

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK TANILI HASTALARIN
İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDE (IPS) MİKRORNA
EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

BEGÜM ALURAL

**TEMEL SİNİRBİLİMLER
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970065

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK TANILI HASTALARIN
İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDE (IPS) MİKRO RNA
EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER

DOKTORA TEZİ

BEGÜM ALURAL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'nca yürütülmekte olan 2214/A-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında 1059B141500912 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD- 2012970065

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Begüm ALURAL, ‘**BİPOLAR BÖZÜKLÜK TANILI HASTALARIN İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİNDE (IPS) MİKRORNA EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**’ konulu Doktora tezini 12/10/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

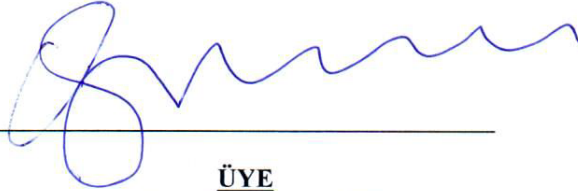


ÜYE
Prof. Dr. Şermin GENÇ
DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler AD.
(Danışman oy kullanmadı.)



ÜYE (BAŞKAN)
Prof. Dr. Pınar AKAN
DEÜ Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD.

ÜYE
Prof. Dr. Volkan SEYRANTEPE
İYTE Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik AD.

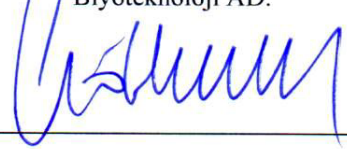


ÜYE
Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL
İYTE Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik AD.



YEDEK ÜYE
Dr. Öğretim Üyesi Yavuz OKTAY
DEÜ Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD.

ÜYE
Doç. Dr. Gökhan KARAKÜLAH
DEÜ İBG Enstitüsü
Genom Bilimleri ve Moleküler
Biyoteknoloji AD.



ÜYE
Dr. Öğretim Üyesi Çiğdem TOSUN
İYTE Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik AD.



YEDEK ÜYE
Doç. Dr. Petek Ballar KIRMIZIBAYRAK
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya AD.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iii
KISALTMALAR	iv
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	23
3.4. Çalışma Materyali.....	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	23
3.6. Veri Toplama Araçları	23
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	39
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	39
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	39
3.10. Etik Kurul Onayı.....	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR.....	68
8. EKLER.....	82
8.1. Etik Kurul Onayı	82
8.2. Hasta Onam Formu	84
8.3. Özgeçmiş	98
8.4. Tezden Yapılan Yayınlar	100

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. BB üzerine yapılmış GWAS bulgularının özeti.....	10
Tablo 2. BB hastalarından elde edilen IPS hücrelerin kullanıldığı çalışmalar.....	16
Tablo 3. BB üzerine yapılmış olan miRNA çalışmalarının özeti.....	21
Tablo 4. NIM komplet ortamının içeriği.....	26
Tablo 5. NEM komplet ortamının içeriği.....	27
Tablo 6. NPH karakterizasyonunda kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları.....	28
Tablo 7. Nöron farklılaştırma ortamının içeriği.....	29
Tablo 8. Karakterizasyonda kullanılan antikorlar ve seyrelme oranları.....	29
Tablo 9. miRNA profillemesi için kullanılan sağlıklı kontrollere ve BB hastalarına ait örnek kütüphanesi.....	30
Tablo 10. Bağlanma, uzama ve saflaştırma protokolleri.....	31
Tablo 11. Normalizasyonda kullanılan kontrol problemlerine ait bilgiler.....	33
Tablo 12. Çalışma kapsamında NPH üretilen sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait bilgiler	40
Tablo 13. Nanostring miRNA profillemeye sonuçları.....	44
Tablo 14. GO analizine göre miR-34a hedef genlerinin sınıflandırılması.....	48
Tablo 15. İfade analizi için belirlenen miR-34a hedef genleri.....	49
Tablo 16. İfade analizi için seçilen miR-34a hedef genlerine ait bilgiler.....	50

