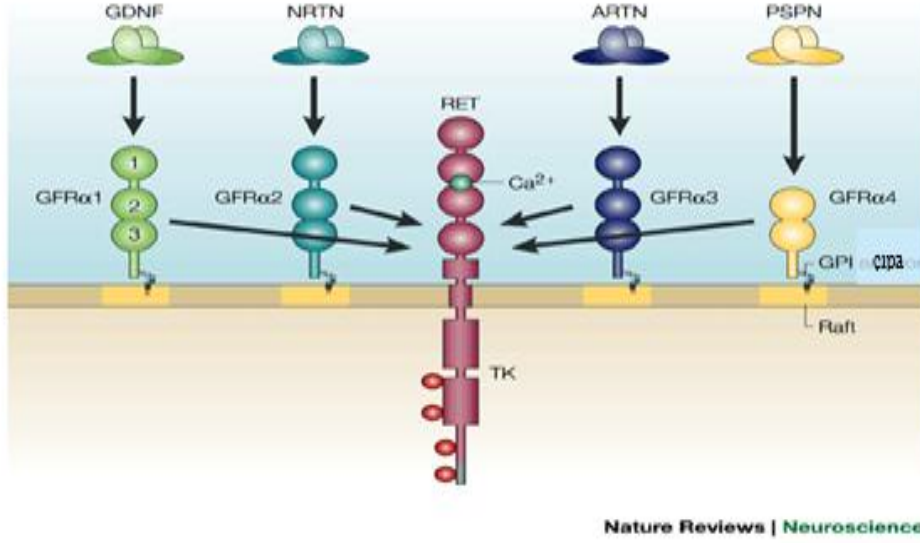


Şekil 3. GDNF Monomer (A) ve Homodimerinin (B)Yapısı (Wang X, 2012).

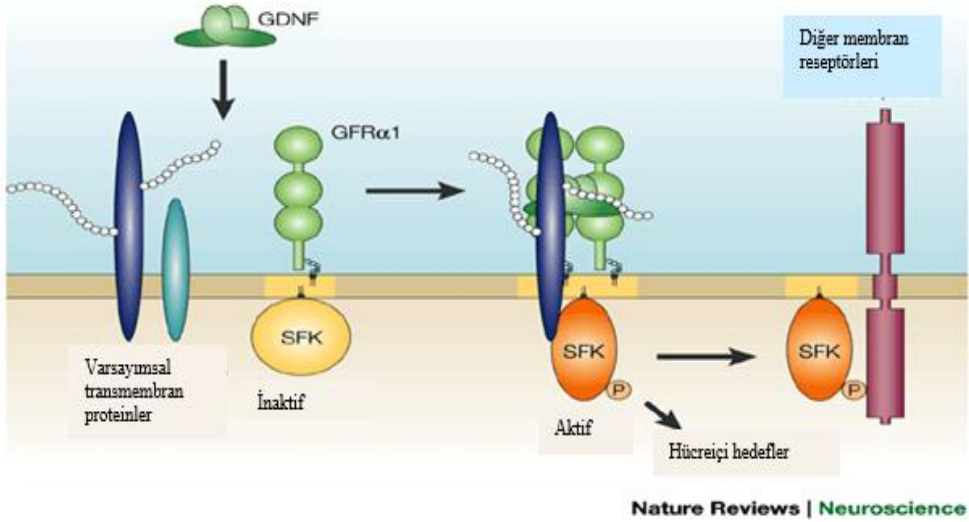


Şekil 4. Gelişim Sırasında GDNF Ligand Ailesinin *In vivo* Somatik Algı ve Motor Nöronlardaki Etkisi (Airaksinen M ve ark., 2002).

GDNF ailesi ligandları (GFLs) ilk önce GDNF- ailesi reseptör- α ($GFR\alpha$) reseptörlerine bağlandıktan sonra RET tirozin kinazı aktive eder. $GFR\alpha$ proteinleri hücre zarına glikozil fosfatidil inositol (GPI) çıpası ile bağlıdır ve $GFR\alpha 4$ hariç diğerlerinin üçer adet globuler ve sisteinden zengin bölgesi bulunur. GFL'ler, $GFR\alpha$ reseptörlerinin ikinci bölgesine bağlanır. RET molekülünün hücre dışı bölgesi GFL- $GFR\alpha$ kompleksi ile etkileşime girer. Ca^{2+} iyonlarının RET'in dört kadherin benzeri bölgesinden birine bağlanması GFL- $GFR\alpha$ kompleksi ile aktifleşmesi için gereklidir (Şekil 5) (Airaksinen M ve ark., 2002). GFL- $GFR\alpha$ - RET birleşimi hücre zarındaki lipid sallara bağlı olan SRC-ailesi kinazı (SFK) fosforilleyerek aktive eder. Daha sonra SFK hücre içindeki substratları ve diğer zar reseptörlerini aktive eder (Şekil 5) (Airaksinen M ve ark., 2002).



Şekil 5. GDNF –Ligand Ailesi ve Reseptör Etkileşimi (Airaksinen M ve ark., 2002).

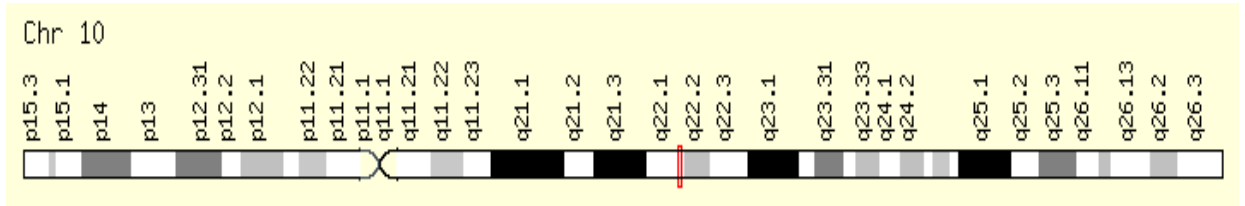


Şekil 6. RET’den Bağımsız GDNF-GFR1 Sinyal İletimi (Airaksinen M ve ark., 2002).

2.6. MICU1

2.6.1. MICU1, Kromozom Yerleşimi ve Gen Yapısı:

İnsan MICU1 geni 10q22.1’de yerleşmiş olup (Şekil 7) (<http://genome.ucsc.edu>) 10:74,127,098-74,385,899 genomik yerleşim göstermektedir (<http://omim.org>). MICU1 sırasıyla 96, 162, 169, 163, 44, 115, 83, 198, 138, 109, 90 ve 1,016 bp uzunluğunda olan 12 eksondan oluşmaktadır (<http://www.ensembl.org>).



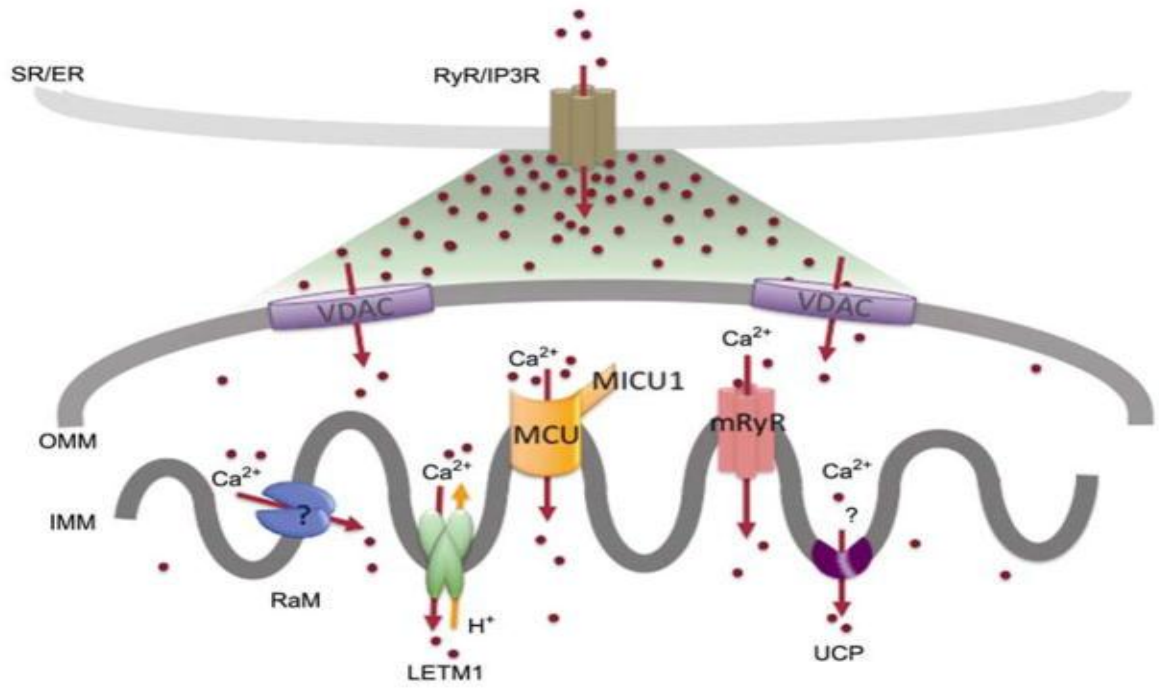
Şekil 7. MICU1’in Kromozom Yerleşimi (<http://genome.ucsc.edu>)

2.6.2. MICU1 Protein Yapısı ve İşlevi:

Dört yüz yetmiş altı aminoasitten oluşan MICU1 mitokondrinin iç zarında yerleşmiş olup bir transmembran ve iki kalsiyum bağlama bölgesine sahiptir. MICU1, MCU proteinine fiziksel olarak bağlıdır ve halen tam bilinmeyen bir mekanizma ile Ca^{2+} alımı için anahtar düzenleyici role sahiptir (Perocchi F, 2010; Baughman JM, 2011).

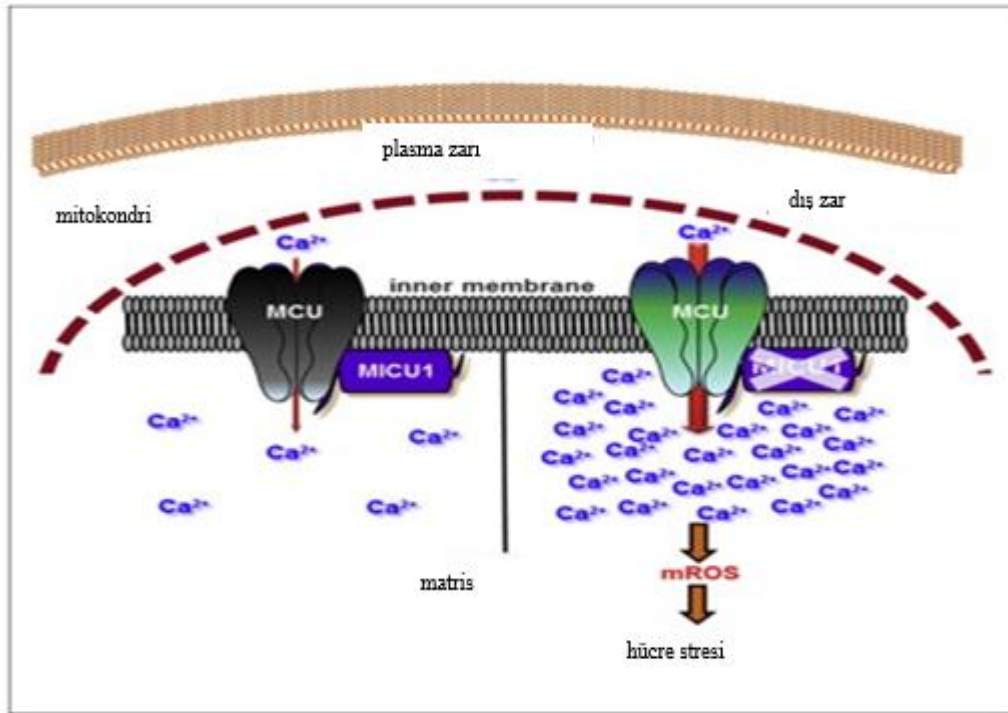
Hücre içi kalsiyum homeostazı hücre fizyolojisi için yaşamsaldır. Kalsiyum homeostazında olan bozukluklar kalp yetmezliği, nöron dejenerasyonu ve diyabet gibi hastalıklara neden olmaktadır (Pan ve ark., 2011). Ayrıca, beyin hücreleri ve glial hücreleri ile yapılan çalışmalar

mitokondri kalsiyum (Ca^{2+}) alımı ve bırakılmasının bu hücrelerin ölümü ve sağ kalımı ile, metabolizma ve aktivitesinde önemli rol aldığını göstermiştir (Simpson ve ark., 1997). Beyin hücrelerinde mitokondri Ca^{2+} tamponu olarak görev almaktadır ve hücreleri Ca^{2+} artış veya azalmasından dolayı meydana gelen hasarlardan koruduğu belirlenmiştir. Ca^{2+} etkili dinamiğini sağlamak için çeşitli Ca^{2+} taşıyıcı proteinler hücrenin farklı bölgelerinde koordine bir şekilde çalışmaktadır. Genel bir fikir birliği olarak MCU mitokondride Ca^{2+} akını için en önemli sorumlu taşıyıcıdır. MCU mitokondrinin iç zarında yerleşik olup (Şekil 8), elektrokimyasal gradient mekanizması ile Ca^{2+} 'u mitokondri içerisine almaktadır. MCU'nun düzenlenmesinde MICU1'in görev aldığı düşünülmektedir (Perocchi F, 2010; Baughman JM, 2011; Pan S ve ark., 2011).



Şekil 8. Mitokondri iç Zarında Yerleşik Olan Ca^{2+} Akış Mekanizmaları (Pan S ve ark., 2011).

MICU1 mitokondriyal Ca^{2+} için konsantrasyon eşiği belirleyerek mitokondriyal Ca^{2+} miktarını düzenler. Şekil 9’da gösterildiği gibi MICU1 dinlenme koşullarında Ca^{2+} kanalı olan MCU’yu inhibe eder. MICU1 azaldığı taktirde mitokondriyal Ca^{2+} konsantrasyonunda artış gözlenir ve bu da reaktif oksijen üretiminin artışına ve hücre hasarına neden olur (Mallilankaraman K ve ark., 2012).



Şekil 9. MICU1 Proteinin Hücre Stresi ve reaktif oksijen Yapımı Üzerindeki Etkisi (Mallilankaraman K,2012) .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Bu araştırma gözlemsel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma grupları

Çalışmada 2011-2013 yıllarında işbirliği içinde bulunduğumuz, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalında, DSM-IV bipolar bozukluk tanı kriterlerine uygun olarak tanı konan altmışaltı hastadan, elli altı gönüllü kontrol bireyden ve yirmi yedi hasta yakınından amacını ve içeriğini açık bir dille anlatan gönüllü onam formu ile alınmış kanlar kullanmıştır.

3.3. Çalışma Materyali

EDTA'lı (Etilendiamintetraasetik asit) tüplere alınmış olan bir mililitre insan dolaşım kanı çalışmanın materyali olarak kullanılmıştır.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri:

Araştırmanın bağımsız değişkenleri GDNF ve MICU1 genlerindeki SNP'ler, bağımlı değişken ise bipolar bozukluğun gelişimidir.

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Bilgi Toplama:

Deneklerin bilgileri Dokuz Eylül Hastanesi Psikiyatri Bölümünde işbirliğinde olduğumuz psikiyatrist öğretim üyelerinden elde edildi.

3.5.2. Kullanılan Aletler

Araştırmada kullanılan aletler ve markaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Aletler

Alet	Marka
Pikodrop	Picodrop
Santrifüj	Thermo scientific
Yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı	Thermo scientific
Termal cycler	Thechne
Pipet seti	Eppendorf
Vorteks	Biocote
-80 dondurucu	Hettich
-20 dondurucu	Beko
+4 buzdolabı	Beko

3.5.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Araştırmada kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Kimyasal Madde veya Sarf Melzeme	Marka	Lot Numara
DNA izolasyon kiti	RTA kit	AK2030111- SA2100110
Primer çiftleri	Alpha DNA	467300- 467301-467298- 468533- 468531-468530- 468534-467299- 468535- 468532
dNTP Mix 10 mM	Fermentas	00075005
Taq polimeraz rekombinant	Fermentas	00080566
10 X Taq polimeraz tamponu KCl	Fermentas	00073162
25 mM MgCl ₂	Fermentas	00080465
Yükleme boyası	Fermentas	00076700
Syber green	İnvitrogen	766065
Agaroz	Sigma-Aldrich	120M0464V
TBE (Tris/Borate/EDTA) Elektroforez tamponu	Thermo scientific	02241

3.5.4. Araştırmanın Yöntemi:

3.5.4.1. Denek Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı:

Bu çalışmanın denekleri İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dâhili Tıp Bilimleri Bölümü, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına gelen bireyler arasından seçildi. Hasta grubuna DSM-IV tanı kriterlerince bipolar bozukluğa uygun olan, başka herhangi bir sistemik, patolojik ve ruhsal bozukluğu saptanmayan 66 kişi alındı. Hastaların sağlıklı yakınlarından gönüllü olarak toplam 27 kişi çalışmaya katıldı. Kontrol grubuna herhangi bir belirgin hastalığı olmayan ve DSM-IV tanı kriterlerince bipolar bozukluk saptanmayan 56 gönüllü alındı. Çalışmaya katılan her 3 gruptaki kişilere çalışmanın amacı açık bir dille anlatıldı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi yerel etik

komitesinin 25.02.2011 tarihinde onay verdiği bilgilendirilmiş onam formu (Ek-1) ile izinler alındı. Tüm bireylerden DNA eldesinde kullanılmak üzere 1ml dolaşım kanı alındı ve deneysel çalışma yapılana kadar -20 C’de saklandı.

3.5.4.2. Kan rneklerinden DNA Eldesi:

DNA izolasyonları RTA (*Rta Laboratories Ltd. Sti.*) DNA izolasyon kiti ile firmanın tavsiye ettiği protokol kullanılarak yapıldı.

Protokol:

- Ependorf marka mikrosentrifj tüpüne 100 µl kan konuldu.
- Tüpün zerine 95 µl sindirim tamponu ve beş µl proteinaz K eklendi.
- Tp kısa vorteks yapıldıktan sonra 20 dakika 55C’da inkübe edildi.
- Karışım zerine 700 µl genomik liziz tamponu eklenip iki dakika vortekslendikten sonra toplama tüpüne aktarılıp 10,000g’de iki dakika santirfjlendi, çökelti atıldı.
- Toplama tüpüne 200 µl DNA n-yıkama tamponu konuldu 10,000g’de iki dakika santirfjlendi.
- 400 µl g-DNA yıkama tamponu eklendi 10,000g’de iki dakika santrifüjlendi.
- Karışım yeni mikrosantirfj tüpüne aktarıldı ve üzerine 100 µl DNA yıkama tamponu eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler 14,000 g’de iki dakika santrifüjlendi, kolonlar tüpün üzerinden ayrıldı.

Mikrosantrifüj içerisindeki DNA -20C’da saklandı.

3.5.4.3. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması:

DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı 2,5 µl DNA kullanılarak Pikodrop cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerler ile belirlendi. Pikodrop cihazında OD (Optik Dansite) 260/280 değerleri 1,8-2,0 arasında olan DNA'lar çalışmaya uygun görüldü.

3.5.4.4. PCR Primerlerinin Tasarımı:

GDNF geni 3'UTR bölgesi için, ilk önce internet üzerinden Dianalab (Maragkakis; 2009) ve miRBase (Griffiths S, 2004; 2006; 2008;2011) programları yardımı ile GDNF'nin (mRNA) 3'UTR bölgesine bağlanabilen miRNA'lar ve DNA üzerindeki komplementer dizileri tespit edildi. Toplam olarak 15 miRNA'nın GDNF 3'UTR bölgesi ile komplementer dizi barındırdığı tesbit edildi. hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-4524b-3p, hsa-miR-665, hsa-miR-4493, hsa-miR-520b, hsa-miR-4674, hsa-miR-637, hsa-miR-548av-5p, hsa-miR-4740-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-3690, hsa-miR-3975, hsa-miR-3927, hsa-miR-4709-3p. (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/?sec=software>). GDNF geninin 5'yukarısındaki "TATA" kutusu ve transkripsiyon faktörleri bağlanma yerlerini tanımlayabilmek için PROMO 8.3 programı kullanıldı (Messeguer X, 2002; Farre D, 2003).

Tablo 4. *GDNF* Geni için Tasarlanan Primer Çiftleri.

İleri Primerler	Geri Primerler
5'TGGAGCCTAGGACTGAGGAG3'	5'AAGGGGCAATCCGAACCTT
5'CCGCTAAAAGGTGTGGATGT3'	5'CACACACCGTGATGGAAATC3'
5'CAACCAAAAAGGCTGTGCTC3'	5'CAGCATTAAATCCAGGACTACC3'
5'ACCCAAACACCTGACAGCTC3'	5'TGATGGAGGCCAGTATTTC
5'AAGGCCTTCCCTCTCACACT3'	5'GTGATTGGTTGCTGGGAGTT

MICU1 kalsiyum bağlanma bölgelerinin amplifikasyon amacı ile ilk önce “<http://www.uniprot.org/blast>” sitesinden protein dizisi ve kalsiyum bağlanma bölgeleri saptandı. Daha sonra “<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>” sitesindeki primer üç program yardımı ile ilgili bölgeler için primerler tasarlandı. Primerlerin DNA dizisi üzerindeki yerleşkesi ek-2’de gösterilmiştir.