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. BB çalışmalarında kullanılan deneysel modellerin özeti.	13
Şekil 2. miRNA biyogenezinin genel bir özeti.....	18
Şekil 3. Deneylerde kullanılan manyetik hücre ayırım sisteminin görüntüsü.....	26
Şekil 4. Nanostring miRNA profillemesinin tüm basamaklarının özeti	32
Şekil 5. IPS hücrelerinin NPH'lere farklılaştırma basamaklarında hücrelerin temsili bir görüntüsü.....	40
Şekil 6. Sağlıklı kontrol grubuna ait NPH hücrelerinin immunfloresans boyama sonuçları.....	41
Şekil 7. BB hasta grubuna ait NPH hücrelerinin immunfloresans boyama sonuçları.....	42
Şekil 8. Sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait 6-haftalık nöronların immunfloresans boyama sonuçları.....	43
Şekil 9. Sağlıklı kontrol ve BB örneklerinde miR-34a ifade değişimleri.....	46
Şekil 10. Sağlıklı kontrol ve BB örneklerinde miR-34a ifadesinin farklılaşmaya bağlı değişimi.....	47
Şekil 11. PITA analizinde miR-34a ile ilişkili olduğu saptanan BDNF transkriptleri.....	50
Şekil 12. Lityum ile farklılaştırılmış hücrelerde miR-34a ifade değişimleri.	51
Şekil 13. Lityum ile farklılaştırılmış hücrelerde miR-34a hedef genlerinin ifade değişimleri.....	53
Şekil 14. Lityum inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin Real Time-Glo ile ölçülmesi.....	54
Şekil 15. Lityum inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin PrestoBlue ile ölçülmesi.....	55
Şekil 16. Lityum varlığında hücre farklılaşmasının nörogeneze etkisi	56
Şekil 17. Lityum varlığında hücre farklılaşmasının nöroenez yolağındaki genlere etkisi.....	58
Şekil 18. miR-34a aşırı ifadesinin BDNF mRNA seviyesine ve protein salınımına etkisi.....	59

KISALTMALAR

ANK3	Ankyrin-3
3'- UTR	3' Untranslated Region = 3' Anlatım Yapmayan Bölge
5'- UTR	5' Untranslated Region = 5' Anlatım Yapmayan Bölge
BB	Bipolar Bozukluk
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BMP	Bone Morphogenetic Protein = Kemik Morfojenik Proteini
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor= Beyin kökenli Nörotrofik Faktör
BT	Bilgisayarlı Tomografi
c-MYC	Cytoplasmic Myc Protein= Sitoplazmik Myc Proteini
CACNA1C	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C
CACNB3	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 3
CNV	Copy Number Variation= Kopya Sayısı Varyantları
CREB	Cyclic AMP-Response Element Binding Protein
DA	Dopamin
DCX	Doublecortin
DDD	Duygudurum Düzenleyici
DGCR8	Digeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DLPFC	Dorsolateral Prefrontal Cortex= Dorsolateral Prefrontal Korteks
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition
DTG	Difüzyon Tensör Görüntüleme
FGF	Fibroblast Growth Factor
fMRG	Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GWAS	Genome-Wide Association Study= Genom Çaplı İlişkilendirme Çalışmaları
HPA	Hipotalamik-Pitüiter-Adrenal Eksen
HPT	Hipotalamik-Pitüiter-Tiroid Eksen
IPSC	Induced Pluripotent Stem Cell= İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KLF4	Krueppel-Like Factor 4
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting= Manyetik Hücre Ayrımlama
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
MDB	Majör Depresif Bozukluk
miRNA	Mikro-RNA
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Messenger-RNA
MRS	Manyetik Rezonans Spektroskopi
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NE	Norepinefrin
NEM	Neural Expansion Media
NIM	Neural Induction Media
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NPH	Nöral Progenitör Hücre
OCT3/4	Octamer 3/4
PBS	Phosphate-Buffered Saline= Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polymerase Chain Reaction= Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PFC	Prefrontal Cortex= Prefrontal Korteks
RT-qPCR	Quantitative Real-Time PCR= Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonükleik Asit
Rock	Rho-Associated Protein Kinase
RPLP0	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms =Tek Nükleotid Polimorfizmleri
SOX1	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 1
SOX2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
SPECT	Single Photon Emission Computerized Tomography= Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi
SYN	Synapsin
SYP	Synaptophysin
SYT1	Synaptotagmin 1
TUJ1	Neuron-Specific Class III Beta-Tubulin
VLPFC	Ventrolateral Prefrontal Cortex= Ventrolateral Prefrontal Korteks
VMPFC	Ventromedial Prefrontal Cortex = Ventromedial Prefrontal Korteks