10	20	30	40	50	60
MFRLNSLSAL	AELAVGSRWY	HGGSQPIQIR	RRLMMVAFLG	ASAVTASTGL	LWKRAHAESP
70	80	90	100	110	120
PCVDNLKSDI	GDKGKNKDEG	DVCNHEKKT	DLAPHPEEK	KKRSGFRDRK	VMEYENRIRA
130	140	150	160	170	180
YSTPDKIFRY	FATLKVISEP	GEAEVFMTPE	DFVRSITPNE	KQPEHLGLDQ	YIIKRFDGKK
190	200	210	220	230	240
ISQEREKFAD	EGSIFYTLGE	CGLISFSDYI	FLTTVLSTPQ	RNFEIAFKMF	DLNGDGEVDM
250	260	270	280	290	300
EEFEQVQSII	RSQTSMGMRH	RDRPTTGNTL	KSGLCALTT	YFFGADLKGK	LTIKNFLEFQ
310	320	330	340	350	360
RKLQHDVLKL	EFERHDPVDG	RITERQFGGM	LLAYSGVQSK	KLTAMQRQLK	KHFKEGKGLT
370	380	390	400	410	420
FQEVNFFTF	LKNINDVDTA	LSFYHMAGAS	LDKVTMQQVA	RTVAKVELSD	HVCDVVFALF
430	440	450	460	470	
DCDGNGELSN	KEFVSIMKQR	LMRGLEKPKD	MGFTRLMQAM	WKCAQETAWD	FALPKQ

Şekil 10. MICU1 Proteini 1. Kalsiyum Bağlanma Bölgesi. (<http://www.uniprot.org/blast>)

10	20	30	40	50	60
MFRLNSLSAL	AELAVGSRWY	HGGSQPIQIR	RRLMMVAFLG	ASAVTASTGL	LWKRAHAESP
70	80	90	100	110	120
PCVDNLKSDI	GDKGKNKDEG	DVCNHEKHTA	DLAPHPEEKK	KKRSGFRDRK	VMEYENRIRA
130	140	150	160	170	180
YSTPDKIFRY	FATLKVISEP	GEAEVFMTPE	DFVRSITPNE	KQPEHLGLDQ	YIIKRFDGKK
190	200	210	220	230	240
ISQEREKFAD	EGSIFYTLGE	CGLISFSDYI	FLTTVLSTPQ	RNFEIAFKMF	DLNGDGEVDM
250	260	270	280	290	300
EEFEQVQSII	RSQTSMGMRH	RDRPTTGNTL	KSGLCALTT	YFFGADLK GK	LTIKNFLEFQ
310	320	330	340	350	360
RKLQHDVLKL	EFERHDPVDG	RITERQFGGM	LLAYSGVQSK	KLTAMQRQLK	KHFKEGKGLT
370	380	390	400	410	420
FQEVENFFTF	LKNINDVDTA	LSFYHMAGAS	LDKVTMQQVA	RTVAKVELSD	HVCDVVFALF
430	440	450	460	470	
DCDGNELSN	KEFVSIMKQR	LMRGLEKPKD	MGFTRLMQAM	WKCAQETAWD	FALPKQ

Şekil 11. MICU1 Proteini 2. Kalsiyum Bağlanma Bölgesi. (<http://www.uniprot.org/blast>)

Tablo 5. MICU1 İçin Tasarlanan Primer Çiftleri.

İleri Primerler	Geri Primerler
5'GCTGTCTTTACTGGCCGTAGT3'	5'GGTAACTCCAAGGCACATGA3'
5'GCTGGAATTACAGGCATGAG3'	5'AGGTGGGTAGCTTGAAGAGG3'
5'GCAGTTGGAATATCGAGGAAG3'	5'CAGTGTGGGGTTACTGTTTGG3'

3.5.4.5. PCR Standardizasyonu:

İstenilen bölgeleri çoğaltacak olan çift primerler 10 pikomol olacak şekilde firmanın önerdiği miktarda sulandırıldı ve alıktalar hazırlanıp -20'a kaldırıldı. Çift primerlerin standardizasyonu için Tablo 6'da gösterildiği gibi gradiyent PCR cihazı kullanılarak bağlanma sıcaklığı için gradiyent ayarlandı. MgCl₂ konsantrasyonu 1 mM, 2 mM v 3 mM şeklinde denendi ve PCR çalışmaları için en uygun koşul seçildi. Tablo 7'de primer çiftlerinin PCR profilleri gösterilmiştir.

Tablo 6. Bağlanma Sıcaklığı İçin Kullanılan Gradiyent.

Bağlanma Sıcaklığı °C	47.9	48.7	50.1	51.8	52.9	54.3	55.4	57.7	58.7	60.6	62.1
-----------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Tablo 7. Primer Çiftlerin PCR Profilleri.

Basamaklar	GDNF 5'yukarı Bölgesi	GDNF 3'UTR 1.Çift	GDNF 3'UTR 2.Çift	GDNF 3'UTR 3.Çift	GDNF 3'UTR 4.Çift	MICU1 1.Çift	MICU1 2.Çift	MICU1 3.Çift
Başlangıç Denatürasyonu	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk	95°C /5dk
Denatürasyon	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s	95°C /30s
Bağlanma	58.1°C/45s	58.5°C /45s	58.5°C /45s	55.8°C /45s	62°C /45s	58.2°C /45s	57.5°C /45s	57.5°C /45s
Uzama	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s	72°C /30s
Sonlanlama Uzaması	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk	72°C /5dk
Devir	35	35	35	35	35	35	35	35

3.5.4.6. PCR'in Hazırlanışı:

Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde PCR bileşenleri sıra ile 0,2 µl steril ve enzimlerden arınmış tüplere kondu. PCR reaksiyonu buz üzerinde kuruldu. 0,2 µl PCR tüplerinin üzerine denek numarası, çalışılan genin ismi ve bölgesi yazıldı ve içlerine gerektiği kadar DNA kondu (Tablo 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Denek çalışmaları her seferinde on denek şeklinde çalışıldığı için ilk önce 2,5 µl lik tüp içerisine tüm bileşenlerin DNA hariç on katı konularak karışım hazırlandı. Karışım hazırlanırken ilk önce su en sonda Taq polimeraz eklendi. Hazırlanan karışım pipet ile köpürtmeden iyice homojenize edildikten sonra PCR tüplerine dağıtıldı. Her bir tüpte pipetaj yapıldı ve hızla PCR cihazına yerleştirildi. Her bir PCR reaksiyon çalışmasında iç

kontrol olarak su ile deney kontrol edildi. GDNF'nin 5'yukarı bölgesinin primerine ait PCR bileşenleri ve miktarları Tablo 8'de, GDNF 3'UTR bölgesinin 1. 2. 3.ve 4.Çift Primerleri PCR reaksiyon bileşenleri sırasıyla Tablo 9, 10, 11 ve 12'de MICU1 1. 2.ve 3.Çift Primerleri PCR reaksiyon bileşenleri sırasıyla Tablo 13, 14 ve 15'de gösterilmiştir. PCR işlemi otomatik sıcaklık döngüsü sağlayan 'thermal cycler' ile yapıldı.

Tablo 8. GDNF Geninin 5'Yukarı Bölgesine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			40.0	400.0
10 X taq tamponu	10 X	0.8 X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10 mM	0.028 mM	0.14	1.4
İleri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5 U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	0.33 mM	0.66	6.6
DNA Kalıbı	20 ng/ µl	1.6 ng/ µl	4	4 X10

Tablo 9. GDNF 3'UTR 1. Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			33.8	338.0
10 X taq tamponu	10 X	0.8X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10 mM	0.04mM	0.2	2.0
İleri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	0.4mM	0.8	8.0
DNA Kalıbı	20 ng/ µl	4 ng/ µl	10.0	10.0 X10

Tablo 10. GDNF 3'UTR 2. Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			26.4	264.0
10 X taq tamponu	10X	0.8X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10 mM	0.04 mM	0.2	1.4
İleri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5 U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	1.6 mM	3.2	32.0
DNA Kalıbı	20 ng/ µl	6 ng/ µl	15.0	15.0 X10

Tablo 11. GDNF 3'UTR 3. Çift Primere Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			32.7	327.0
10 X taq tamponu	10 X	0.8 X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10 mM	0.02 mM	0.1	1.0
İleri primer	10 pmol/ µl	0.06 pmol/ µl	0.3	5.0
Geri primer	10 pmol/ µl	0.06 pmol/ µl	0.3	5.0
Taq polimeraz enzimi	5U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	1.2 mM	2.4	24.0
DNA Kalıbı	20 ng/ µl	4 ng/ µl	10.0	10.0 X10

Tablo 12. GDNF 3'UTR 4. Çift Primere PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			36.4	364.0
10 X taq tamponu	10X	0.8X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10mM	0.04 mM	0.2	2.0
İleri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5 U/ µl	1 U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	1.6 mM	3.2	320.0
DNA Kalıbı	20ng/ µl	2 ng/ µl	5.0	5.0 X10

Tablo 13. MICU1 1. Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			36.4	364.0
10 X taq tamponu	10X	0.8X	4.0	40.0
10mM dNTP karışımı	10 mM	0.04 mM	0.2	2.0
İleri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	1.6 mM	3.2	32.0
DNA Kalıbı	2 ng/ µl	1.4 ng/ µl	5.0	5.0 X10

Tablo 14. MICU1 2. Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			34.8	348.0
10 X taq tamponu	10 X	0.8 X	4.0	40.0
10 mM dNTP karışımı	10 mM	0.04 mM	0.2	2.0
İleri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	2.4 mM	4.8	48.0
DNA Kalıbı	2 ng/ µl	1.4 ng/ µl	5.0	5.0 X10

Tablo 15. MICU1 3. Çift Primerine Ait PCR Reaksiyonunun Bileşenleri ve Miktarları.

Bileşenler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyon	10X reaksiyon
H ₂ O (Nükleaz içermeyen, steril)			34.8	348.0
10 X taq tamponu	10 X	0.8 X	4.0	40.0
10 mM dNTP karışımı	10 mM	0.04 mM	0.2	2.0
İleri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Geri primer	10 pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0.5	5.0
Taq polimeraz enzimi	5U/ µl	1U/50 µl	0.2	2.0
25 mM MgCl ₂	25 mM	2.4 mM	4.8	48.0
DNA Kalıbı	2 ng/ µl	1.4 ng/ µl	5.0	5.0 X10

3.5.4.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi.

3.5.4.7.1. Agaroz Jelin Hazırlanması:

PCR ürünlerinin boyutları 500-800 bp olduğu için %1,5 jel hazırlandı. 1,5 gr agaroz tartıldı 100 ml’lik erlen içerisine aktarıldı. Üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde 0,5 X TBE tamponu ilave edilip mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Çeşme suyunun altında el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutulan jel içerisine dört µl Syber Green ilave edilerek karıştırıldı. Hazırlanan jel, yatay jel yatağına döküldü ve içine yükleme kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında sertleşmeye bırakıldı. Jel sertleştikten sonra taraklar dikkatle çıkarıldı ve örnek yüklemek üzere elektroforez tankına yerleştirildi.

3.5.4.7.2. PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi:

Elektroforez tankına yerleştirilmiş jelin üzerine 2-3 mm aşacak şekilde 0.5X TBE tamponunu eklendi. Pipetlenerek homojenize edilen her PCR ürününden 5 µl, yükleme tamponundan bir µl alınıp iyice karıştırıldı ve jel üzerinde oluşturulan kuyucuklara sırayla yüklendi. PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte bant oluşturduğunu saptamak üzere ilk kuyucuğa

100 bp lik DNA marker ya da uzunluğu bilinen bir PCR ürünü yüklendi. Yükleme işleminden sonra tankın kapağı kapatılıp güç kaynağı 80 Volt 25 mili ampere ayarlanıp elektroforez sistemi başlatılarak fragmanın bir saat yürümesi sağlandı.

3.5.4.7.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü ve Görüntülenmesi:

Jel ultra viyole (UV) altında translüminatörle incelenip, bantlar görüntüldü. PCR ürünlerinin uzunlukları ve koyulukları ilk kuyucuğa eklenen marker veya uzunluğu bilinen PCR ürünleri ile kıyaslandı. Nonspesifik bant varlığı incelendi.

3.5.4.8. DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları:

Tüm PCR ürünlerinden 5µl alıp yukarıda anlatıldığı gibi jelde yürütölüp ve UV altında görüntü alındı. Keskin ve temiz bant paterni gözlemlendi. PCR örnekleri dizi analizi MacroGen (www.macrogen.com) firmasından hizmet alımı olarak sağlandı. Her örnek için ilk önce ileri primerle dizi analizi yapıldı mutasyon/SNP bulunduğu takdirde ters primerle de mutasyon/SNP'ler doğrulandı. Bu işlem için; örnek başına, iki µl primer (10pmol/ml) PCR örnekleriyle beraber gönderildi ve sonuçlar elektronik iletişim yolu ile alındı.

3.6. Araştırmanın Planı ve Takvimi:

Araştırmanın plan ve takvimi Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Araştırmanın Planı ve Takvimi

İş Paketi Tanımı	Aylar																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Hasta, Hasta Yakını ve Kontrol Kanların Toplanması																								
DNA izolasyonları, Kalite ve Miktar Tayini																								
PCR Primerlerinin Tasarımı, Temini ve PCR süreci																								
PCR Ürünlerinin Yürütülmesi, Görüntülenmesi, Sekans Hazırlığı																								
Sekanslama ve Yorumlama																								
Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yayına Hazırlık																								

3. 7. Verilerin Değerlendirmesi:

3.7.1. DNA Dizi Analizlerinin Değerlendirilmesi ve Kullanılan Yöntemler:

DNA dizi analizi sonuçları, GDNF ve MICU1'in NCBI'da tanımlanan dizileri referans alınarak değerlendirildi. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>). Sekans sonuçlarının değerlendirilmesinde blast analizi, dizi analiz programları ve standart analiz kullanıldı. Tüm yöntemlerin sonuçları birbiri ile karşılaştırıldı. Değerlendirmeler denek grubunu bilmeden kör analizle gerçekleştirildi.

3.7.1.1. Blast Analizi:

Metin formattaki veriler kullanılarak <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> PROGRAM adresinde her denek için ayrı ayrı karşılaştırılma yapıldı.

3.7.1.2. Dizi Analiz Programları:

İki DNA analiz programı kullanıldı; Chromas 2.31 ve DNA Dynamo. Abi1 formatında olan veriler değerlendirildi. Bu programlar kullanılarak veriler homozigot ve heterozigot baz mutasyon/SNP'leri yönünden incelendi.

3.7.1.3. Standart Analiz:

Pdf formatında olan veriler bilgisayar ortamında gözle tarandı ve özellikle heterozigot baz mutasyon/SNP'leri belirlendi.

3.7.2. Verilerin İstatistiği:

Saptanan tüm SNP'ler için SHESİS programı kullanılarak Hardy-Weinberg dağılımı, olasılık oranı ve güven aralığı hesaplandı (Shi Y ve He L, 2005). Anlamlı fark 0.05'den az olarak değerlendirildi. Hasta grubu ve gönüllü sağlıklı grubun arasında SNP'lerin ilişkisi χ^2 ile hesaplandı. Gruplar arası SNP'lerin başlangıç yaştan üzerindeki etkisi t-testi ile değerlendirildi. Gruplar arası demografik özelliklerin farkı ANOVA testi ile değerlendirildi. Tüm istatistik testler EXCEL 2010 programı ile yapıldı.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları:

GDNF proteinin ve mRNA ekspresyon düzeylerinin beyin dokusunda bakılması GDNF ekspresyon değişiklikleri için iyi çalışma olabilirdi. Ancak beyin dokusunun elde etmenin zorluğu ve daha önce ön çalışmaların yapılmasının gerekmesi nedeni ile çalışılamadı.

3.9. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmış no:2012/05-11 tarih: 25.02.2011 etik kurul onayı ile çalışma başlatılmıştır (Ek-3).

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması:

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına gelen bipolar bozukluk dışında herhangi bir hastalığı olmayan olgular ve yakınları hasta grubunu ve hasta yakını grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubu ise bipolar bozukluğu ve başka herhangi bir belirgin hastalığı olmayan bireylerden oluşmaktadır.

Tablo 17. Çalışmanın Hasta Grubuna Ait Kod, Cinsiyet ve Hastalığın Başlangıç Yaşı Kod

Kod	Kadın/ Erkek	Başlangıç yaşı	Kod	Kadın/ Erkek	Başlangıç yaşı	Kod	Kadın/ Erkek	Başlangıç yaşı	Kod	Kadın/ Erkek	Başlangıç yaşı	Kod	Kadın/ Erkek	Başlangıç yaşı
BG006	E	21	BG270	E	16	BG027	K	18	BG040	E	58	BG073	E	35
BG008	K	31	BG278	K	39	BG147	E	34	BG054	E	31	BG076	K	13
BG012	K	38	BG289	K	39	BG180	E	27	BG056	K	13	BG087	E	13
BG015	E	21	BG293	K	18	BG187	E	25	BG057	K	42	BG092	K	29
BG017	K	14	BG300	K	40	BG288	E	34	BG059	K	19	BG096	K	34
BG022	K	19	BG003	K	15	BG292	E	33	BG068	K	34	BG203	E	20
BG023	K	32	BG044	K	36	BG309	K	23	BG485	E	32	BG210	E	19
BG025	K	36	BG142	E	-	BG402	K	34	BG487	E	32	BG224	K	37
BG034	E	14	BG191	E	35	BG418	E	16	BG518	E	12	BG257	K	48
BG036	E	23	BG192	K	14	BG428	K	17	BG551	K	19	BG287	E	-
BG554	E	24	BG194	K	34	BG628	K	-	BG632	K	-	BG267	E	23
BG568	K	28	BG200	K	22	BG627	E	-	BG629	K	-	BG622	E	-
BG570	K	26	BG206	K	26	BG630	K	-	BG490	K	39	BG258	E	16
BG571	E	18												

Tablo 18. Çalışmanın Kontrol Grubuna Ait Kod ve Cinsiyet.

Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek
BG154	E	BG406	K	BG283	K	BG334	K	BG331	K	BG463	E	BG319	K	BG311	K
BG160	E	BG407	E	BG286	E	BG336	K	BG330	E	BG509	E	BG321	K	BG315	E
BG186	K	BG429	E	BG290	K	BG337	K	BG322	K	BG624	K	BG239	E	BG468	E
BG226	E	BG435	K	BG291	E	BG340	K	BG631	K	BG241	K	BG240	K	BG489	E
BG230	E	BG437	E	BG294	K	BG345	K	BG251	K	BG253	K	BG306	E	BG266	K
BG237	K	BG447	K	BG295	E	BG348	E	BG276	E	BG255	K	BG310	E	BG275	E
BG238	K	BG449	K	BG302	E	BG350	E	BG316	K	BG259	K	BG323	K	BG262	K

Tablo 19. Çalışmanın Akraba Grubuna Ait Kod, Cinsiyet.

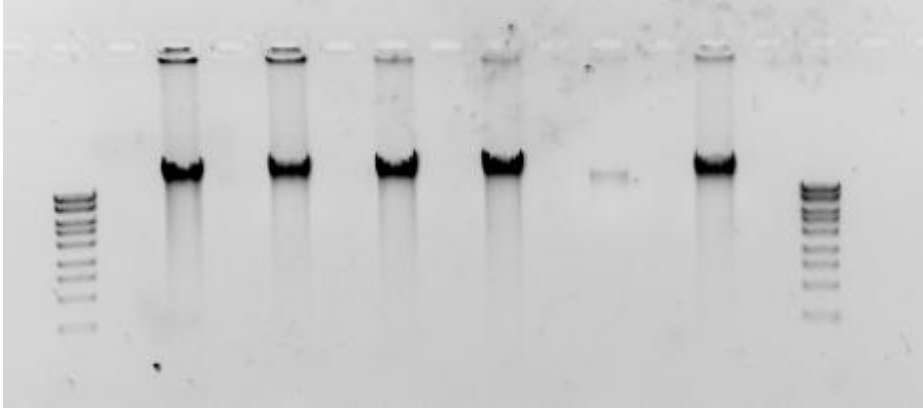
Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek	Kod	Kadın/ Erkek
BG007	K	BG060	K	BG037	E	BG225	E	BG088	E	BG097	K
BG009	K	BG069	K	BG041	K	BG146	K	BG026	K	BG252	K
BG011	K	BG074	K	BG045	E	BG024	K	BG029	E	BG552	K
BG013	K	BG075	K	BG055	K	BG204	K	BG058	K	BG207	K
BG018	E	BG035	E	BG208	E						

Tablo 20. Çalışma Gruplarının Başlangıç yaş Ortalaması, Erkek/Kadın Oranı, Başlangıç Yaş Yüzdesi. ANOVA testine göre çalışma gruplarının demografik özellikleri arasında anlamlı fark yoktur ($P>0,5$).

Çalışma Grubu	Sayı	Çalışma zamanında		
		yaş ortalaması	Başlangıç Yaş Ortalaması	Kadın/Erkek Oranı
Bipolar Bozukluk Grubu	66	37.0±10.42	26.60±10.10	37/29
Sağlıklı Gönüllü Grubu	56	37.49±11.52	yok	32/24
Birinci Derece Akraba Grubu	27	42.19±13.92	yok	19/8

4.2. DNA İzolasyon ve Ölçümleri:

Çalışma grubundaki bireylerden EDTA'lı tüplere alınan bir ml kan örneğinden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA saflıkları ve konsantrasyonları pikodrop ile ölçüldü. Ayrıca, tüm DNA örnekleri %1 agaroz jelde yürütüldü ve translüminatör ile görüntülenerek pikodrop bulguları teyit edildi (Şekil 12). DNA örneklerinin pikodrop ölçümleri Tablo 21'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Bazı Olgulara Ait DNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüsü.

Tablo 21. DNA Örneklerinin Pikodrop Ölçümleri.

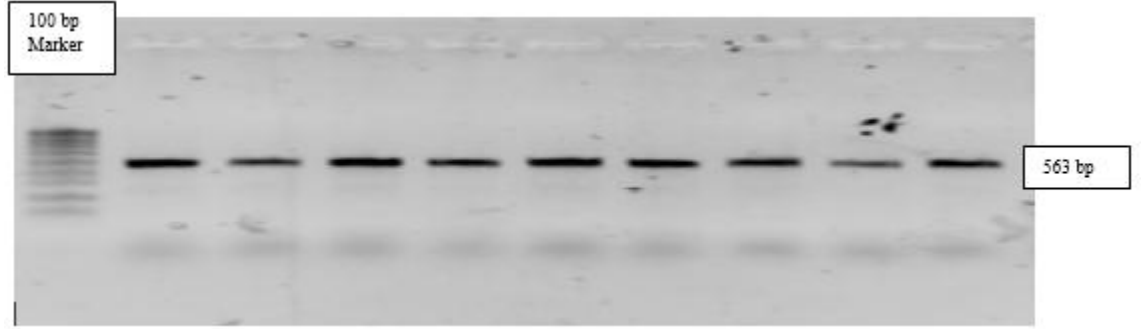
Kod	Konsant rasyon ng/ μ L	A260/A280	Kod	Konsant rasyon ng/ μ L	A260/A280	Kod	Konsant rasyon ng/ μ L	A260/A280	Kod	Konsant rasyon ng/ μ L	A260/A280	Kod	Konsant rasyon ng/ μ L	A260/A280
BG006	16,9	1.747	BG270	15,2	1.999	BG027	16,6	1.854	BG040	23,8	1.82	BG073	220,8	1.697
BG008	33,1	1.808	BG278	19,1	2.111	BG147	10,4	2.009	BG054	17,4	1.922	BG076	209,6	1.541
BG012	32,4	1.937	BG289	12,1	2.594	BG180	9,4	2.044	BG056	15,8	1.875	BG087	33,0	1.694
BG015	37,2	2.003	BG293	14,9	2.584	BG187	36,7	2.272	BG057	116,7	2.041	BG092	181,8	1.597
BG017	51,0	20714	BG300	17,8	1.781	BG288	35,9	2.2	BG059	68,5	1.787	BG096	149,7	1.759
BG022	15,8	20384	BG003	88,0	1.551	BG292	31,2	1.897	BG068	88,0	1.36	BG203	154,4	1.57
BG023	17,7	2.317	BG044	75,4	1.617	BG309	30,2	1.86	BG485	94,2	1.492	BG210	23,3	2.014
BG025	21,1	2.121	BG142	62,2	1.711	BG402	28,3	1.914	BG487	92,8	1.333	BG224	11,8	2.086

BG034	63,9	1.890	BG191	51,5	1.483	BG418	27,7	1.858	BG518	10,3	2.357	BG257	12,7	1.734
BG036	44,1	1.747	BG192	72,1	1.503	BG428	35,2	1.949	BG551	2,2	2.105	BG287	25,2	2.019
BG554	61,5	1.808	BG194	55,1	1.635	BG628	34,5	1.912	BG632	0,3	0.101	BG267	305,4	2.444
BG568	71,1	1.937	BG200	24,5	1.972	BG627	42,9	2.004	BG629	1,2	1.191	BG622	305,9	2.253
BG570	54,9	2.003	BG206	18,4	1.86	BG630	41,0	1.941	BG490	4,4	2.024	BG258	317,5	2.141
BG571	46,5	2.014	BG406	11,2	2.239	BG283	27,6	1.875	BG334	13,4	3.085	BG331	24,6	2.051
BG154	136,3	2.384	BG407	94,6	1.628	BG286	30,3	2.066	BG336	29,5	1.663	BG330	24,2	1.725
BG160	64,2	2.098	BG429	40,2	1.705	BG290	29,8	2.034	BG337	21,9	3.258	BG322	5,7	1.829
BG186	53,9	2.38	BG435	10,9	2.038	BG291	17,2	1.961	BG340	20,9	2.408	BG631	4,6	1.842
BG226	36,7	2.141	BG437	53,2	1.583	BG294	35,7	2.034	BG345	22,9	2.105	BG251	20,9	1.604
BG230	22,0	1.714	BG447	86,8	1.556	BG295	34,9	1.972	BG348	25,6	1.747	BG276	19,6	1.553
BG237	24,7	2.872	BG449	22,8	2.048	BG302	26,5	1.978	BG350	270,3	1.808	BG316	57,5	2.024
BG238	35,5	1.87	BG319	3,8	1.862	BG311	25,6	1.898	BG007	269,3	1.937	BG060	56,5	2.012
BG463	22,2	1.684	BG321	3,5	1.274	BG315	220,0	1.644	BG009	16,8	2.003	BG069	134,2	1.846
BG509	24,5	2.067	BG239	188,3	1.067	BG468	215,7	1.545	BG011	324,0	2.014	BG074	22,8	2.003
BG624	25,0	2.018	BG240	39,4	1.166	BG489	16,7	2.252	BG013	157,4	2.084	BG075	6,0	2.021
BG241	14,6	1.887	BG306	157,6	1.848	BG266	25,1	1.886	BG018	19,3	2.317	BG035	5,2	2.092
BG253	23,8	1.785	BG310	208,6	1.516	BG275	11,0	2.123	BG037	13,7	2.121	BG225	24,7	2.544
BG255	260,0	1.73	BG323	135,5	2.069	BG262	23,4	1.936	BG041	280,3	1.721	BG146	17,8	2.151
BG259	66,9	2.051	BG088	251,2	1.698	BG097	25,0	2.36	BG045	30,0	1.781	BG024	39,6	1.743
BG029	223,3	1.591	BG026	14,5	2.004	BG252	22,9	2.009	BG055	22,4	1.953	BG204	49,0	2.51
BG058	26,9	1.862	BG207	16,7	2.052	BG552	17,1	1.816	BG208	23,6	2.197			

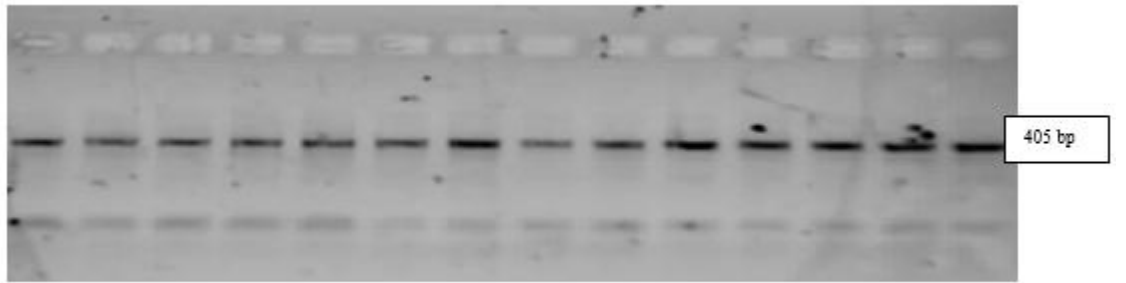
Tablo 21 (devam). DNA Örneklerinin Pikodrop Ölçümleri.

4.3. PCR çalışması ve PCR örneklerinin görüntülenmesi:

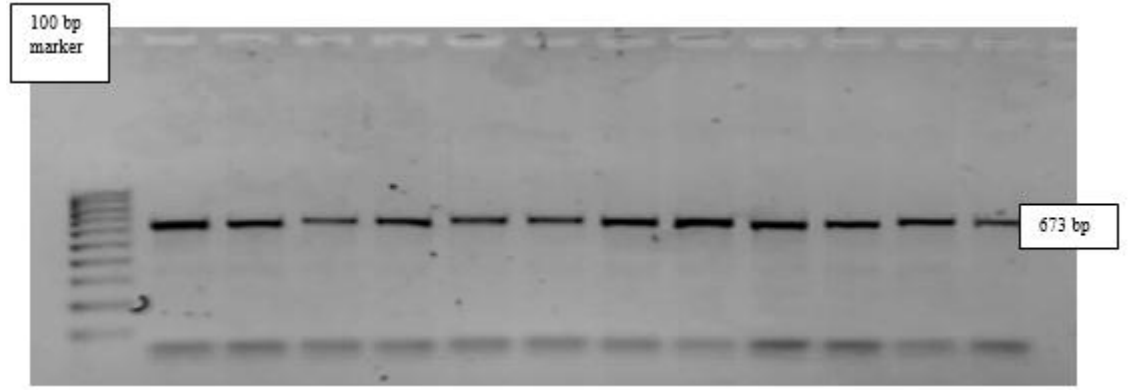
Elde edilen DNA'lar PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR örneklerinden beş μ l'si agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve UV ışınının altında görüntülendi. Görüntüleme sonuçlarına ait bazı sonuçlar Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. Bazı Olguların 5'UTR Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü.



Şekil 14. Bazı Olguların 3'UTR 4. Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü.



Şekil 15. Bazı olguların 3'UTR 3. Bölgesine Ait PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü.

4.4. DNA dizi analizi:

Nonspesifik bant içermeyen PCR ürünleri saflaştırma ve dizi analizi için Makrogen firmasına gönderili (<http://www.macrogen.com>). Dizi analizi sonuçları DNADynamo ve Chromas programları ile incelendikten sonra Pdf formatında olan analiz sonuçları gözle de incelendi ve DNA dizisindeki mutasyon/SNP'ler saptandı.

4.5. Araştırmada saptanan SNP'ler:

Çalışmamızda GDNF geninde toplam on SNP saptandı. Saptanan SNP'ler den 7'si daha önce saptanmış olan ve SNP veri tabanlarında mevcut olan SNP'lerdi. SNP'lerden 3'ü ilk defa bu çalışmada saptandı. Saptanan SNP'ler ve denek kodları Tablo 22' de gösterilmiştir. Saptanan SNP'lerin kromozom yerleşimleri, allel frekansları allel sayısı ve genotip sayısı Tablo 23'de verilmiştir.

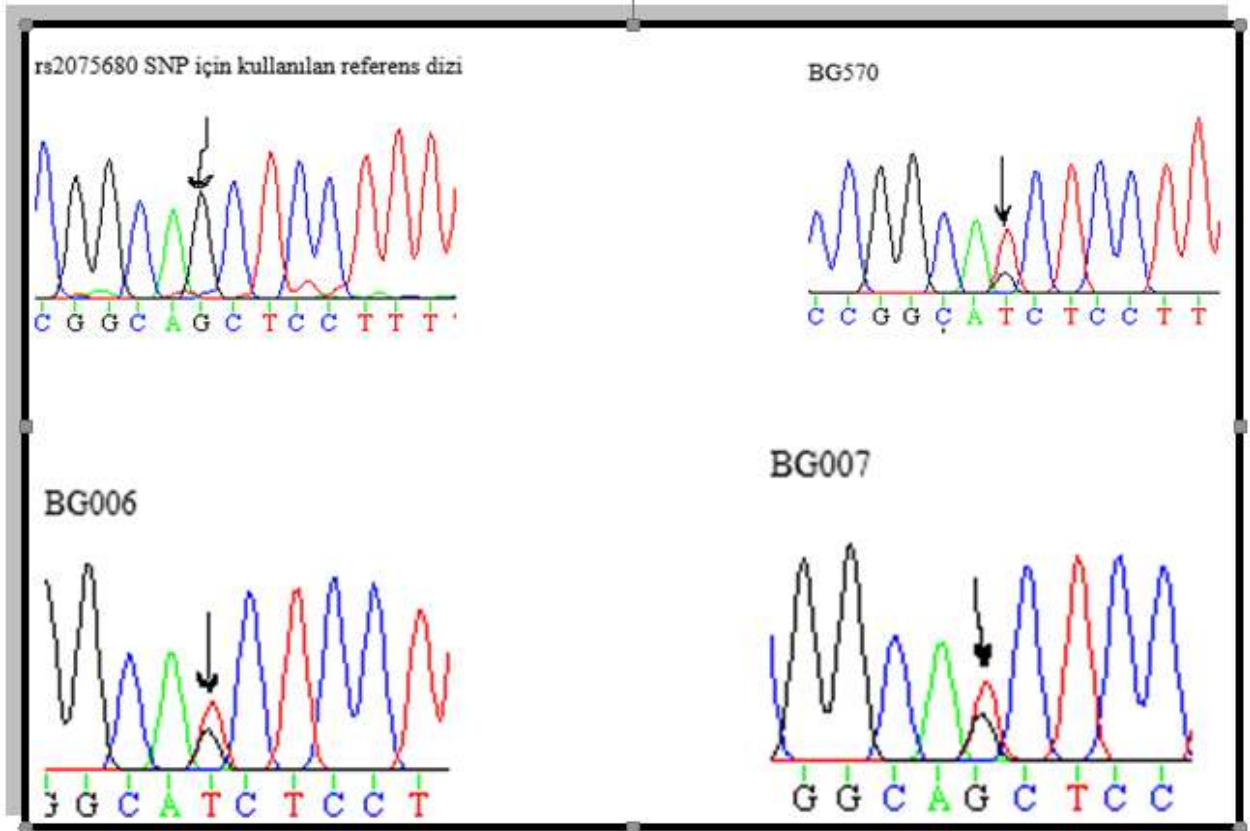
Tablo 22. Çalışmada Saptanan SNP’ler ve Denek Kodları.

Saptanan SNP	Bipolar bozukluğu grubu kod	Sağlıklı gönüllü grubu kod	Birinci derece akraba grubu kod
2075680SNP C>A	BG006-BG008-BG057- BG059-BG068-BG224- BG257-BG142-BG191- BG194-BG570-BG187- BG428	BG186-BG226-BG275- BG283-BG286-BG295- BG322-BG330-BG331- BG336-BG340-BG348- BG350-BG449-BG631- BG266 BG334BG302	BG007-BG060-BG069- BG088-BG146-BG225
rs79669773 T>C	BG023-BG087-BG092- BG278-BG142-BG192- BG490-BG507-BG180	BG310-BG337-BG435	BG024-BG204
rs62360370 G>A	BG003-BG044-BG147- BG187-BG402-BG487	BG240-BG251-BG276- BG286-BG302-BG316- BG334-BG350-BG429- BG437-BG463-BG509	BG060-BG225
rs142426358 T>C	BG056	-	-
rs147083416 C>T	-	BG331-BG283	-
rs78613670 C>T	BG191-BG008	-	-
rs115322727 A>C	-	BG624	-
5:37814769 G>A	-	BG310	-
5:37812784 T>A	BG518-BG554	-	-
5:37812782 T>A	BG518-BG554	-	-

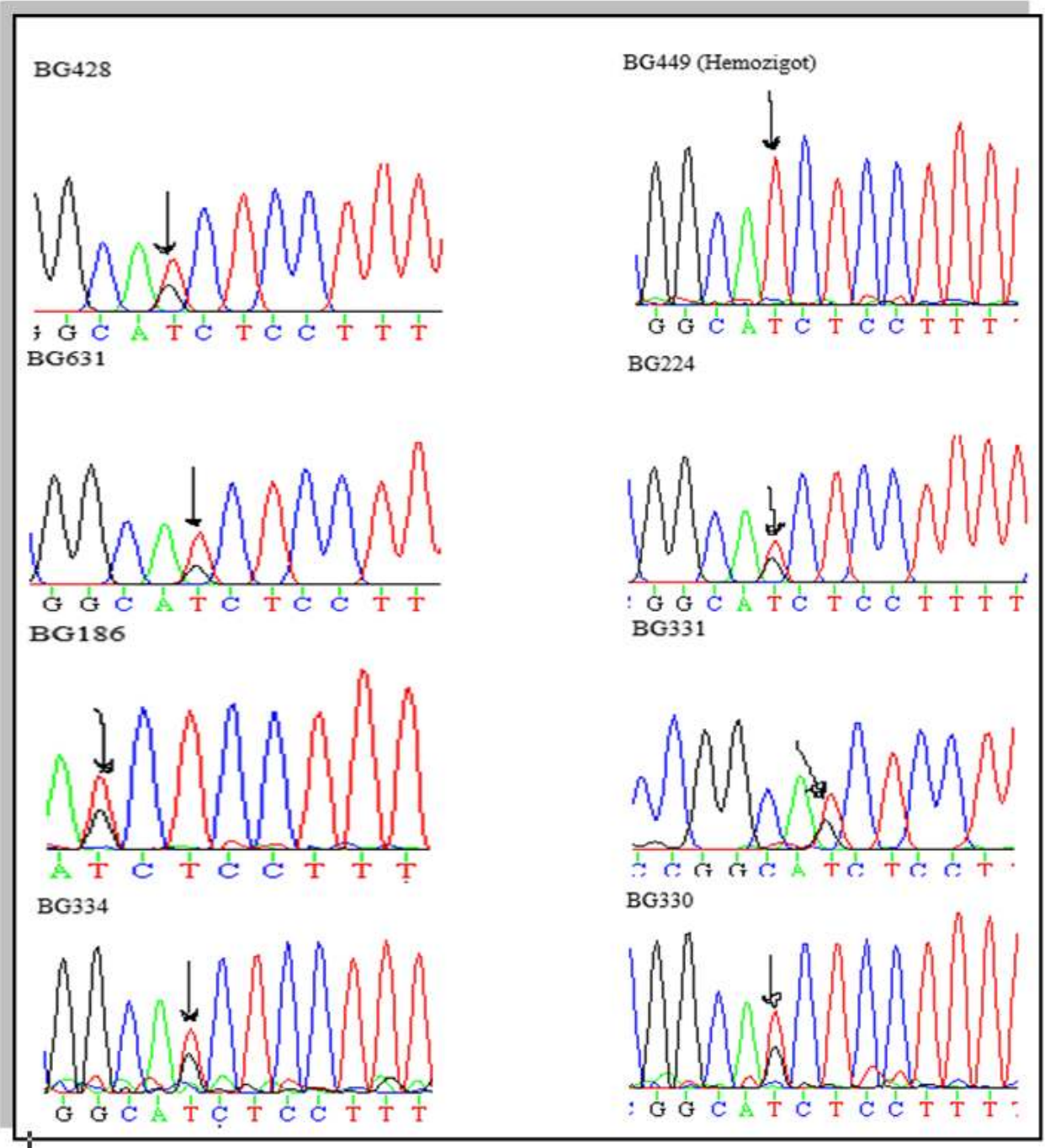
4.5.1. rs2075680 C>A SNP

Çalışmamızda saptanan SNP’lerden, rs 2075680 C>A SNP bipolar tanısı konulan 13 kişi, sağlıklı gönüllü 18 kişi ve akraba altı kişide saptandı (Şekil 16 ve Tablo 22). Üç sağlıklı gönüllü ve bir birinci derece akrabada 2075680 C>A SNP homozigot olarak görüldü. Tüm üç çalışma grubunda da rs2075680 C>A SNP allel frekansları Hardy- Weinberg dağılımına uyduğu gösterildi. rs 075680 C>A SNP’nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-weinberg test sonuçları verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs2075680 C>A SNP'nin allel frekansı sağlıklı gönüllü grubunda bipolar bozukluk hasta grubuna kıyasla anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (P=0.04; GOO=2.11, 95% GA= [1,0042-4,4443]). Benzer şekilde rs2075680 C>A SNP'nin allel frekansı sağlıklı gönüllü erkek grubunda erkek bipolar bozukluk hasta grubuna kıyasla anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (P=0.03; GOO=3.55, 95% GA=

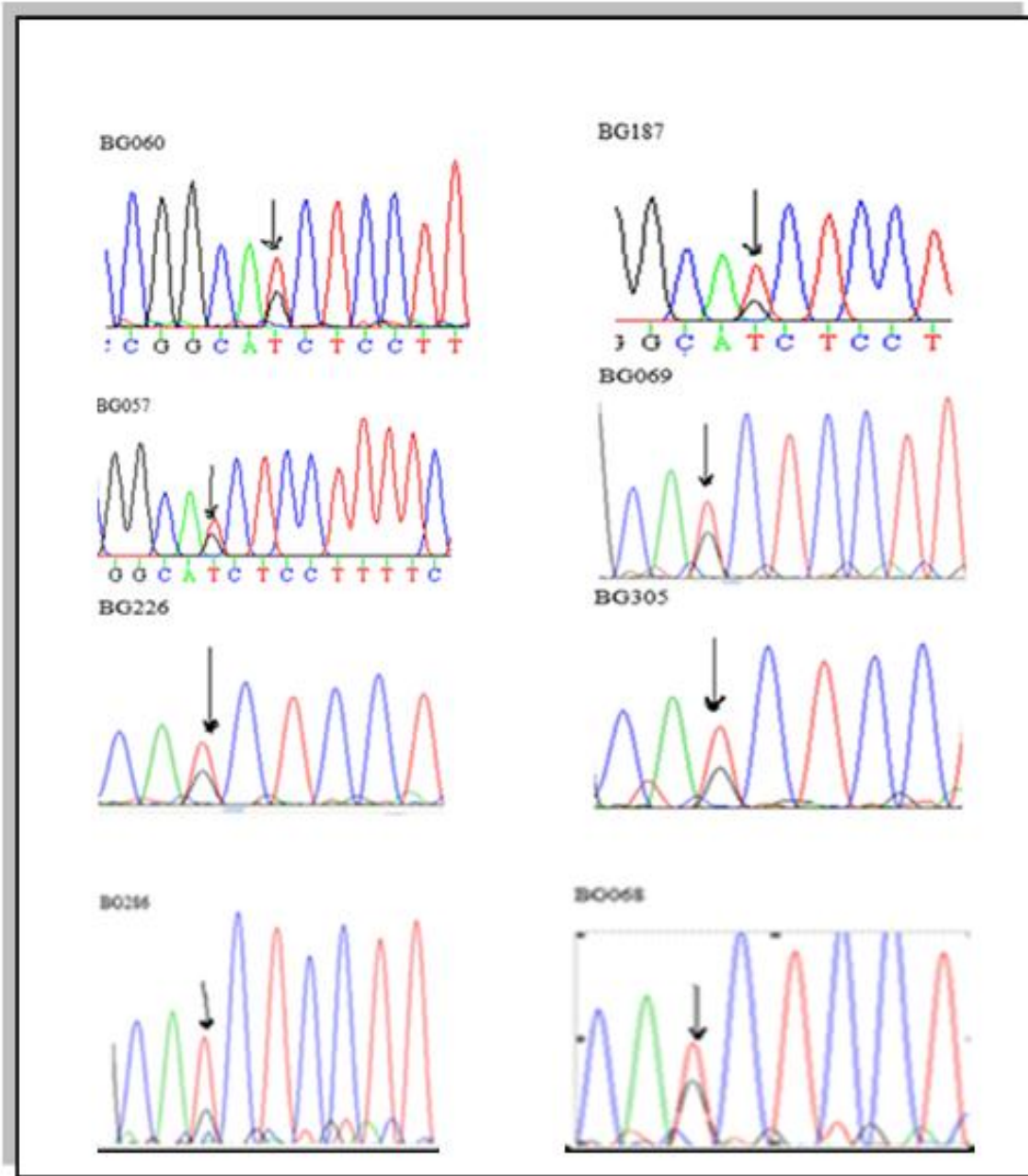
[1,0367-12,17]). Sağlıklı gönüllü ($p=0.09$) ve akraba grubu ($p=0.53$) hasta grubuna kıyasla genotip frekanslarında anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde genotip frekansı erkek hasta grubu ve erkek sağlıklı gruplar arasında anlamlı fark göstermedi. Kadın hasta grubu ve kadın sağlıklı grubu arasında genotip ve allel frekanslarında anlamlı fark saptanmadı ($P=0.4$; $GOO=1.49$, $95\% GA= [0.57-3.88]$).