BİPOLAR BOZUKLUK TANILI HASTALARIN İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİNDE (IPS) MİKRORNA EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Begüm ALURAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler AD.
begumalural@gmail.com

ÖZET

Bipolar bozukluk (BB), manik ve depresif dönemler arasındaki iyilik dönemleri (ötimi) ile karakterize edilebilen, yineleyici doğada ve ömür boyu süren nöropsikiyatrik bir hastalıktır. Günümüze kadar, BB üzerine yapılan çalışmalarda hayvan modelleri, biyolojik sıvılar, postmortem beyin dokuları kullanılmıştır. Öte yandan, gelişen indüklenmiş pluripotent kök hücre (IPS) teknolojisi ile hastaya özgü *in vitro* model oluşturulabilmesi, bahsedilen diğer modelleme yöntemlerinin taşıdığı sınırlılıkların aşılmasına olanak sağlamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, BB hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait IPS hücrelerinin nöronlara farklılaştırılarak hastaya özgü *in vitro* bir model oluşturulması ve bu modelde Nanostring global miRNA profillemesi yapılarak BB hasta grubunda farklı ifade düzeyine sahip miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada toplam üç BB hastasına ve üç sağlıklı kontrole ait fibroblast örnekleri kullanılmıştır. Bu fibroblastlar Cellular Reprogramming firması tarafından, sentetik mRNA transfeksiyon yöntemi kullanılarak IPS hücrelerine çevrilmiştir. IPS hücreleri teslim alındıktan sonra nöral progenitör hücrelere ve nöronlara farklılaştırılmış ve farklılaşmanın 2.-, 4.- ve 6.- haftalarında RNA izolasyonu yapılmıştır. Tüm RNA örneklerinden Nanostring miRNA profillemesi ve veri analizi New Mexico Üniversitesi'nde, Doç. Dr. Nikolaos Mellios danışmanlığında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra RT-qPCR ile miR-34a artışı doğrulandıktan sonra, hastalık tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olan lityumun miR-34a ifade düzeyine ve diğer parametrelere olan etkileri incelenmiştir.

Mali yükü ve iş gücü yükünün büyük olması nedeniyle çalışmaya sadece çok az sayıda BB hastası ve sağlıklı kontrol dahil edilebilmesine bağlı olarak, global miRNA profillemesi sonuçları üzerinde istatistiksel bir değerlendirme yapılamamıştır. Bu nedenle profillemeye sonucunda en az 1,5-kat farklılık gösteren miRNA'lar belirlenmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında ise, hedef genlerin ve tedavi üzerinde etkili olabilecek olası yolların analizleri için, ifade düzeyinin tüm farklılaştırma zaman noktalarında ortak olarak arttığı saptanmış olan miR-34a üzerine

yoğunlaşmıştır. Lityumun BB hastalarına ait hücrelerde miR-34a ve hedef genlerinin ifade düzeylerine olan etkilerinin incelendiği deneylerde, lityum tedavisi sonrası miR-34a ifade düzeyinin lityum-responder BB hastasına ait hücrelerde azaldığı ve miR-34a hedef genlerinin ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Ancak lityum non-responder BB hastalarına ait hücrelerde böyle bir etki saptanamamıştır. Devam eden deneylerde, lityum ile akut tedavinin de sadece responder BB hastasına ait hücrelerde proliferasyonu arttırdığı ve nörogenezi tetiklediği saptanmıştır. Ancak çalışmaya sadece üç BB hastasının dahil edilebilmiş olması ve bu üç hastanın sadece bir tanesinin lityum-responder olması önemli bir kısıtlılıktır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular iki ana başlıkta özetlenebilir: 1) miR-34a tarafından düzenlenen sinaptogenez ve nörogelişim, BB patogenezinde yer alan yolaklardan biri olabilir ve 2) Hastalığın tedavisinde kullanılan lityum, sahip olduğu terapötik etkisinin bir kısmını miR-34a üzerinden gösteriyor olabilir. Ancak bu bulguların doğru yorumlanabilmesi ve geliştirilebilmesi için daha büyük hasta kohortlarında doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçların hastalıkla ilişkisinin tam olarak anlaşılabilmesi ve lityumun etki mekanizmasında miR-34a'nın rolü olup olmadığının anlaşılabilmesi için daha fazla hastanın dahil edildiği detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Bipolar Bozukluk, mikroRNA, Nöral progenitor hücreler, iPSC, lityum

ANALYZING miRNA EXPRESSION CHANGES IN BIPOLAR DISORDER PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (IPSC).