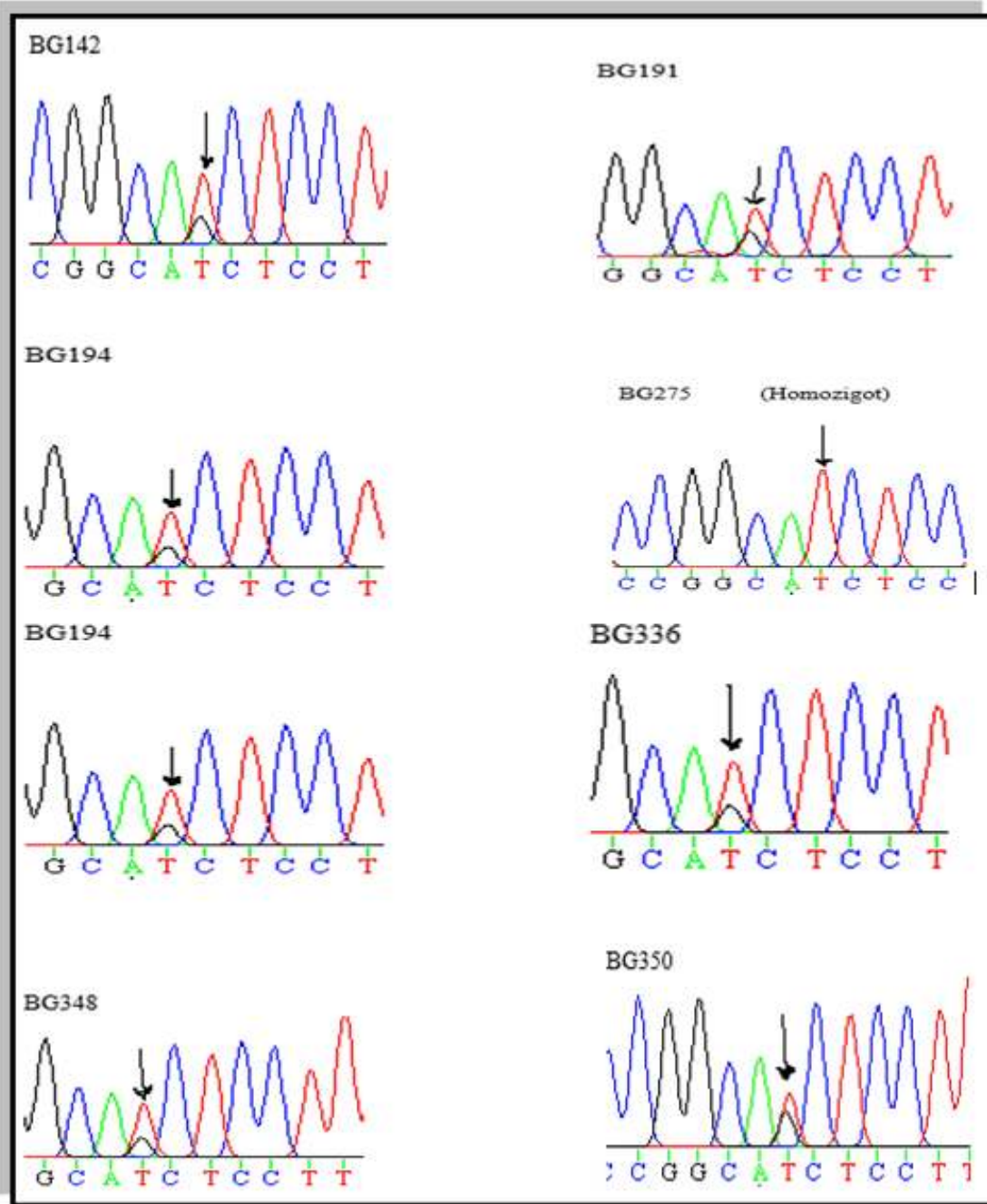
Şekil 16. rs2075680 C>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları. *GDNF* geni negatif iplikte olduğu için SNP'ler ters iplikte gösterilmiştir.



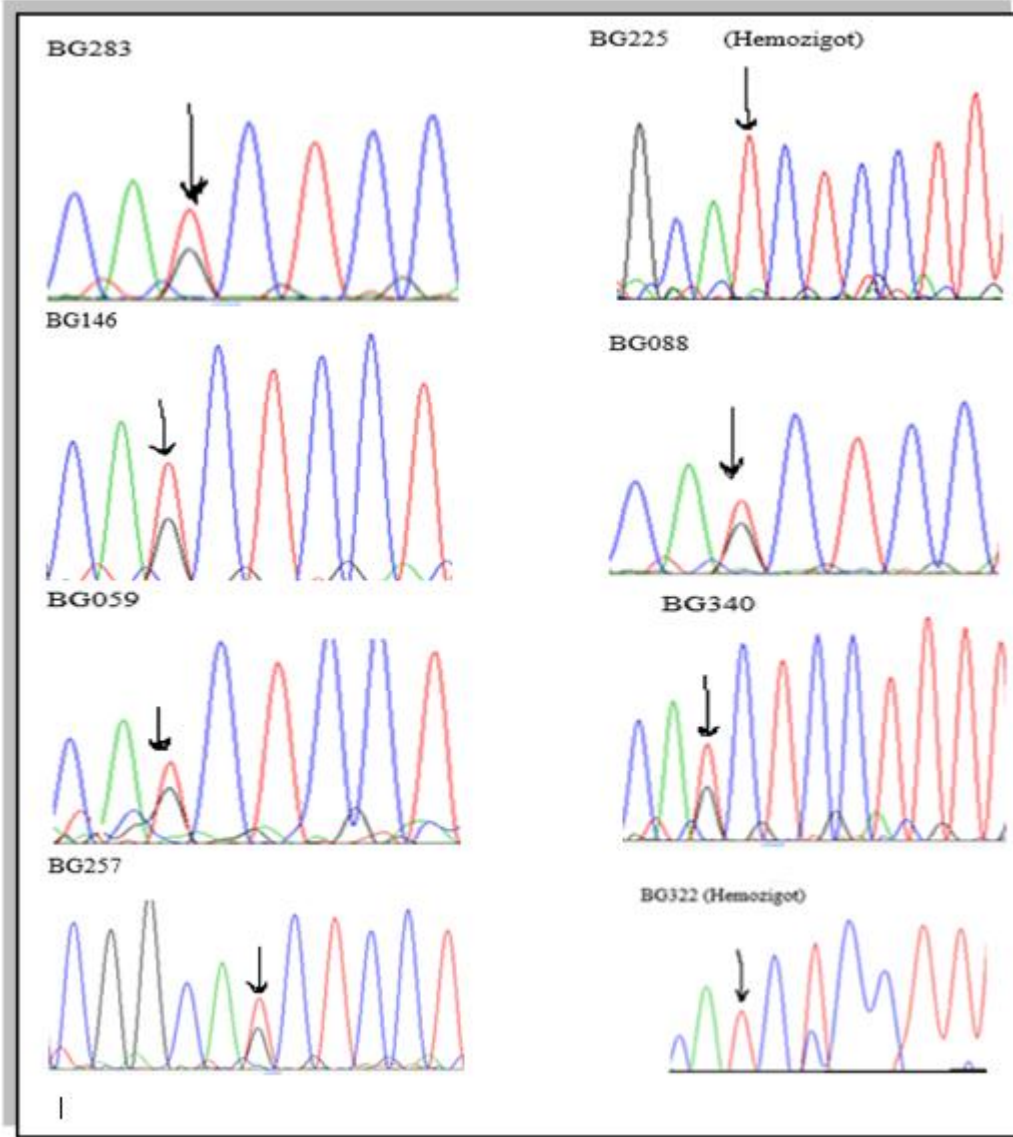
Şekil 16 (devam). rs2075680 C>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.



Şekil 16 (devam). rs2075680 C>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.



Şekil 16 (devam). rs2075680 C>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.



Şekil 16 (devam). rs2075680 C>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.

Tablo 23. GDNF Geninin Ekson 1'den Önce 5'UTR ve 3'UTR Bölgelerine Ait Bulunan SNP'lerin, Kromozom Yerleşimleri, Allel ve Genotip Frekansları ve Bipolar Bozukluk ile İlişki Analizlerinin Sonucu.

SNP	Kromozom yerleşimi ^a	Minor allele	MAF ^b Bipolar bozukluk grup	MAF ^b Sağlıklı gönüllü grup	Major allel	P value	Olasılıklar Oranı	L95 ^c	U95 ^d	Allel sayısı	Genotip sayısı
rs2075680	5:37840642	A	0.098	0.188	C	0.04	2.11	1.0042	4.4434	BB ^e 13(A)/119 (C)	BB 0 (A/A)/ 13 (C/A)/ 53 (C/C)
										SG ^f 21(A)/91 (C)	SG 3 (A/A)/ 15 (C/A)/ 38 (C/C)
										BDA ^g 6(A)/47(C)	BDA 1 (A/A)/ 5 (C/A)/ 21 (C/C)
Yeni Değişiklik	5:37814769	A	0.000	0.009	G	0.27	-	-	-	BB 0 (A)/ 132 (G)	BB 0 (G/A)/ 66 (G/G)
										SG 1 (A)/ 111 (G)	SG 1 (G/A)/ 55 (G/G)
										BDA 0 (A)/ 54 (G)	BDA 0 (G/A)/ 27 (G/G)
rs79669773	5:37814765	C	0.068	0.027	T	0.14	0.38	0.0909	1.4248	BB 9 (C)/ 123(T)	BB 9 (T/C)/ 57 (T/T)
										SG 3 (C)/ 109 (T)	SG 3 (T/C)/ 53 (T/T)
										BDA 2 (C)/ 52(T)	BDA 2 (T/C)/ 25 (T/T)
rs62360370	5:37814489	A	0.045	0.107	G	0.06	2.52	0.9136	6.9504	BB 6 (A)/ 126 (G)	BB 6 (G/A)/ 60 (G/G)
										SG 12 (A)/ 100 (G)	SG 12 (G/A)/ 44 (G/G)
										BDA 2 (A)/ 52 (G)	BDA 2 (G/A)/ 25 (G/G)

Tablo 23 (devam). GDNF Geninin Ekson 1'den Önce 5'UTR ve 3'UTR Bölgelerine Ait Bulunan SNP'lerin, Kromozom Yerleşimleri, Allele and Genotip Frekansları ve Bipolar Bozukluk ile İlişki Analizlerinin Sonucu.

rs142426358	5:37814477	C	0.008	0.000	T	0.36	-	-	-	BB 1 (C)/ 131 (T)	BB 1 (T/C)/ 65 (T/T)
										SG (C)/ 112 (T)	SG 0 (T/C)/ 56 (T/T)
										BDA 0 (C)/ 54 (T)	BDA 0 (T/C)/ 27 (T/T)
rs78613670	5:37814364	T	0.015	0.000	C	0.20	-	-	-	BB 2 (T)/ 130 (C)	BB 2 (C/T)/ 64 (C/C)
										SG 0 (T)/ 112 (C)	SG 0 (C/T)/ 56 (C/C)
										BDA 0 (T)/54 (C)	BDA 0 (C/T)/ 27 (C/C)
rs147083416	5:37813971	T	0.000	0.018	C	0.12	-	-	-	BB 0 (T)/ 132 (C)	BB 0 (C/T)/ 66 (C/C)
										SG 2 (T)/ 110 (C)	SG 2 (C/T)/ 54 (C/C)
										BDA 0 (T)/ 54 (C)	BDA 0 (C/T)/ 27 (C/C)
rs115322727	5:37813968	C	0.000	0.009	A	0.27	-	-	-	BB 0 (C)/ 132 (A)	BB 0 (C/A)/ 66 (C/C)
										SG 1 (C)/ 111 (A)	SG 1 (C/A)/ 55 (C/C)
										BDA 0 (C)/ 54 (A)	BDA 0 (C/A)/ 27 (C/C)
Yeni Değişiklik	5:37812784	A	0.015	0.000	T	0.19	-	-	-	BB 2 (A)/ 130 (T)	BB 2 (T/A)/ 64 (T/T)
										SG 0 (A)/ 112 (T)	SG 0 (T/A)/ 56 (T/T)
										BDA 0 (A)/ 54 (T)	BDA 0 (T/A)/ 27 (T/T)
Yeni Değişiklik	5:37812782	A	0.015	0.000	T	0.19	-	-	-	BB 2 (A)/ 130 (T)	BB 2 (T/A)/ 64 (T/T)
										SG 0 (A)/ 112 (T)	SG 0 (T/A)/ 56 (T/T)
										BDA 0 (A)/ 54 (T)	BDA 0 (T/A)/ 27 (T/T)

^a National Center for Biotechnology information (NCBI).

^b MAF = Minör Allel Frekansı.

^c L95 = Düşük %95 Güven Aralığı (Lower 95% confidence interval). ^d U95 = Yüksek %95 Güven Aralığı (Upper 95% confidence interval).

^e BB= Bipolar Bozukluk hasta SG = Sağlıklı Gönüllü ^f BDA = Birinci Derece Akraba.

Tablo24. İlişki Analizleri Bipolar Bozukluğu Hasta Grubu ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasında *GDNF* rs2075680 C>A SNP (5:37840642)'nin Allel Frekansında Anlamlı Fark Olduğunu Gösterdi.

	Grup	Allel C (frekans)	Allel A (frekans)	Olasılıklar oranı	p değeri	Genotip C/C (frekans)	Genotip C/A (frekans)	Genotip A/A (frekans)	p değeri
Tüm	Bipolar Bozukluk	119(0.902)	13(0.098)	2.11*	0.04	53(0.803)	13(0.197)	0(0.000)	0.089
	Sağlıklı Gönüllü	91(0.812)	21(0.188)			38(0.679)	15(0.268)	3(0.054)	
Erkek	Bipolar Bozukluk	54(0.931)	4(0.069)	3.55**	0.03	25(0.862)	4(0.138)	0(0.000)	0.11
	Sağlıklı Gönüllü	38(0.792)	10(0.208)			15(0.625)	8(0.333)	1(0.042)	
Kadın	Bipolar Bozukluk	65(0.878)	9(0.122)	1.49***	0.4	28(0.757)	9(0.243)	0(0.000)	0.3
	Sağlıklı Gönüllü	53(0.828)	11(0.172)			23(0.719)	7(0.219)	2(0.062)	

* %95 GA=[1.004248~4.443470] X2 4.003237 df=1 .
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.787656$, df=1, Fisher p 0.374852, Pearson p 0.374806
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.818259$, df=1, Fisher p 0.365733, Pearson p 0.365684
**%95 GA=[1.036766~12.173618] X2 4.450248 df=1.
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.159122$, df=1, Fisher p is 0.689983, Pearson p 0.689983
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.002659$, df=1, Fisher p is 0.958875, Pearson p 0.958856
***%95 GA=[0.578135~3.886390] X2 0.699374 df=1.
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.709349$, df=1, Fisher p 0.399700, Pearson p 0.399660
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=1.715854$, df=1, Fisher p 0.190288, Pearson p 0.190208

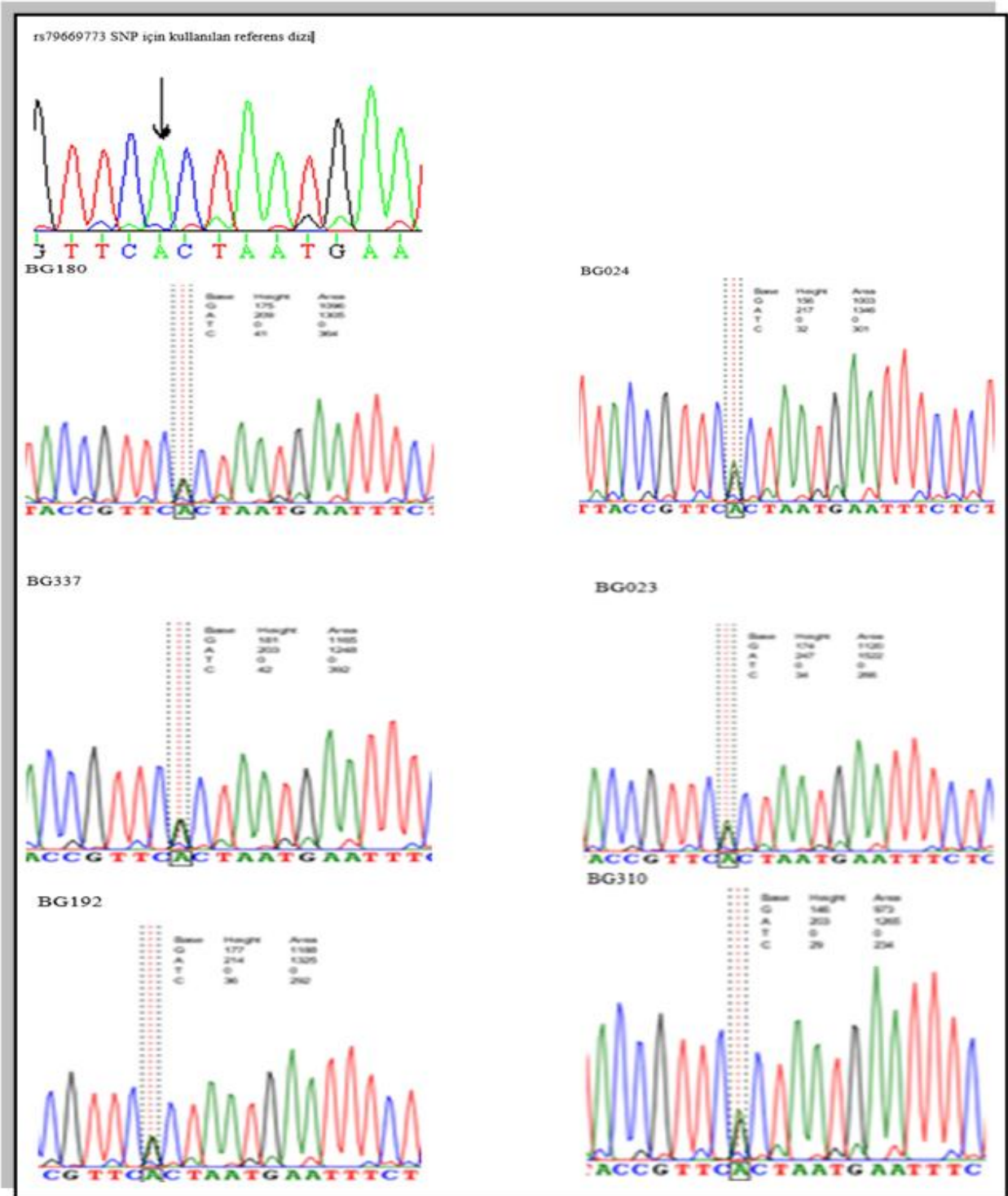
4.5.2. rs79669773 T>C SNP

rs79669773 T>C SNP 9 bipolar bozukluğu hastasında 3 sağlıklı gönüllü ve 2 birinci derece akrabada gösterildi. Denek kodları tablo 22'de verilmiştir (şekil 17 ve tablo 22). Tablo 25'de gösterildiği gibi rs79669773 T>C SNP allel frekansları tüm üç çalışma grubunda Hardy-Weinberg dağılımından sapma göstermedi. Allel frekansları ve genotip frekansları çalışma gruplar arasında anlamlı fark göstermedi (p>0.5).

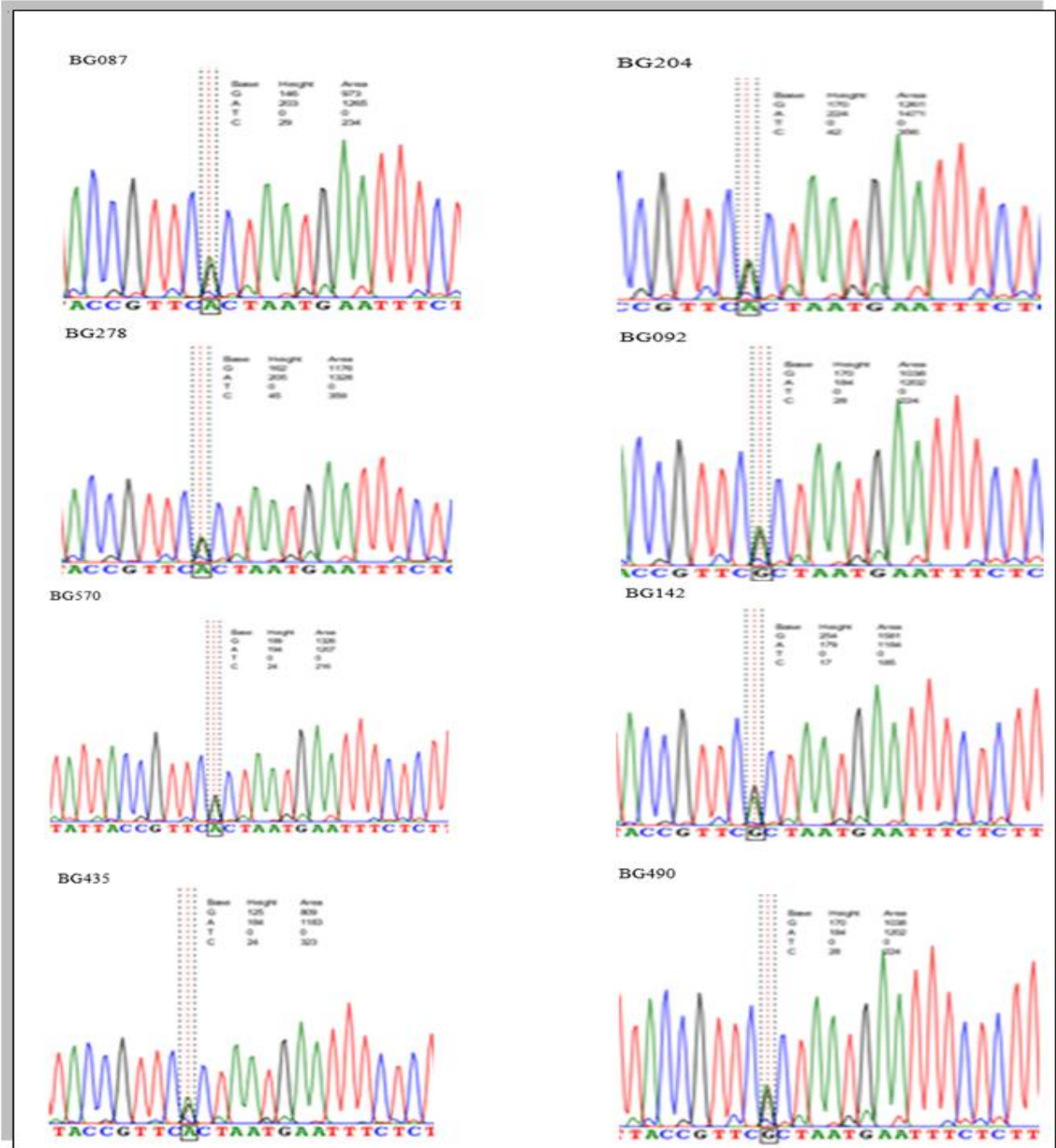
Tablo 25. rs79669773 T>C SNP (5:37814765) Bipolar Bozukluğu Üzerinde Etkisi Yoktur.

	Grup	Allel C (frekans)	Allel A (frekans)	Olasılıklar oranı	p değeri	Genotip T/T (frekans)	Genotip T/C (frekans)	p değeri
Tüm	Bipolar Bozukluk	123(0.932)	9(0.068)	0.37*	0.13	57(0.864)	9(0.136)	0.12
	Sağlıklı Gönüllü	109(0.973)	3(0.027)			53(0.946)	3(0.054)	
Erkek	Bipolar Bozukluk	55(0.948)	3(0.052)	0.39**	0.40	26(0.897)	3(0.103)	0.39
	Sağlıklı Gönüllü	47(0.979)	1(0.021)			23(0.958)	1(0.042)	
Kadın	Bipolar Bozukluk	68(0.919)	6(0.081)	0.36***	0.21	31(0.838)	6(0.162)	0.19
	Sağlıklı Gönüllü	62(0.969)	2(0.031)			30(0.938)	2(0.062)	

*%95 GA=[0.099297~1.424877] X2 2.220401 df=1.
 Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.353361$, df=1, Fisher p 0.552244, Pearson p 0.552238
 Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.042421$, df=1, Fisher p 0.836828, Pearson p 0.836808.
 **%95 GA=[0.039247~3.876880] X2 0.690198 df=1.
 Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.086281$, df=1, Fisher p 0.768972, Pearson p 0.768962
 Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.010865$, df=1, Fisher p 0.916988, Pearson p 0.916963
 ***%95GA=[0.071136~1.878898] X2 1.560480 df=1.
 Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.288062$, df=1, Fisher p 0.591489, Pearson p 0.591488
 Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.033299$, df=1, Fisher p 0.855214, Pearson p 0.855192.



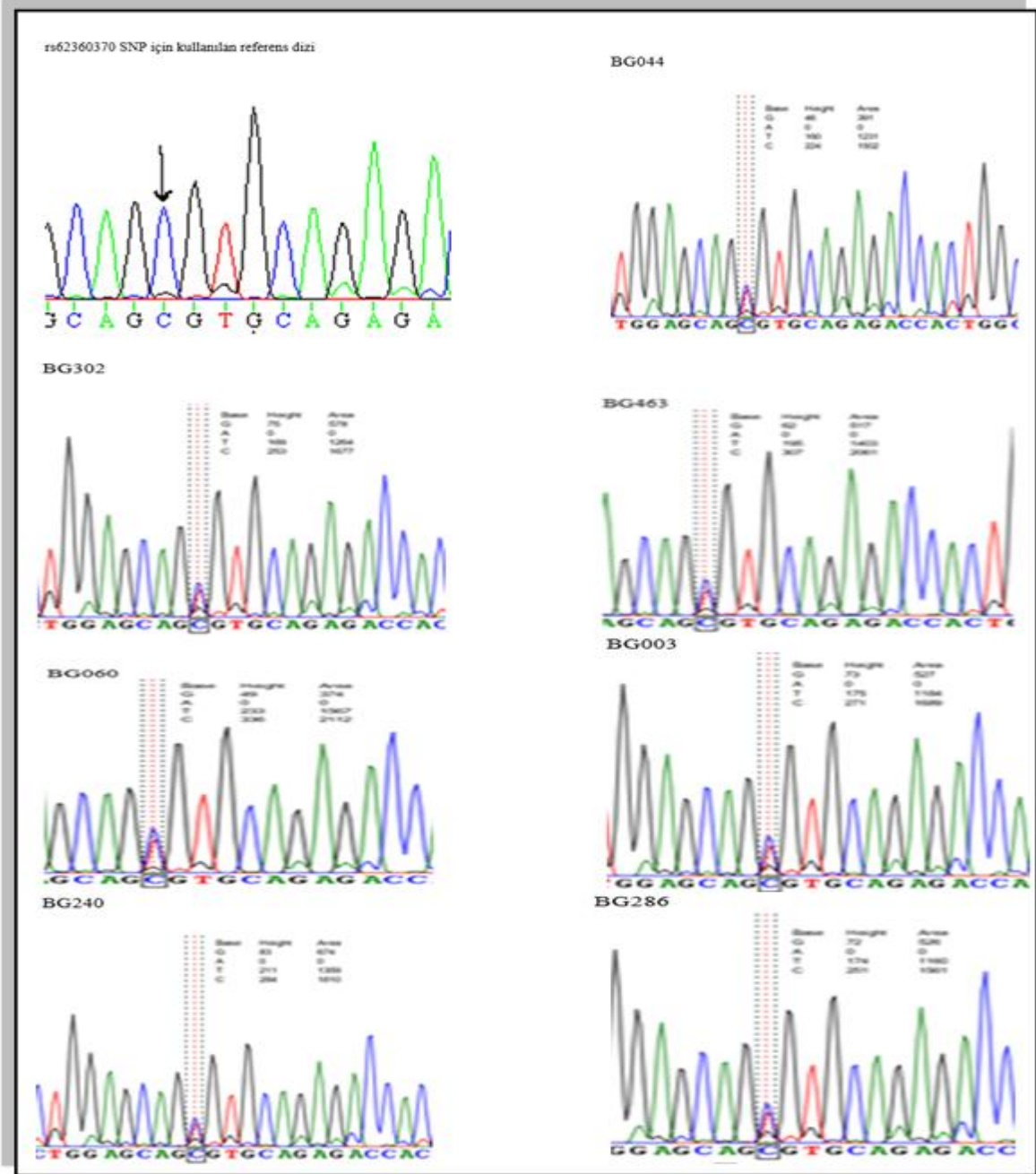
Şekil 17. rs79669773 T>C SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları. GDNF ters iplikte yerleştiği için SNP'ler ters iplikte gösterilmiştir.



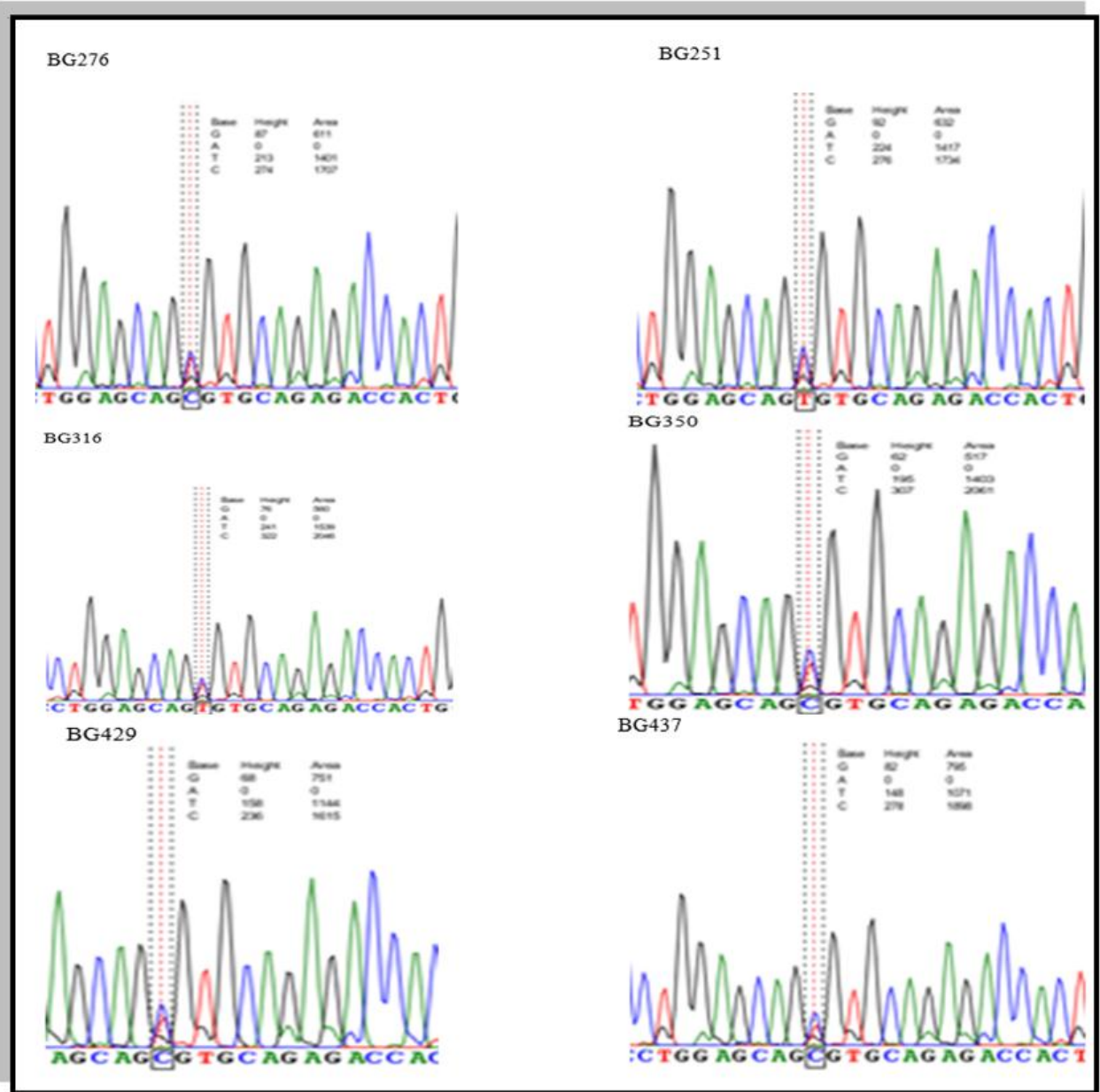
Şekil 17 (devam). rs79669773 T>C SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.

4.5.3. rs62360370 G>A SNP

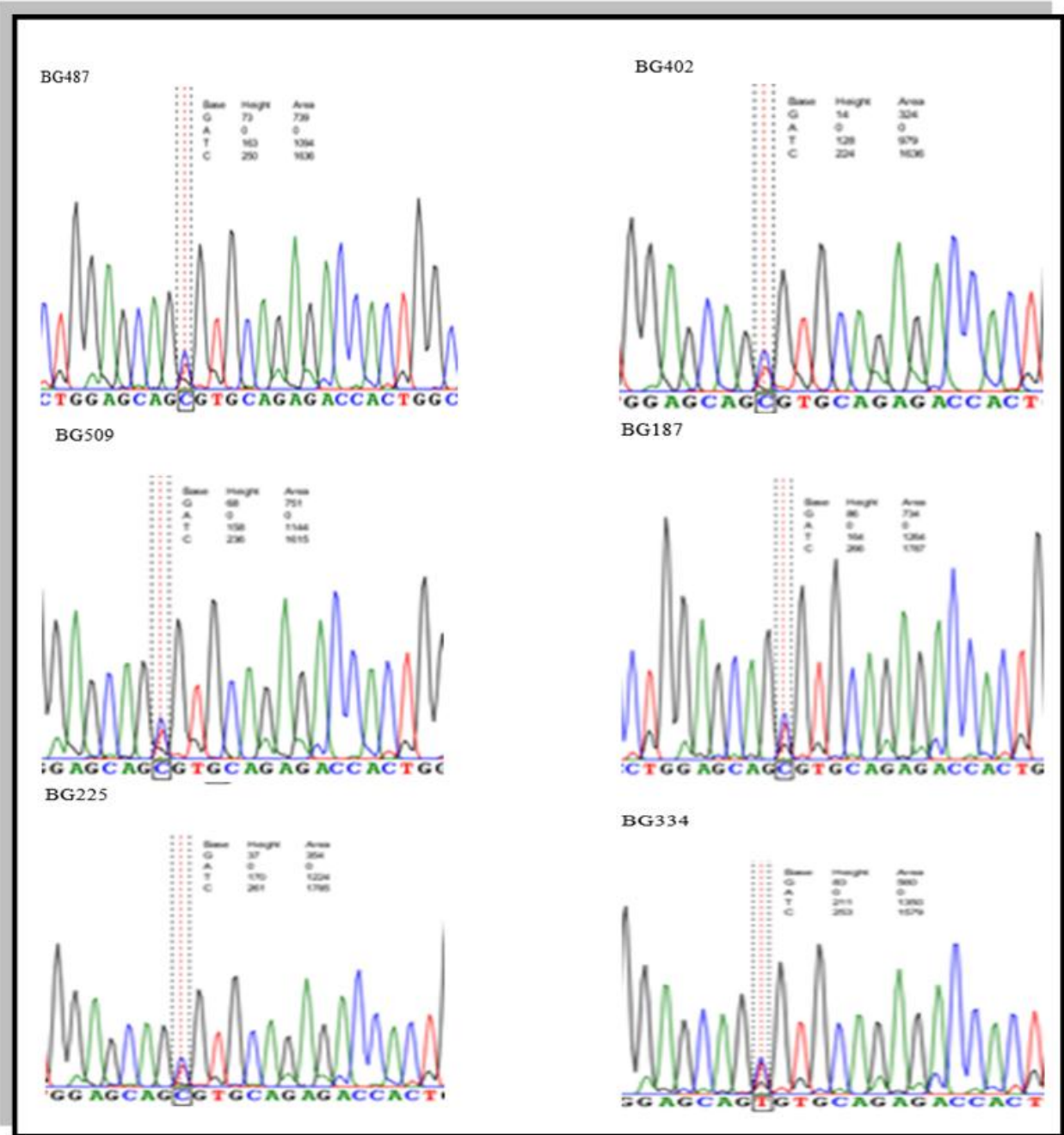
Tablo 23’de gösterildiği gibi rs62360370 G>A SNP altı hasta birey, 12 kontrol ve iki birinci derece akrabada saptandı (Şekil 18 ve Tablo 23). Hardy-Weinberg analiz sonuçları, allel ve genotip frekansları, olasılıklar oranları ve p değerleri rs62360370 G>A için Tablo 26’da verilmiştir. Çalışma gruplarında rs62360370 G>A allel frekansı Hardy-Weinberg dağılımından sapma göstermedi. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında allel ($P=0.06$; $GOO=3.37$, 95% $GA= [0.91-5.18]$) ve genotip ($P=0.05$; $GOO=2.72$, 95% $GA= [0.64-5.18]$) frekansları anlamlı fark göstermedi. Benzer şekilde kadın sağlıklı ve kadın hasta grupları arasında allel frekansı ($P=0.83$; $GOO=1.57$, 95% $GA= [0.33-7.32]$) ve genotip frekansı ($P=0.54$; $GOO=1.61$, 95% $GA= [0.33-7.84]$) anlamlı fark göstermedi. Ancak erkek hasta grubu ve erkek kontrol grupları arasında anlamlı fark saptandı ($P=0.05$; $GOO=3.66$, 95% $GA= [0.95-14.69]$).



Şekil 18. rs62360370 G>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları. GDNF ters iplikte olduğu için SNP'ler ters iplikte gösterilmiştir.



Şekil 18 (devam). rs62360370 G>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.



Şekil 18 (devam). rs62360370 G>A SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.

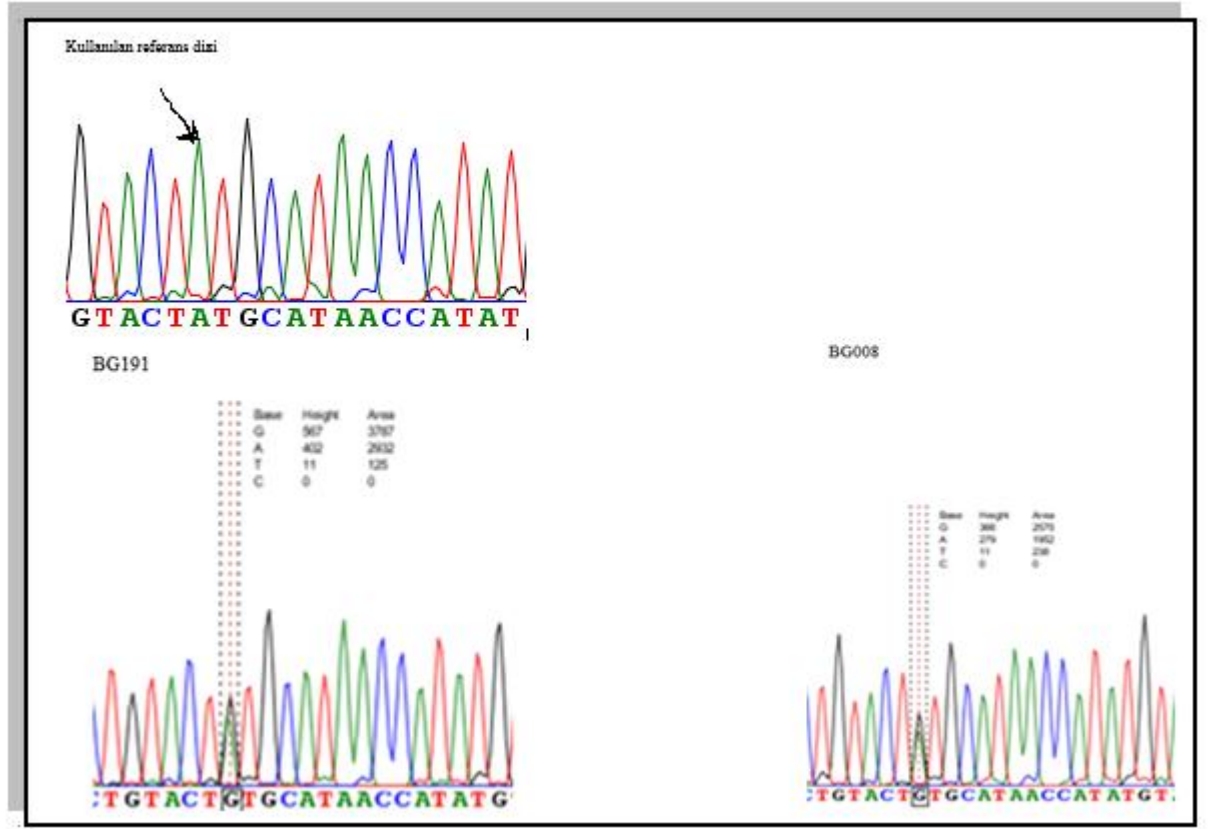
Tablo 26. rs62360370 G>A SNP (5:37814489) Erkek Hasta Grubu ve Erkek Sağlıklı Grubu Arasında Anlamlı Fark Gösterdi.

	Grup	Allel C (frekans)	Allel A (frekans)	Olasılıklar oranı	p değeri	Genotip G/G (frekans)	Genotip G/A (frekans)	p değeri
Tüm	Bipolar Bozukluk	126(0.955)	6(0.045)	2.52*	0.06	60(0.909)	6(0.091)	0.05
	Sağlıklı Gönüllü	100(0.893)	12(0.107)			44(0.786)	12(0.214)	
Erkek	Bipolar Bozukluk	55(0.948)	3(0.052)	3.66**	0.05	26(0.897)	3(0.103)	0.04***
	Sağlıklı Gönüllü	40(0.833)	8(0.167)			16(0.667)	8(0.333)	
Kadın	Bipolar Bozukluk	71(0.959)	3(0.041)	1.57****	0.83	34(0.919)	3(0.081)	0.54
	Sağlıklı Gönüllü	60(0.938)	4(0.062)			28(0.875)	4(0.125)	

*%95 GA=[0.913668~6.950444] X2 3.374478 df=1.
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.149660$, df=1, Fisher p 0.698877, Pearson p 0.698876.
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.806400$, df=1, Fisher p 0.369230, Pearson p 0.369182.
**%95 GA=[0.957055~14.982262] X2 3.730 df=1.
*** odds ratio= 4.33 %95 GA=[1.000531~18.0767809] X2 4.2195 df=1.
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.066058$, df=1, Fisher p 0.797175, Pearson p 0.797162.
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.742400$, df=1, Fisher p 0.388934, Pearson p 0.388892.
****%95 GA=[0.339627~7.329760] X2 is 0.3436 df=1
Hardy-Weinberg denge testi hasta grubu: $\chi^2=0.066058$, df=1, Fisher p 0.797175, Pearson p 0.79716
Hardy-Weinberg denge testi kontrol grubu: $\chi^2=0.142222$, df=1, Fisher p 0.706098, Pearson p 0.701144.

4.5.4. rs78613670 C>T SNP

Çalışma gruplarında allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımından sapma göstermedi ($p>0.05$). rs78613670 C>T SNP iki hasta bireyde heterozigot olarak saptandı ancak kontrol ve birinci derece akraba gruplarında saptanmadı (şekil 19 ve tablo 22). Tablo 23’de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).



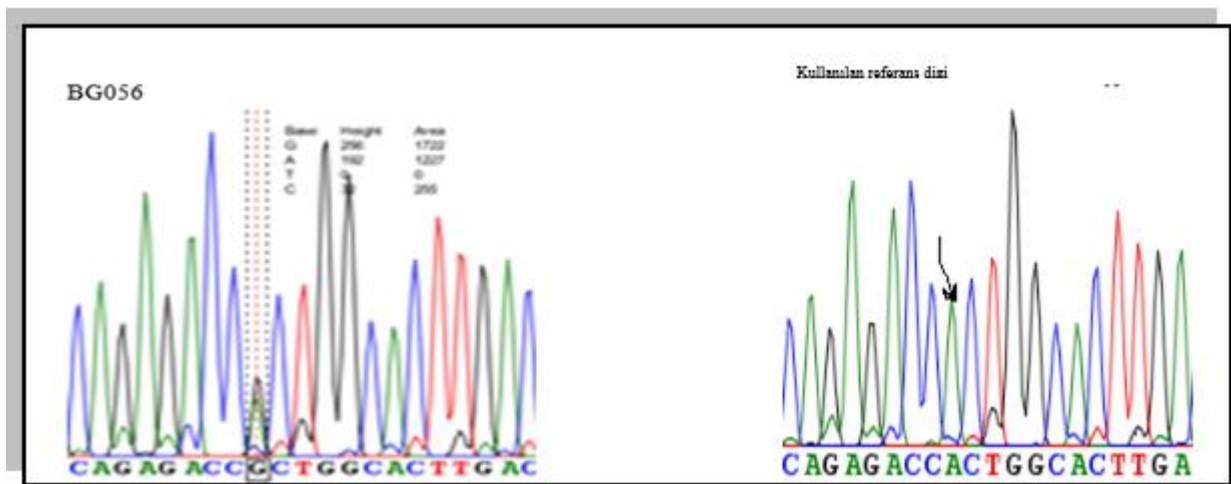
Şekil 19. rs78613670 C>T SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları. GDNF ters iplikte olduğu için SNP'ler ters iplikte gösterilmiştir.

4.5.5. rs142426358 T>C SNP

Hardy-Weinberg analizi rs142426358 SNP'si için çalışma gruplarında yasadan sapma göstermedi ($p>0.05$). rs142426358 T>C SNP sadece bir hasta grubunda görüldü ancak kontrol ve aile gruplarında saptanmadı. Şekil 16'da görüldüğü gibi rs142426358 SNP, GDNF geninin hsa-mir-216a ile homolojisi olan bölgede yerleşmiştir. Tablo 23'de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).

DNA	cagagaccacag
hsa-miR-216a-3p	cagagaccacug

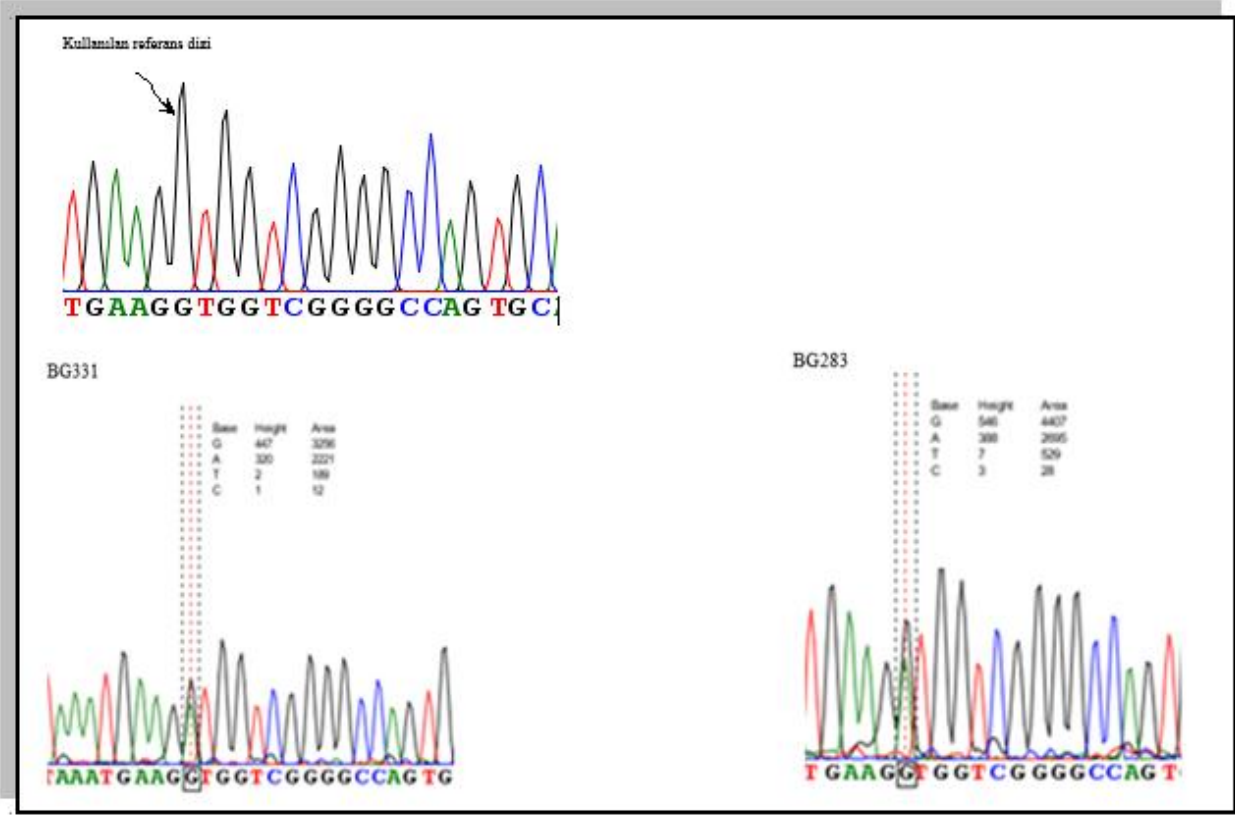
Şekil 20. rs142426358 T>C SNP'nin GDNF Geninin Olduğu Bölge ve hsa-mir-216a Arasındaki Homoloji. rs142426358 T>C SNP gri renkte işaretlenmiştir.



Şekil 21. rs142426358 T>C SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.

4.5.6. *rs147083416* C>T SNP

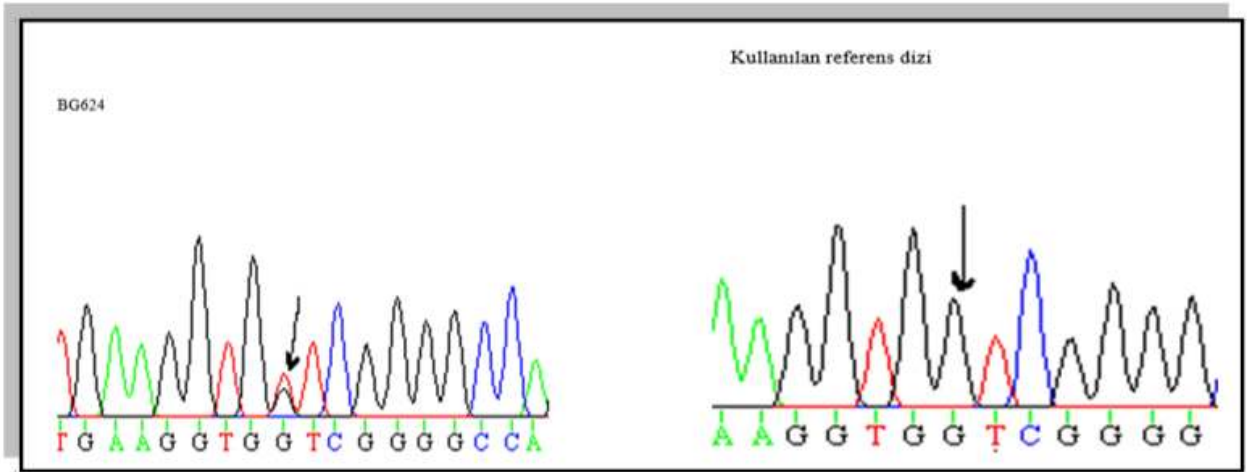
Çalışma gruplarında rs147083416 C>T Hardy- Weinberg dağılımından sapmadığı gösterildi ($p>0,5$). Tablo 22 ve 23’de gösterildiği gibi rs147083416 C>T SNP iki kontrol bireyde saptanmıştır ancak hasta grubu ve akraba grubunda saptanmamıştır (şekil 20). Tablo 23’de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).



Şekil 22. rs147083416 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları. GDNF ters iplikte olduğu için SNP'ler ters iplikte gösterilmiştir.

4.5.7. rs115322727 A>C SNP

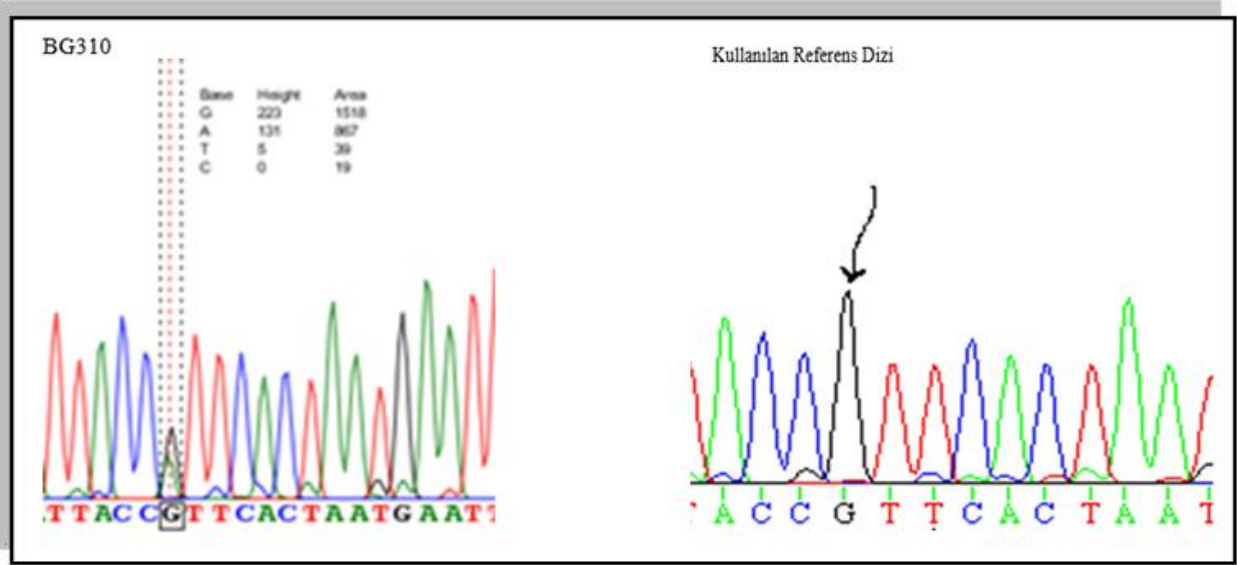
Çalışma gruplarında *rs115322727 A>C SNP* Hardy-Weinberg dağılımından sapmadığı gösterildi ($p>0.05$). Tablo 22 ve 23'de gösterildiği gibi rs115322727 A>C SNP bir kontrol bireyde saptanmıştır ancak hasta grubu ve akraba grubunda saptanmamıştır. Tablo 23'de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).



Şekil 23. rs115322727 SNP İçin Kullanılan Referans Dizi, Çalışmada Saptanan SNP'ler ve Denek Kodları.

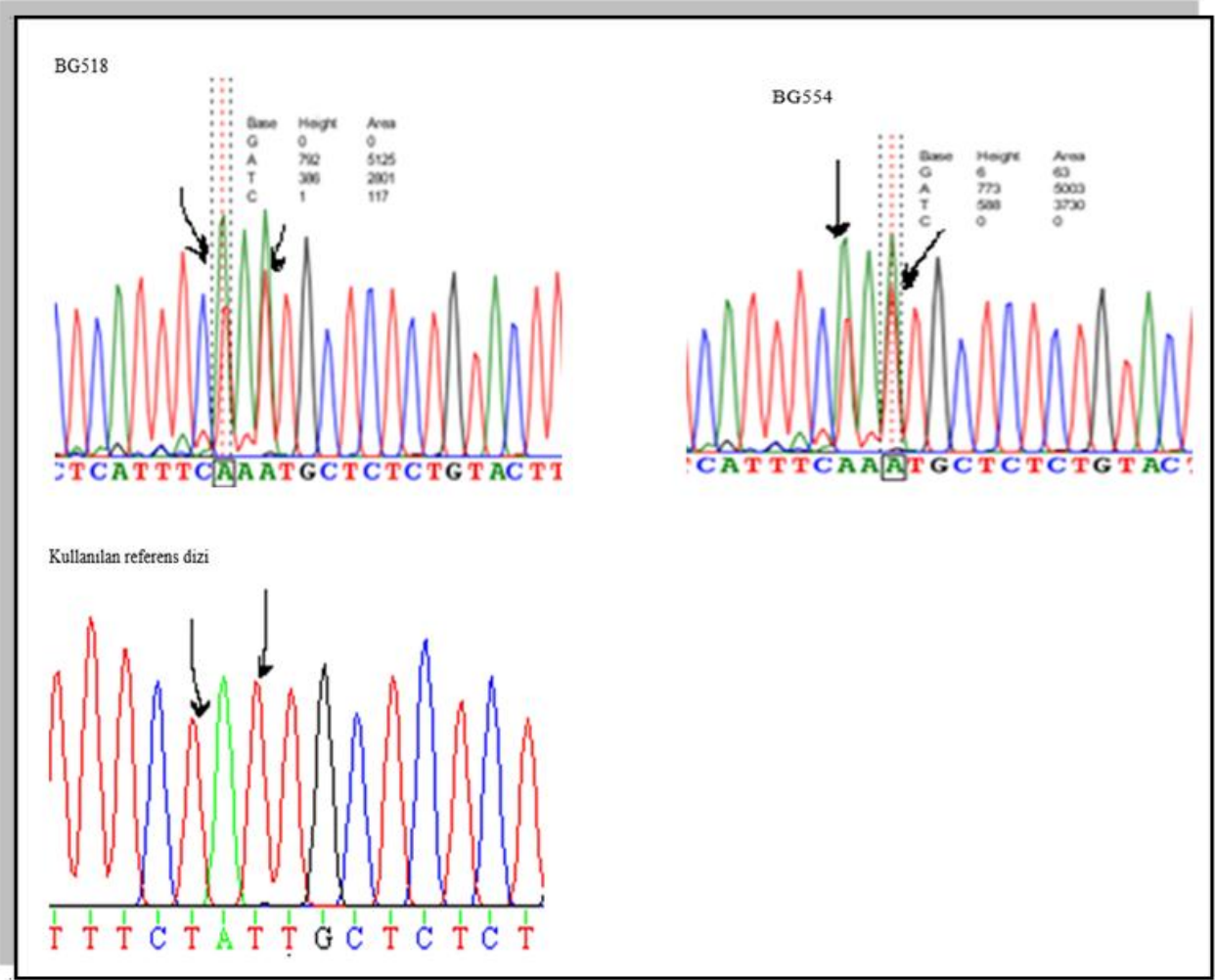
4.5.8. Çalışmada saptanan yeni SNP'ler

Çalışmamızın kontrol grubunda bir kişide (BG310) genomik DNA'nın 5:37814769 bazında G>A değişikliği saptandı. Bu SNP hasta grubu ve akraba gruplarında saptanmadı. Çalışma gruplarında bu SNP Hardy- Weinberg dağılımından sapmadığı gösterildi ($p>0.05$). Tablo 23'de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).



Şekil 24. BG310 Sağlıklı Gönüllüde Saptanan Yeni SNP ve Kullanılan Referans Dizi.

Bu çalışmanın hasta grubunda iki kişide (BG518 ve BG554) GDNF geninin 5:37812784 ve 5:37812782 bölgelerinde yeni SNP saptandı. Her iki kromozom yerleşiminde değişen T>A şeklinde idi. Bu SNP kontrol grubu ve akraba gruplarında saptanmadı. Çalışma gruplarında bu değişikliklerin Hardy-Weinberg dağılımından sapmadığı gösterildi ($p>0.05$). Tablo 23’de görüldüğü gibi gruplar arasında allel ve genotip frekansları anlamlı fark göstermedi ($p>0.05$).



Şekil 25. BG518 ve BG554 Hastalarda Saptanan Yeni SNP ve Kullanılan Referans Dizi. GDNF ters iplikte olduğu için SNP ters iplikte gösterilmiştir.

4.5.9. *MICU1* geninde saptanan mutasyon/SNP'ler

Şaşırtıcı olarak *MICU1* geninin kalsiyum bağlanma bölgelerinde ne bipolar hasta grubu ne sağlıklı gönüllü grubu ne de birinci derece akraba grubunda hiç bir SNP'ye rastlamadık. *MICU1*'in NCBI veri tabanında olan protein dizisileri *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Rattus norvegicus* ve *Homo sapiens* türleri arasında MUSCLE programı ile karşılaştırıldı (Şekil 26). Tüm protein bakıldığında türler arası *MICU1* proteinin amino asit dizisinde %55 korunduğu saptandı (273/490). kalsiyum bağlama bölgesi için *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Rattus*

norvegicus ve *Homo sapiens* arasında amino asit karşılaştırmaları birebir aynı aminoasitlerin (DLNGDGEVDMEE ve DCDGNGELSNKE) varlığını gösterdi.

Danio_reri	MyRLrALtAatvgmvqltRrhHtGafrSvqRRRLMEaAlaGvtgisASaGLmWtRAYAEa
Gallus_gal	MFRLrILpmaA-cLAaaSR-YHGaaahnpaReRLvvaAFiGttAVTASarLLwRAYAEd
Mus_muscul	MFRLNLSALA-ELAVGSRWYHGASQFTQtkRRLLMLVAFLGASAVTASTGLLWKkAHAES
Rattus_nor	MFRLNLSALA-ELAVGSRWYHGtSQFTQtkRRLLMLVAFLGASAVTASTGLLWKkAHAES
Pan_troglo	
Homo_sapie	MFRLNLSALA-ELAVGSRWYHGGSQFQIqRRRLMmVAFLGASAVTASTGLLWKRAHAES
Bos_taurus	MFRLNLSALA-ELAVGSRWYHGGSQFTQIqRRRLMmVAFLGASAVTASTGLLWKRAIAES
Canis_lupu	MFRLNLSALA-ELAVGSRcYHGGSQFTQIqRRRLMmVAFLGASAVTASTGLLWKRAIAES
Danio_reri	gsSVkh-eeqmreeeplKDvaEeaesdSalessseGedeDeagseEkKKKqRiGFRDRKVM
Gallus_gal	svnhdS-raepGekVKhreEGEessgdEGRRavAsGeeeah---seggKKKKCSGFRDRKVM
Mus_muscul	PPcVNskKpDteDKerNKDSeGvssrEGR---AAdaaaEP---YPEDKKKKRSGFRDRKVM
Rattus_nor	PPSVNskKtDaGDKGKSKDcrEvssHEGss---AAataaEP---YPEEKKKKSGFRDRKVM
Pan_troglo	
Homo_sapie	PPcVdNlKsDiGDKGKNKDEGdvCNHEkK---tAd--laP--HPEEKKKKSGFRDRKVM
Bos_taurus	PPSaNNiKseIGDKGKSKeEGEdCNaEkK---AAGvcIEP---YPEEKKKKSGFRDRKVM
Canis_lupu	PPSVNNlKneIGDKGKNKDEGEvcNHEkK---AAGvcIEP---HqEEKKKKSGFRDRKVM
Danio_reri	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKIINEhGdaEVyMTPQDFVRSITPNEKQPeNLGLDQfm
Gallus_gal	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVINEhGESEVFMTPQDFVRSITPNEKQPeNLGLDQfI
Mus_muscul	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVINEEgetEVFMTPQDFVRSITPNEKQPEHLGLDQYI
Rattus_nor	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVINEEgetEVFMTPQDFVRSITPNEKQPEHLGLDQYI
Pan_troglo	---mkRIyYrlakeIFk-----dTPk-----
Homo_sapie	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVIsEEGGeaEVFMTPeDFVRSITPNEKQPEHLGLDQYI
Bos_taurus	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVIsEhGESEVFMTPQDFVRSITPNEKQPEHLGLDQYt
Canis_lupu	EYENRIRAYSTPDKIFRYFATLKVINEEGESEVFMTPQDFVRSITPNEKQPeNLGLDQYt
Danio_reri	vKRYDGKDFWqKIsQdREKFADEdSIFYTLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Gallus_gal	vKRYDGKDFWqKIsQEREKFADEdSIFYaLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Mus_muscul	IKRFDGK----KIAQEREKFADEGSIFYaLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Rattus_nor	IKRFDGK----KIAQEREKFADEGSIFYTLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Pan_troglo	-----aPQRNFEIAFK
Homo_sapie	IKRFDGKt---EKIsQEREKFADEGSIFYTLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Bos_taurus	IKRFDGK----KIAQEREKFADEGSIFYTLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Canis_lupu	IKRFDGKt---EKIAQEREKFADEGSIFYTLGECGLISFSDYIFLTTVLSTPQRNFEIAFK
Danio_reri	MFDLNGDGEVDlEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKTGcCsSALTYYFFGADL
Gallus_gal	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKTGfn-SALTYYFFGADL
Mus_muscul	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Rattus_nor	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Pan_troglo	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Homo_sapie	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Bos_taurus	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Canis_lupu	MFDLNGDGEVDMEEFEQVQSIIRSQTSMGMRHRDRsTTGNTLKSGLC-SALTYYFFGADL
Danio_reri	KGKLTIsFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERnDPVDGRITEkQFGGMLLAYSgVQSRKLkqMQK
Gallus_gal	KGKLTIsFFLdFQQRKLQHDlLKLEFERHDPVDGRITERQFGsMLLAYSgVQSKKLTvm1K
Mus_muscul	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGRIsERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQr
Rattus_nor	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGRIsERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQr
Pan_troglo	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGRITERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQr
Homo_sapie	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGRITERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQr
Bos_taurus	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGRITERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQK
Canis_lupu	KGKLTIKNFLEFQQRKLQHDVCLKLEFERHDPVDGKiTERQFGGMLLAYSgVQSKKLTAMQK
Danio_reri	nLkrmFKDaqGltFeEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASlDKaTMkQVARTVAKVE
Gallus_gal	QLKKHFqDGeGLTFeEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Mus_muscul	QLKKHFkdGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Rattus_nor	QLKKHFkGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Pan_troglo	QLKKHFkGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Homo_sapie	QLKKHFkGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Bos_taurus	QLKKHFkGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Canis_lupu	QLKKHFkGKGLTFQEVENFFTFLKNINDVDITALSFYHMAGASLDKVTMqqVARTVAKVE
Danio_reri	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVlaIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLvrAMWKCAQdI
Gallus_gal	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVlaIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMAMWKCAQET
Mus_muscul	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Rattus_nor	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Pan_troglo	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Homo_sapie	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Bos_taurus	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Canis_lupu	LSDHVCDVVVFALFDCDGNELSNKEFVSIMKQRLMRGLEKPKDMGFTRLMQAMWKCAQET
Danio_reri	AWDFaMFKQq
Gallus_gal	AWDFtLPrp-
Mus_muscul	AWDFALPK--
Rattus_nor	AWDFALPK--
Pan_troglo	AWDFtLPKQ-
Homo_sapie	AWDFALPKQ-
Bos_taurus	AWDFALPKQ-
Canis_lupu	AWDFALPKQ-

Şekil 26. MICU1 proteinin amino asit dizisinin türler arası karşılaştırılması.

4.6. Çalışmada saptanan SNP'lerin minör allel frekansları

Çalışmada rs2075680 C>A SNP 12,45 minör allel frekansı ile en sık rastladığımız SNP oldu. Tablo 27'de belirtildiği gibi rs2075680 C>A SNP 1000 genom projesinin sonuçlarına göre bu değer Afrika, Amerika, Asya ve Avrupa kıtalarında sırası ile 42, 12, 21 ve 8 olarak gösterilmiştir(<http://www.1000genomes.org/>). rs62360370 G>A SNP 6,73 minör allel frekansı ile ikinci en sık rastladığımız SNP ve rs79669773 T>C SNP 4,71 minör allel frekansı ile üçüncü en sık rastladığımız SNP oldu.

Tablo 27. Saptanan SNP'lerin Çalışmada Hesaplanan ve 1000 Genom Projesinde Saptanan Minör Allel Frekansları

Saptanan SNP	% MAF				
	Çalışmada hesaplanan	Afrika	Amerika	Asya	Avrupa
2075680SNP C>A	12,45	42	12	21	8
rs79669773 T>C	4,71	0	2	0	2
rs62360370 G>A	6,73	1	5	0	9
rs142426358 T>C	0,33	0	1	3	0
rs147083416 C>T	0,67	0	0	0	0
rs78613670 C>T	0,67	0	0	0	2
rs115322727 A>C	0,33	11	2	0	0
5:37814769 G>A	0,33	-	-	-	-
5:37812784 T>A	0,67	-	-	-	-
5:37812782 T>A	0,67	-	-	-	-

4.7. GDNF geninde saptanan SNP'lerin bipolar bozukluğun başlangıç yaş üzerindeki etkisi:

GDNF geninin 5'yukarısı ve 3'UTR sinde SNP olan hastaların başlangıç yaş ortalaması 28.22 ± 9.94 ve SNP olmayan hastaları başlangıç yaş ortalaması 25.92 ± 10.62 olarak gösterildi. Yapılan t-testi sonuçlarına göre GDNF geninin 5'yukarısı ve 3'UTR sinde SNP olan hastalar ve SNP olmayan hastaların başlangıç yaş açısından anlamlı fark bulunmadı. rs142426358 T>C SNP saptanan bipolar hastası hastalığın belirtilerini 13 yaşında geliştirmiştir. 5:37812782 and 5:37812784 T>A değişikliği gösteren iki hastadan biri hastalığın belirtilerini 12 yaşında gösterdi.

5.TARTIŞMA

Çalışmamız “ bipolar bozukluğu olan hastalarda GDNF ve MICU1 genlerinde önemli SNP’ler olabilir ve bu SNP’lerin hastalık ile ilişkisi olabilir” hipotezi üzerine kuruldu. Bu hipotezi sınamak için GDNF yapımının denetiminde önemli olabilecek 5’ ve 3’ UTR değişimlerini ve MICU1 proteininin kalsiyum bağlama motiflerinin DNA dizi farklılıklarını araştırmayı hedefledik. Bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz GDNF geninin 5’yukarısı ve 3’UTR bölgeleri ile MICU1 geninin kalsiyum bağlanma bölgelerinin mutasyon/polimorfizm yönünden araştırılması ve eğer varsa, hastalıkla ilişkilerinin yorumlanmasını amaçladık.

Bu amaca yönelik Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına gelen bipolar bozukluk olan 66 olgu, 27 hasta yakını ve bipolar bozukluğu olmayan 56 sağlıklı gönüllü çalışmaya alındı. Birçok araştırmacının yaptığı gibi (Wang Z, 2013; Szczepankiewicz A, 2011) hasta grubunun oluşturulmasında bipolar bozukluğu dışında her hangi bir bedensel ve ruhsal hastalığı olmayan bireylerin seçilmesine özen gösterildi. Sağlıklı gönüllü ve birinci derece akraba grupları için bipolar bozukluğu ve herhangi belirgin hastalığı olmayan bireyler çalışmaya dâhil edildi. Sağlıklı gönüllü grubunun yaş ve cinsiyet olarak hasta grubu ile benzer olmasına dikkat edildi.

Grupları oluştururken bipolar bozukluğun tanısı için DSM IV-TR tanı kriterleri kullanılarak konuldu. DSM IV tanı kriterleri 1994 yılında APA tarafından geliştirildi. 2000 yılında DSM IV-TR olarak revize edildi ve o zamandan beri ruhsal hastalıkların tanımlanmasında kullanılmaktadır (APA, 1994; Phillips ML, 2013; <http://www.psychiatry.org>). DSM IV-TR genetik çalışmalarda da bir çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Weglarz M, 2011; Kelmendi B 2011; Wang Z, 2012).

GDNF, diğer nörotrofik faktörler gibi, hem nöral gelişim sürecinde hem de erişkin beyin hücrelerinin sağ kalım, plastisite ve rejenerasyonunda önemli rol oynar ve nöron toplumunun yeterli sayıda kalmasını sağlar. Bu nörotrofik faktörlerin azalması Huntington, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (Allen SJ, 2013). Yeni araştırmalar GDNF uygulamasının Parkinson tedavisi için etkin bir yöntem olabileceğini göstermekte (Nutt JG, 2003). GDNF gen tedavisinin parkinson hayvan modellerinde de etkili olduğu gösterilmiştir

(Kordower JH, 2013). Son zamanlarda araştırmacılar bipolar bozukluk görülen bireylerde plazma GDNF düzeyinin incelenmesine yoğunlaşmışlar ve periferik GDNF dolaşım düzeyinin hastalarda normal bireylere kıyasla değiştiğini belirlemişlerdir (Zhang X ve ark., 2010; Barbosa IG ve ark., 2011). Ancak GDNF geninin, özellikle genin ifadesini değiştirebilme potansiyelinde olan SNP'lerin bipolar bozukluk ile ilişkisi halen çalışılmamıştır.

Protein ve mRNA ifadesinin düzenlenmesinde işlev yapan en önemli elemanlar genlerin 5' yukarısı ve 3'UTR leri içinde bulunur. Genlerin 5' yukarısında yerleşmiş olan düzenleyici elemanlar gen ifadesini mRNA transkripsiyon kontrolü ile denetler. Bu elemanlar çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve RNA polimerazın bağlanması için dizi barındıran bölgelerdir. 3'UTR düzenleyici unsurları ise mRNA metabolizmasında görev alan elemanlardır (Andreassi C ve Riccio A, 2009).

GDNF ve MICU genlerinin hedeflediğimiz bölgelerini SNP/mutasyonlar yönünden incelenmesi için birçok araştırmacının da (Sharma R, 2013; Wan JP, 2013; Liu Y, 2013) kullandığı gibi PCR yöntemi ile bölgeleri çoğaltıp dizi analizi yapıldı var olan mutasyon/SNP'ler saptandı. Saptanan SNP/mutasyonları değerlendirmek amacı ile SHESIS programı kullanıldı (Shi YY ve He L, 2005).

Çalışmamızda GDNF geninde toplam on SNP saptandı. Bu SNP'lerden yedisi daha önce saptanmış olan ve veri tabanlarında mevcut olan ancak ilişkileri bipolar bozukluk ile değerlendirilmemiş SNP'lerdi. İlaveten üç SNP bu çalışmada ilk defa bulundu.

Bu çalışma bipolar bozukluk ve GDNF geni ile ilk ilişki çalışması olduğu için saptanan mutasyon/SNP'lerin bipolar bozukluk ile ilişkisi ilk defa yorumlanmaktadır.

Çalışmada en sık olarak saptanan SNP, GDNF geninin 5' yukarısında yerleşmiş olan rs2075680 C>A SNP idi. Adenin bazı 33 bireyde heterozigot olarak gözlemlenirken dört kişide homozigot olarak görüldü. A allelinin frekansı bu çalışmada % 12,45 olarak hesaplandı. 1000 genom projesinin sonuçlarına göre Afrika, Amerika, asya ve avrupa kıtalarında sırası ile %42, %12, %21 ve %8 olarak gösterilmiştir (<http://www.1000genomes.org/>). Türkiye Avrupa ve Asya kıtalarının her ikisinde de toprağı bulunan bir ülkedir ve etnik açıdan her ikisinin de özelliklerini taşımaktadır (Tümer S, 2007). rs2075680 C>A SNP' nin minör allel frekansının Avrupa ve Asya

kıtaları için hesaplanan MAF' in arasında olması 1000 genom projesinde hesaplanan MAF' lar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

rs62360370 G>A SNP %6,73 minör allel frekansı ile ikinci en sık rastladığımız SNP olarak saptandı. Bu SNP 1000 genom projesinde Afrika, Amerika, Asya ve Avrupa kıtalarında sırası ile %1,%5,%0,%9 olarak saptanmıştır (<http://www.1000genomes.org/>). Türkiye Avrupa-Asya geçişinde ve göç yolları üzerinde yer aldığından genetik açıdan her iki toplumunda özelliklerini taşımaktadır (Tümer S, 2007) ve rs62360370 G>A SNP sıklığı 1000 genom projesinin Avrupa ve Asya kıtalarının arasında olması toplum genetiğine uyulduğunu göstermektedir ancak Avrupa kıtasının MAF'ına yakın olması ilginçdir.

rs79669773 T>C SNP %4,71 minör allel frekansı ile üçüncü en sık rastladığımız SNP oldu. 1000 genom projesi rs79669773 T>C SNP sıklığını Asya kıtası için %0 ve Avrupa kıtası için %2 göstermiş (<http://www.1000genomes.org/>). Bizim çalışmada saptanan MAF'ın her iki kıta için gösterilen MAF'dan yüksek olması şaşırtıcıdır. 1000 genom projesinde Avrupa da en yüksek gösterilen MAF %3 olarak İtalyan toplumuna aittir. Dünya çapında bakıldığında şimdiye kadar saptanan en yüksek MAF %3 olarak Kolombiya ve Porto Rika ülkelerine aittir (<http://www.1000genomes.org/>).

Çalışmamızda rs2075680 C>A SNP nin bipolar bozukluk olan bireylerde anlamlı olarak sağlıklı bireylere ve birinci derece akraba bireylerine kıyasla daha az görüldüğü belirlendi. A alleli sağlıklı gönüllü bireylerde anlamlı olarak daha fazla bulundu (allel frekansı: 0.098 hastalarda ve 0.188 sağlıklı gönüllülerde). Bu nedenle bu çalışma C allelinin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde erkek hasta grubunda da erkek sağlıklı grubuna kıyasla rs2075680 C>A SNP daha az saptandı. Bipolar bozukluğun başlangıcı ve epizotlarında erkek ve kadın arası belirgin fark olduğundan (Arnold L, 2003; Kennedy N,2005; Diflorio A, 2010) bu çalışmanın bulguları genetik bağlantı çalışmalarının erkek ve kadın arasında ayrı gruplarda değerlendirmesinin faydalı olabileceği yönünde fikir vermektedir. Benzer şekilde, çalışmamızda saptanan diğer bir polimorfizm olan rs62360370 G>A SNP'si sadece erkek hasta ve erkek sağlıklı grup arasında farklılık göstermekteydi.

Çalışmada rs2075680 C>A SNP sağlıklı gönüllü kontrollerde hastaların iki katı ve erkek sağlıklı kontrollerde erkek sağlıklı gruba göre dört kat daha fazla görüldü. Benzer şekilde rs62360370 G>A SNP'nin genotip frekansı sağlıklı bireylerde hasta bireylerin dört katı kadar gösterildi. Bu bulgu rs2075680 C>A ve rs62360370 SNP lerin özellikle erkeklerde koruyucu SNPlar olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle bu SNP'ler daha sonraki çalışmalar için iyi aday konular olabilir.

Saptadığımız tek nokta değişikliklerden rs2075680 C>A SNP genin 5' yukarısında yerleşmektedir. Gerçi literatüre göre bu bölge tanımlanmış bir promotör bölge değilse de, promotör tanımlama programlarında GDNF için potansiyel promotör olarak belirtilmektedir. rs2075680 SNP'nin 95 baz yukarısında bir''TATAAA'' kutusu yerleşmektedir ayrıca glukokortikoid reseptör (GR) alfa ve beta için potansiyel yerleşim bölgeleri bu polimorfizmin yukarı ve aşağısında bulunmaktadır. Literatürde GDNF'nin glukokortikoid alfa ve beta ile kontrol edilmesi açısından bir çalışma olmamasına rağmen GR alfa'nın duygusal davranış ve bilişsel işlevleri düzenlediği (Tronche F, 1999) göz önüne alınırsa, rs2075680 C>A SNP'nin bipolar bozukluğu araştırmaları için yol açıcı olduğu söylenebilir.

Her ne kadar rs2075680 C>A SNP sağlıklı ve hasta grupları arasında özellikle erkek sağlıklı ve erkek hasta grupları arasında anlamlı farklılık göstermiş ise de, p değerinin çok küçük olmaması ve olasılıklar oranı için hesaplanan alt güven aralığının bire çok yakın olması bu SNP'nin bipolar bozukluk ile düşük ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bu SNP'nin kromozom yerleşimini (GDNF geninin 5' yukarısı ve ''TATAAA'' kutusuna yakınlığı) göz önüne aldığımızda bipolar bozukluk çalışmaları için güçlü bir aday olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda GDNF geninin 3'UTR'sinin miRNA homoloji bölgelerine ilişkin sadece bir SNP saptandı. rs142426358 SNP sadece erken başlangıçlı bipolar bozukluk saptanan bir hastada gözlemlendi. rs142426358 SNP'nin yerleşim bölgesinin hsa-mir-216a ile komplementer dizilim barındırması bu miRNA'nın potansiyel bir GDNF düzenleyicisi olabileceğini düşündürdü (Maragkakis, 2009).

Erken ve geç başlangıçlı bipolar bozukluk klinik bulgular ve ailesel risk açısından farklılık göstermektedir ve bipolar bozukluğun farklı alt şekilleri olarak değerlendirilebilirler (Schurhoffa,

2000; Carlson GA), ancak bu çalışmada GDNF ekspresyonunun potansiyel olarak düzenlendiği bölgelerde saptanan SNP'ler ile başlangıç yaş arasında ilişki saptanamadı.

Çalışmamızda, denek gruplarının küçük olmasına rağmen saptanan değişikliklerin Hardy-Weinberg dağılımından sapmadığı çalışmanın güçlü olduğunu göstermektedir. Ayrıca tüm anlamlı fark gösteren değişiklikler için olasılık oranları ve güven aralıkları hesaplanıp hepsi bir arada dikkate alınmıştır. Üstelik bu çalışmanın grupları etnik olarak homojen seçilmiştir.

Tüm bulgular göz önüne alındığında, bipolar bozukluk ve GDNF geninin potansiyel düzenleyici bölgeleri arasında olası ilişki olabileceği kanısına varılmıştır. Ancak GDNF değişiklikleri ve bipolar arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için farklı etnik gruplarında ve daha çok sayıda denek ile çalışmak gerekmektedir.

Çalışmamıza MICU1 geninin kalsiyum bağlanma bölgelerinde hiç bir SNP saptamadık. SNP veri tabanlarında da bu bölgelerde SNP'ye rastlamadık. MICU1 geninin kalsiyum bağlanma bölgesinin türler arasında aynı aminoasit dizisi barındırdığı bu proteinin güçlü bir şekilde evrim sürecinde korunduğunu ve yaşamsal olarak çok önemli olduğunu göstermekte olup bu bölgedeki değişikliklerin ölümcül olduğunun kanıtıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amaçları bipolar bozukluğu olgularında GDNF geninin, 5'yukarısı ve 3'UTR bölgesinde mutasyon/polimorfizm yönünden araştırılması ve hastalıkla ilişkisinin yorumlanmasıydı. Bu amaçlara yönelik 66 kişi bipolar bozukluk tanısı konulmuş, 56 kişi sağlıklı gönüllü ve 27 kişi birinci derece akrabasının DNA'sı ilgili bölgelerde DNA dizi analizi ile incelendi. Sonuç olarak saptanan 10 SNP'den 1'inin allel frekansı hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark gösterdi. Şaşırtıcı olarak bu fark sadece erkek bireylerde istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi. Diğer bir anlamlı fark erkek gruplar arasında çalışmada saptanan başka bir SNP'de görüldü. Bu sonuç bipolar bozukluğun cinsiyet farkını dikkate alınca bipolar bozukluk genetik çalışmalarında erkek ve kadın grupların ayrı ayrı değerlendirilmesi bu hastalığın etiyolojisinin açıklanmasında yardımcı olacağının kanıtıdır.

Hastalık ilerledikçe ve hasta tedaviye başladıktan sonra GDNF ifadesinin değişebileceğinden dolayı genin ifadesini bipolar bozukluğu olan, tedavi almamış ve yeni hasta olan beyin dokusunda bakmak mantıklı bir yaklaşımdır, ancak bu koşulları barındıran beyin dokusu bulmak nerdeyse imkânsız olduğundan hipotezimizi sadece GDNF'nin 3'UTR ve 5'yukarısında GDNF'nin ifadesini değiştirebilme kapasitesinde olabilen SNP'lerin varlığı ve hastalıkla ilişkili olduğu üzerine kurduk. Sonuç olarak geninin 5'yukarısında bipolar bozukluk ve hasta grubun arasında özellikle erkek gruplar arasında allel frekansının anlamlı farkı olduğunun ve 3'UTR de ki bir SNP'nin genotip frekansı erkek gruplar arasında farklı olduğundan çalışmanın hipotezini kabul edilmiştir.

Çalışmanın devamında bu SNP'lerin GDNF kan ve mRNA düzeyleri ile karşılaştırılması yol gösterici olabilir. Ayrıca bu önemli bulduğumuz SNP'ler farklı etnik gruplarda ve daha büyük gruplarda araştırılıp ve hastalık ile ilişkisinin araştırılması yapılabilir. SNP'lerin bipolar bozukluk ile ilişkisi olup olmadığına trans genetik olarak değiştirilmiş hayvanlarda incelenmesi çok iyi sonuçlar verebilir.

Bu çalışmada MICU1 geninin kalsiyum bağlanma bölgelerinde bir SNP'ye rastlamadık. Sonuç olarak MICU1 geninin kalsiyum bağlanma bölgeleri bipolar bozukluğunun gelişiminde rolü yoktur diyebiliriz. Yine de bu genin kalsiyum homeostazı için önemli olduğu ve bu genin

bulunduğu kromozom bölgesinin daha önceki bağlantı çalışmalarında bipolar bozukluk ile ilişkisi olduğunun saptanmış olması nedeniyle, MICU1 geninin diğer bölgelerinde de SNP taranması sonraki çalışmalar için önerilir.

7.KAYNAKLAR

Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat. Rev. Neurosci 2002;3: 383–394.

Alaerts M, Del-Favero J. Searching genetic risk factors for schizophrenia and bipolar disorder: learn from the past and back to the future. Human Mutation 2009; 30: 1139-1152.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU ve ark. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. Pharmacol Ther. 2013;138:155-75.

Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. Trends Cell Biol. 2009;19:465-74.

Andreasen NC, Rice J, Endicott J, Coryell W ve ark. Familial Rates of Affective Disorder. A Report from the National Institute of Mental Health Collaborative Study. Arch Gen Psychiatry 1987;44: 461-469.

American Psychiatric Association (APA). DSM-IV-TR Official Site (<http://www.psychiatry.org>)

American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision (DSM-IV-TR) 4th Edition, Washington DC. 1994.

Arnold LM. Gender differences in bipolar disorder. Psychiatr Clin North Am. 2003;26:595-620

Barbosa IG, Huguet RB, Sousa LP, Abreu MN ve ark. Circulating levels of GDNF in bipolar disorder. Neurosci Lett. 2011;502:103-6.

Barnett J ve Smoller J. The Genetics of Bipolar Disorder. Neuroscience 2009;164: 331-343.

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M ve ark. Integrative Genomics Identifies MCU as an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Nature* 2011; 476:341-345.

Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:686-700.

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal Volume Reduction in Major Depression. *The American Journal of Psychiatry* 2000;157:115–118.

Burton N. A Short History of Bipolar Disorder. *Hide and Seek*; 2012 (<http://www.psychologytoday.com>) 2013-08-21

Caetano SC, Kaur S, Brambilla P, Nicoletti M, Hatch JP, Sassi RB, ve ark. Smaller Cingulate Volumes in Unipolar Depressed Patients. *Biological Psychiatry* 2006;59: 702–6.

Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced Glial Cell Density and Neuronal Size in the Anterior Cingulate Cortex in Major Depressive Disorder. *Archives of General Psychiatry* 2001;58: 545–53.

Craddock N, Sklar P. Genetics of bipolar disorder. *Lancet* 2013; 11: 1654-62.

Daban C, Colom F, Sanchez-Moreno J, García-Amador M, Vieta E. Clinical correlates of first-episode polarity in bipolar disorder. *Compr Psychiatry*. 2006;47:433-7.

Diflorio A, Jones I. Is sex important? Gender differences in bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry* 2010;22:437-52.

Drevets WC, Price JL, Simpson Jr JR, Todd RD, Reich T, Vannier M, ve ark. Subgenual Prefrontal Cortex Abnormalities in Mood Disorders. *Nature* 1997;386:824–7.

Fagiolini A, Goracci A. The Effects of Undertreated Chronic Medical Illnesses in Patients with Severe M disorders. *J Clin Psychiatry* 2009; 70: 22-29.

FarreD, Roset R, Huerta M, Adsuara JE ve ark. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3651-3.

Fiedorowicz J, Palagummi N, Forman Hoffman V, Miller D ve arkadaşları. Elevated prevalence of obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors in bipolar disorder. *Ann Clin Psychiatry* 2008;20: 131–137.

Geller B, Tillman R, Bolhofner K, Zimmerman B ve ark. Controlled, Blindly Rated, Direct-Interview Family Study of a Prepubertal and Early-Adolescent Bipolar I Disorder Phenotype Morbid Risk, Age at Onset, and Comorbidity. *Arch Gen* 2006;63: 1130-1138.

Gershon ES, Hamovit J, Guroff JJ, Dibble E ve ark. A Family Study of Schizoaffective, Bipolar I, Bipolar II, Unipolar, and Normal Control Proband. *Arch Gen Psychiatry* 1982;39: 1156-67.

Goldberg J, Harrow M. Consistency of Remission and Outcome in Bipolar and Unipolar Mood Disorders: a 10-year Prospective Follow-up. *Journal of Affective Disorders* 2004 ;81:123–131.

Goodwin FK, Jamison KR. Manic Depressive Illness. *Psychological Medicine* 1991; 21 803-803.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:D109-11.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A ve ark. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006 1;34:D140-4.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:154-8.

Grigoriu-Serbanescu M, Martinez M, Nöthen MM, Grinberg M ve ark. Different Familial Transmission Patterns in Bipolar I Disorder with Onset before and after Age 25. *Am J Med Genet.* 2001;105: 765-73.

Heun R, Maier W. The Distinction of Bipolar II Disorder from Bipolar I and Recurrent Unipolar Depression: Results of a Controlled Family Study. *Acta Psychiatr Scand* 1993;87: 279-84.

International Classification of Diseases (ICD), World health organization
<http://www.who.int/classifications/icd/en>.

Işık E. Depresyon ve Bipolar Bozukluklar.2003;1.Baskı, Ankara, Görsel sanatlarYayınevi, s:467-483

Judd LL, Akiskal HS. The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. *Journal of Affective Disorders* 2003;73: 123–131.

Kato T. Molecular Genetics of Bipolar Disorder and Depression. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007;61: 1–17.

Kelmendi B, Holsbach-Beltrame M, McIntosh AM, Hilt Lve ark. Association of polymorphisms in HCN4 with mood disorders and obsessive compulsive disorder. *Neurosci Lett*. 2011;496:195-9.

Kendler KS, Pedersen NL, Neale MC, Mathe A. A Pilot Swedish Twin Study of Affective Illness Including Hospital and Population Ascertained Subsamples: Results of Model Fitting. *Behav Genet* 1995;25: 217-232.

Kennedy N, Boydell J, Kalidindi S, Fearon P ve ark. Gender differences in incidence and age at onset of mania and bipolar disorder over a 35-year period in Camberwell, England. *Am J Psychiatry*. 2005;162:257-62.

Kesebir S, Gençer. Bipolar Disorder and Diabetes Mellitus. *CURRENT APPROACHES IN PSYCHIATRY* 2010;2: 66-74.

Kessler R, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas K ve arkadaşları. Lifetime prevalence and age-of-onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 62: 593-602.

Kieseppa T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J and Ark. High Concordance of Bipolar in a Nationwide Sample of Twins 2003;161: 1814-1821.

Kordower JH, Bjorklund A. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28:96-109.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:152-7.

Kupfer D. The Increasing Medical Burden in Bipolar Disorder. *JAMA* 2005;293:2528-2530.

Lee K, Kunugi H, Nanko S. Glial cell Line-Derived Neurotrophic Factor GDNF/gene and Schizophrenia: Polymorphism Screening and Association Analysis. *Psychiatry Research* 2001;104: 11_17.

Ledda F, Paratcha G, Sandoval-Guzman T, IbanezCF. GDNF and GFRalpha1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nat. Neurosci* 2007;10: 293–300.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S ve ark. GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. *Science* 1993;260: 1130–1132.

Lin LF, Zhang TJ, Collins F, Armes LG. Purification and Initial Characterization of Rat B49 Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *Neurochem* 1994;63: 758–768.

Liu Y, Zan L, Li L, Xin Y. Proopiomelanocortin gene polymorphisms and its association with meat quality traits by ultrasound measurement in Chinese cattle. *Gene* 2013;529:138-43.

Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, Chandramoorthy HC ve ark. MICU1 is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediate Mitochondrial Ca²⁺ Uptake That Regulates Cell survival. *Cell* 2012;151: 630-644.

Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M ve ark. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009;295:1-10.

Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P ve ark. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:273-6.

McGuffin P, Rijsdijk F, Andrew M, Sham P ve ark. Combined Analysis from Eleven Linkage Studies of Bipolar Disorder Provides Strong Evidence of Susceptibility Loci on Chromosome 6q and 8q. *Am J Hum Genet* 2005;77: 582-595.

McIntyre RS, Nguyen HT, Soczynska JK, Lourenco Mt ve ark. Medical and Substance-related Comorbidity in Bipolar Disorder: Translational Research and Treatment Opportunities. *Dialogues Clin Neurosci* 2008; 10: 203-213.

Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O ve ark. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 2002;18:333-4.

Murray CJ L, & Lopez AD. Alternative Projections of Mortality and Disability by Cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349: 1498–1504.

Murray CJ L, & Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349, 1436–1442.

Nibuya M, Takahashi M, Russell DS, Duman RS. Repeated Stress Increases Catalytic TrkB mRNA in rat Hippocampus. *Neuroscience Letters* 1999;267: 81–4.

Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J ve ark. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003;60:69-73.

Ongur D, Drevets WC, Price JL. Glial Reduction in the Subgenual Prefrontal Cortex in Mood Disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95: 13290–5.

Oppenheim RW, Houenou J, Johnson JE, Lin L ve ark. Developing Motor Neurons Rescued from Programmed and Axotomy-induced Cell Death by GDNF. *Nature* 1995; 373:344-346.

Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y ve arkadaşları. Altered Expression of Neurotrophic Factors in Patients with Major Depression. *Journal of Psychiatric Research* 2008;42: 1145–1153.

Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, Steinkasserer A ve ark. T. The Gene Coding for Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Maps to Chromosome 5p12-p13.1. *Genomics* 1995;28: 605-607.

Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM ve ark. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 2003; 73(1):49-62.

Simavi V. *Klinik Psikiyatri* 2004;Ek1: 41-44.

Pan S, Ryu S, Sheu S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. *Sci China Life Sci* 2011;54 (8):763-769.

Phillips ML, Kupfer DJ. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. *Lancet* 2013;381:1663-71.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, ve ark. Morphometric Evidence for Neuronal and Glial Prefrontal Cell Pathology in Major Depression. *Biological Psychiatry* 1999;45: 1085–98.

Rosa AR, Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM ve ark. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2006 23;407:146-50.

Roy-Byrne P, Post RM, Uhde TW, Porcu T ve ark. The longitudinal course of recurrent affective illness: life chart data from research patients at the NIMH. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1985;317:1-34.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.

Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 2003 Oct 1;116(Pt 19):3855-62. Ruzickova M, Slaney C, Garnham J, Alda M. Clinical Features of

Bipolar Disorder With and Without Comorbid Diabetes Mellitus. *Can J Psychiatry* 2003;48: 458-461.

Sharma R, Ahlawat S, Maitra A, Roy M ve ark. Polymorphism of BMP4 gene in Indian goat breeds differing in prolificacy. *Gene* 2013. doi: 10.1016/j.gene.2013.08.086.

Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression Duration but not Age Predicts Hippocampal Volume Loss in Medically Healthy Women with Recurrent Major Depression. *Journal of Neuroscience* 1999;19: 5034–43.

Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005;15:97-8.

Siegel G, Albers R, Brady S, Price D. Basic neurochemistry, Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology, seventh Edition, Canada, Elsevier academic press, 2006,887961.

Smith DJ, Whitham EA, Ghaemi SN. Bipolar Disorder. *Handb Clin Neurol* 2012;106: 251-63.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and Glucocorticoids Affect the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 mRNAs in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 2005;15: 1768–77.

Smoller JW, Finn CT. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003;123: 48-58.

Somanath CP, Jain S, Reddy YC. A Family Study of Early-onset Bipolar I Disorder. *J Affect Disord* 2002;70: 91-4.

Souza RP, Romano-Silva M, Lieberman J, Meltzer H ve ark. Genetic Association of the GDNF alpha-receptor Genes with Schizophrenia and Clozapine Response. *JPsychiatr Res* 2010;44: 700-706.

Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A ve ark. Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2011;134:138-44.

Tadafumi K, Kakiuchi C, Iwamoto K. Comprehensive Gene Expression Analysis in Bipolar Disorder. *Can J Psychiatry* 2007;52: 763–771.

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P ve ark. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* 1999;23:99-103.

Tümer s. kalıtsal ve non-sendromik işitme kaybı olgularının aday lokuslarındaki mutasyonel analizi. Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıbbi Biyoloji ve Genetic Anabilim dalı. yüksek lisans tezi 2007.

Wang HJ. Calbindin-D28K expression induced by glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons dependent on PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway *Eur. J. Pharmacol* 2008;595:7-12.

Wan JP, Zhao H, Li T, Li CZ, Wang XT, Chen ZJ. The Common Variant rs11646213 Is Associated with Preeclampsia in Han Chinese Women. *PLoS One.* 2013 Aug 19;8:e71202. doi: 10.1371/journal.pone.0071202.

Wang X. Structural Studies of GDNF Family Ligands with Their Receptors-Insights Into Ligand Recognition and Activation of Receptor Tyrosine Kinase RET. *Biochim Biophys Acta* 2012;12: 1570-9639.

Wang Z, Fan J, Gao K, Li Z ve ark. Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) gene associated with treatment response to mood stabilizers in patients with bipolar I disorder. *J Mol Neurosci.* 2013;50: 305-310.

Wang Z, Li Z, Chen J, Huang J ve ark. Association of BDNF gene polymorphism with bipolar disorders in Han Chinese population. *Genes Brain Behav.* 2012;11:524-8.

Yang SY, Liao YT, Liu HC, Chen WJ ve ark. Antipsychotic drugs, mood stabilizers, and risk of pneumonia in bipolar disorder: a nationwide case-control study. J Clin Psychiatry 2013; 74:79-86.

Yoong F, Wan G, Too H. Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor and Neurturin Regulate the Expressions of Distinct miRNA Precursors Through the Activation of GFRa2. J. Neurochem 2006;98: 1149–1158.

Zhang X, Zhang Z, Sha W, Xie C ve ark. Effect of treatment on serum glial cell line-derived neurotrophic factor in bipolar patients. J Affect Disord. 2010;126:326-9.

8.EKLER

Ek-1: Genetik çalışma –Hastalar ve Birinci Derece Akrabalar için Bilgilendirilmiş Olur Formu

Ruhsal bozuklukların ortaya çıkmasına yol açan etmenler henüz tam anlaşılamamıştır. Ancak bazı genetik ve çevresel etmenlerin rol aldığı bilinmektedir. BDNF (Beyinden köken alan sinir hücresi yapılandırıcı madde) ve GDNF (Gliadan köken alan hücre yapılandırıcı madde) serum düzeylerinin araştırıldığı bu çalışmada, ileride genetik analizler yapılmak üzere ayrı bir tüpe 5 cc kan alınacak, bipolar bozukluğu ile ilgili genler araştırılacaktır. Analiz sonrası kanlar imha edilecektir.

Bu işlemin kan alınması dışında sizin üzerinizde hiçbir etkisi olmayacaktır. Kan alınması sırasında en sık görülen yan etkiler, kolunuzda iğne yerinde ağrı ve morarmadır.

Yapılan çalışma şu anda hastamıza veya size herhangi bir klinik yarar sağlamayabilir, ancak uzun vadede yakınlarınızın hastalığıyla ilgili elde edilebilecek sonuçlar yeni tedavi yöntemleri ve koruyucu önlemlerin geliştirilmesi amaçlı yarar sağlayabilecektir.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak, veriler ve size ait bilgiler gizli tutulacaktır. Araştırma sonuçlarının bunun dışında başka bir amaç için kullanılması kesinlikle söz konusu değildir. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Bu çalışmanın tümüne ya da bir kısmına katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahipsiniz. Bu çalışmaya katılmamanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız yakınınızın daha sonraki tıbbi bakımını etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, gereklilik ortaya çıkarsa olguyu araştırma dışı bırakabilir.

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

Hastanın:

Veli ya da Vasisinin:

Araştırmacının:

Adı

Adı:

Adı:

Soyadı:

Soyadı:

Soyadı:

Tarih:

Tarih:

Tarih:

İmza:

İmza:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin:

Adı:

Tarih:

Soyadı:

İmza:

Ek-2: primerlerin DNA dizisi üzerineki yerleşkesi

GDNF geninin 3'UTR bölgesi:

CCCATCGCCTTTGATGATGACCTGTCGTTTTTAGATGATAACCTGGTTTACCATATTCTA
AGAAAGCATTCCGCTAAAAGGTGTGGATGTA TCTGACTCCGGCTCCAGAGACTGCTGTGT
ATTGCATTCCCTGCTACAGTGCAAAGAAAGGGACCAAGGTTCCCAGGAAATGTTTGCCCAG
AATGGAAGATGAGGACCAAGGAGGCGGAGGAGGAGGAAGAAGAAGAGGAGGAGGAGGAGG
AGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCAGCCATCATGGGAGCCTGGTAGAGGGAGATCCAGCTA
CAGACAACCTGGACAGGAGAGAGAGAAAAACAGCCCTCTGGATTCTCCAGGATGGCAGCCGA
TGTCACTAGAAGCTCAGGGCTGATGTTCCCTGGTTGGCTATTGCCACCATTTCAGCTGATA
CAGTCCACCATCACTGATTACCGGCGCGGTTGCGGTGGATGCACTTGAACCAAACAGTG
TATCTCCTGTGATTTGTTTCATGTGTCCGAAGACACCAGGAAACAGAGATCCTGGTGT
TGTTCCCTTGTTATTACGTTTTACTGCTGAAAGTAAGAGGTTTATTTTTCTGTCACTCAGT
GGAGACATACCCTGGAAAGGAGAGGGGAAAAAAAAAAGCAAAGATACAAGAGATAATCACC
TTTGCATTTGAAAGTTGAGGCCCGAGGTTTACTACAACCAGCATTTTTGCCAACGGTTGG
TGATTGATTTCATCACGGTGTGTGGGGTGGGAAGAAGTTGGCTAGGAACCAAAAAGGCT
GTGCTCATGATTAAACACAAACCTGAAGGTATTTCCCTTTATGTCCTTGGAACAGGAAAC
GAGTTGTGGTTTTTCGCCAGCATTCTTGTAGGAGAGAATCGGGGAAGGCCCCGAAGTGGCC
CCGGGCAGGGAGAGCCCCCTCAGGCCTGTTGGTTTACAGAGAGACAGATGTTACATAACCA
GCTCCGTTGATGCGTGGTCACCAGTGACCAGAGAAGCTACTCGATGCAATGCATCTGTTT
CAGATACAGAAATATAGAGAAGATATTTATTGAAATTTAAGTTATTGTTATTTATTACCG
TTCACTAATGAATTTCTCTTTTTTCCCTTATTTATTAAAGTTTCTTTTCAAAGGTGCCAA
AGTATATGTGCTCGCAAAATGCAAAGAAAGGTGACAAAAGGAAATTTGAATTGGGAACAA
GGGTCCATGCTTTTCAAAGTATTAAAAAGTTTTTTGCCAGGCAAAAATCACTTACTTTAC
CTTTTTAAGAAAATTTGTCATTAATTTTCCCAGATTTTCCCAATTTTAT
TTGTGGAGCATCTCAGGCAAGCCCCCTTTCCTGGAGCAGCGTGCAGAGACCACTGGCACT
TGACTTTATTCTTCCTTGCTCCATTGCTGAACAGAAATGTCGTGGGCTCCACTTCCTGT

TGTCTTTAAGCTCTTAGTCCCCTCCACGTATACCTATCTGTACTATGCATAACCATATGT
 AGAAAAGGTTTCAGTTCCTTTTAGTA~~GGTAGTCCTGGATTTAATGCTG~~ACCTAAAAGTAAT
 GTCGACAATGCTGTCAGGTAGCTGCCGTTCTACCGACTCCCTCCATCCCTGCCCACCCAC
 TGCCCTCCCGAGAATATGCTGGCTGCCAGTGCAGCCCGGGAGACACAGGGGCCTTCCAG
 AGGTAGGGTCTACCAGGTCCTGTACAACCCCTGGGCTGTCACCGGGGGTCAACAGCTGCT
 GCTCCTATAT~~ACCCAAACACCTGACAGCTC~~CCTGGGGAGCAGATGGCTGAGAAGGGTGCT
GAGGAAGCCATATTGGGACCAGCCACAGCCACACACATGGAGCCTCATACTTAGGAGCGT
 GCTGCCTTTAAATGAAGGTGGTCGGGGCCAGTGCAGCGGCTCACACCCATAATCCCAACA
 CTTTGGAAGCCAAGGTGGGAGGATCTCTTGAACCCAGGAGTTTGAGACCAGCTTGGGCA
 ACATAGGGAGACCCTGTCTCTACAGAACTTTAAAAATTAGGCAGGCATGATGGTGCACA
 CCTGTGGTCCCAGCTACTCAAGAGGCTGAAGGAGGATCACTTGAGTCCAGAAGGTCGAGG
 CTGCAGTGAGCTGTGATCATGCCACTGCACTCCAGCCTAAGTGACAGTGCGGTACCCTGT
 CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGGTTGGAGCAGGAGGAAGCATAGGGGCGGGAA
CAGCCACCTCCTCCATGCCCTAGATTGTGAATTTATCGGGCAGCCAACACATGTATGACA
 CACTAGGCCCTGTATTACAGCTTGTTACGCATTTTCATAAAAGGGATTTTCATTAAGGAGA
 TAATCTATTACTACCTACCTTAGTGGCTACTAGTATAAACTATGACAGATTTAGCAATT
 AAAT~~GAAATACTGGCCTCCATCA~~AATAATCATAGTAACAAGAAGCAGCAGTTACCAGACA
 TCTGATCCCCTTCCCCCAAATACCCAAATTCTTCATGGTTCTGCCCTTCTCTGTCCTTT
 CTGCTCCCCTTGCTCGCCTGGGAAATGGAGGA~~AAGGCCTTCCCTCTCACAC~~TGTCTTGGG
 ATCTTGCTGAGAATTCAGACTGCTCGAAACAGTGACAAACCCAGCCATCCAGTCATTCTG
 TGGAGCACAATTTGGATGTGGCCCCAGGGGCATCTGTCCCATTCAGAGAACCTTGGCAGT
GCGATGGCCACTGTTCCCAGGCTTCAACCTCAGTGACCCCCCAACAACCTCCCCATGGA
 GAGTCCCTGCCCAAAAAAGCTGTAGGATCCAAGGGGTGTCAATAGCTCGTTCCCGGCATC
 ACCTACACACCACAAGCAGGTTTTAATGGAAGCAAGTTGCTCCACCAAATCCACAAAAGG
GTAAAGTTTGTGATTTTTCTTTATCATTGCGATCACCATCTGATACCGTAAGGAGTGCAC
TTGTTTGGAAGTTCTGACTTCTCTGATCTGTCTTGGTCGTTTGTTATAAAACCAAAGT

TCTCTACAGACTTTATTTTTGTACAATATCATTTTGTAACTTTTTACAAATAAAAACTCA
TTTCTATTGCTCTCTGTACTTCTGTACTTCCTTGCATGCACTGGGCCAGGCAGCCATCCA
CAAGTATTTCTTAGGAATCACCCCCTTCTTACCACACAGCCCACTGGATGGTCAGTGGCC
TTGCCTATCAACTCCCAGCAACCAATCACCCACTCAGGAGGGACAAAACCTTGCAAAATTG
TTCTTATTCATTCAACAAACCCTTATGGTGTGCCTACACTGTGCCAGGCACTGTTCTCTGG
CACCAGGGCTCTAATGGTGACCAAAGCAAAAACCGCTGTCCTCCTGGAGTTATTTTATTT

GDNF geninin 5'yukarısı

GATTACAACAGCATGAAAAATGGAGCCTAGGACTGAGGAGCCGGCCAGCCTCAGAAGCCTT
CTTCATTGCCTGCCATGTAATACATGATATGCAAAGCCTCTGACTTCAGCCAGCAGATAT
TTGGAGACCGTGTTGGCCTTAGCATGGGGACTAAACTAATGTGTGTTTAGGTCAGAAAGC
GAATCAGAAAAGCCACTGGAGGGCACGTCACGGAGTGAGAGCCCTATATAATTTCATCCCCA
CTCGCAGCGTCCCCTGGCAAATACTCGGCTTCCCTCACCCGGCCGCTCCGCACCTCTCCT
TCTCGGTGCTAGAACTCCGGCCGGCAGCTCCTTTTCTCGCCACTGCCTCCTGCCCTGCGG
AGAAGCGAGAGGGCGAGACACCCGAGCGGGAAGGCCGGCCTTCGACAGGCGCGAGGAAAG
CCCGGCGCTGCCCTGCACCGGCAGAGCGCCACCCTCCCAGTGCGGCGCGCGGGGGCAAAG
CCCGGCGCGGGCGCCGCGGTCAAGTTCGGATTGCCCTTTCGGCTGGCCCGCGCAGAGCG

EK-3: Etik kurul onayı

KARAR BİLGİLERİ		Karar No:2011/05- 11	Tarih:25.02.2011		
Prof.Dr.Meral SAKIZLI'nın sorumlusu olduğu "Bipolar Bozukluk (BD) Olgularında GDNF (glia kökenli nörotropik faktör) ve CALHM1 (kalsiyum homeostaz düzenleyici faktör) Genlerinin SNP (Polimorfizm) ler Yönünden İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÖSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D. Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÖTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Meltem Kurtlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ö Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

ADI SOYADI Roghaiyeh Safari

TC Kimlik No / Pasaport No:	R14164337
Doğum Yılı:	1974
Yazışma Adresi :	
Telefon :	0554 884 68 86
Faks :	
e-posta :	safaritabriz@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

İlke	Üniversite	Fakülte/E nstitü	Öğrenim Alanı	De rece	Mezuni yet Yılı
İran	Tabriz Tıbbi Bilimler Üniversitesi	Ebelik	Anne çocuk sağlığı	Bir incilik	2002
İran	Tabriz Tıbbi Bilimler Üniversitesi	Ebelik	Ebelik	Bir incilik	1996

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	İlke	Ş ehir	Bölüm/ Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Marand Azad Üniversitesi	İran	Marand	Ebelik	Öğretim görevlisi	2002- 2004

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
---	--

Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamam lanan	D evam Eden
	Yü ksek Lisans		
	Dok tora		
	Uz manlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Phylogenomic Analysis of Mitochondrial Calcium Uptake Molecules. Roghaiyeh Safari, Meral Sakızlı, Innovation in health 16-17 May 2013, Dokuz Eylul University, Izmir Turkey.
Novel mutation at the potential regulatory site of GDNF locus in Turkish population with bipolar disorder. R.Safari , D. Aybay, A. Özerdem, Z. Tunca , Ç. E. Yazıcıoğlu , M. Sakızlı. 28. Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine The Genomic Future of Medicine Sept. 30 - Oct. 02,

2012.
THE PhD MODEL OF DOKUZ EYLUL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, Oya Sayin, Zubeyde Erbayraktar, Roghaiyeh Safari, Guldal Kirkali, Sermin Genc, Gul Guner Akdogan, İbrahim Astarcioglu, 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011, P18.
POST-GRADUATE EDUCATION IN MOLECULAR MEDICINE AT GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, DOKUZ EYLUL UNIVERSITY, İZMİR, TÜRKİYE , Duygu Harmancı, Roghaiyeh Safari, Reza Salimi, Gul Guner Akdogan, 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011, P28.
AN OUTLOOK TO THE SCIENTIFIC ACTIVITIES OF SUPERVISORS AT DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, , 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011 Reza Salimi, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Roghaiyeh Safari, Duygu Harmanci, Güldal Kirkali, Gül Güner Akdoğan, P33.
AN OUTLOOK TO JOURNAL PUBLICATIONS FROM THESES OF MSc AND PhD STUDENTS AT DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCE , 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011 Mehtap Yüksel Eğrilmez, Seniz Inanc, Feriha Ozkaya, Reza Salimi, Duygu Harmancı, Roghaiyeh Safari, Güldal Kırkalı, İbrahim Astarcioglu, Gül Güner Akdoğan, P52.
PERCEPTIONS OF GRADUATE STUDENTS FOR SERVICE QUALITY IN THE INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES OF DOKUZ EYLUL UNIVERSITY, 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011, Roghaiyeh Safari, Reza Salimi, Ipek Kiremitci, Ozkan Tutuncu, P62.
EDUCATIONAL VIEWS AND OPINIONS OF MSc AND PhD STUDENTS ABOUT THE MOLECULAR MEDICINE PROGRAMME AT THE UNIVERSITY OF DOKUZ EYLUL UNIVERSITY, 6th Orpheus conference in the Dokuz Eylul university 2011, Roghaiyeh Safari, Duygu Harmancı, Vildan Mevsim, Gul Guner Akdogan, P73.
AN OUTLOOK TO JOURNAL PUBLICATIONS FROM THESES OF MSc AND PhD STUDENTS AT DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, Trends in undergraduate biomolecular science education and tips for postgraduate students and beyond, FEBS 2012, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Seniz Inanc, Feriha Ozkaya, Reza Salimi, Duygu Harmancı, Roghaiyeh Safari, Güldal Kırkalı, İbrahim Astarcioglu, Gül Güner Akdoğan.