Begüm ALURAL

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience
begumalural@gmail.com

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a neuropsychiatric disorder characterized by manic and depressive episodes with intermittent periods of euthymia. Traditionally, the research on BD has relied on the use of animal models, biological fluids, or post-mortem tissues to identify biological changes associated with BD. However, such approaches suffer from various technical and biological limitations. Patient-derived induced pluripotent stem cell (iPSC) technology, on the other hand, offers an opportunity to overcome these limitations. In the present study, we aimed to identify miRNAs associated with BD by Nanostring miRNA profiling.

In this study, we used fibroblast cells obtained from three BD patients and three healthy controls. These fibroblasts were reprogrammed to iPSCs with messenger RNA-based transfection method by Cellular Reprogramming company. Then we further induced these iPSCs to establish neural progenitor cells (NPC). After characterization, we differentiated NPCs into neurons and collected RNA samples on for two, four, or six weeks of differentiation. Then, we performed Nanostring analysis to identify differentially expressed miRNAs between BD- and control-derived NPCs and neurons. Finally, we evaluated how lithium modulates expression levels of miR-34a and its selected targets, together with NPH viability and neurogenesis parameters.

Due to time and financial constraints, iPSCs have been established from three BD patients and three healthy controls. Statistical analysis on differentially expressed genes was not possible due to small sample size; therefore, we listed miRNAs with a fold-change of 1.5 or higher between two groups. Among several deregulated miRNAs, we identified miR-34a as one of the most consistently upregulated miRNA during different periods of neuronal differentiation. Building on this observation, we focused on miR-34a for target gene and treatment-related pathway analyses. Lithium treatment caused a marked reduction miR-34a expression in responder cells, which was further reflected in statistically significant elevation of miR-34a target genes' expression levels. Lithium treatment induced proliferation of NPCs and neurogenesis of neurons. On the other hand, lithium treatment failed to produce similar effects on non-responder cells. To our knowledge, this

is the first study to investigate the effects of lithium on miRNAs by using BD patient derived neurons. Due to limited sample size, only one of the three patients was lithium responder, and the findings of this study require validation in larger cohorts.

Taken together, the main findings of this study are twofold: 1) The regulatory network modulated by miR-34a may provide clues to the molecular mechanisms underlying BD pathogenesis and 2) Lithium may exerts its effects, at least in part, through miR-34a and its target genes. Further studies on a larger patient cohort are needed to determine the generalizability of these findings around miR-34a, as well as, to obtain a more comprehensive picture of the biological basis of lithium response.

Keywords: Bipolar Disorder, microRNA, Neural Progenitor Cells, iPSC, lithium

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Problemin tanımı ve önemi: Bipolar bozukluk (BB), belirli bir düzene bağlı olmaksızın tekrarlayan depresyon ya da mani dönemleri ve bu dönemler arasında iyilik dönemlerinin görüldüğü kronik bir nöropsikiyatrik hastalıktır. Günümüze değin hastalığın mekanizmasının belirlenmesi amacıyla pek çok genetik ve biyokimyasal çalışma gerçekleştirilmiş olsa da hastalığın etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

MikroRNA (miRNA)'lar kodlama yapmayan, post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinde aracı RNA molekülleridir. miRNA'ların beyinde yüksek miktarda ifade edildikleri ve nöronal gelişimin, farklılaşmanın ve nöroplastisitenin düzenlenmesi için gerekli oldukları gösterilmiştir.

Geçmiş yıllarda miRNA'ların BB patogenezi ve ilaç yanıtları üzerindeki olası etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından irdelenmiştir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri, postmortem beyin dokuları, kan veya beyin omurilik sıvısı örnekleri, lenfoblastoid hücre hatları ve benzeri modeller belirli sınırlılıklara sahip olmanın yanı sıra, elde edilen sonuçlarda da çalışmalar arası farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, indüklenmiş pluripotent kök hücre (IPS) gibi hastaya özgü hücresel platformların oluşturulması, kontrol edilebilir çevresel faktörler sayesinde hem varyasyonları azaltmayı hem de nöronlar gibi ulaşması zor doku türlerinin kültür kabında oluşturulabilmesini sağlamıştır. Bu platformlarda hastalığın nörobiyolojisinin incelenmesi ise gerek hastalığın doğasının anlaşılabilmesi açısından gerekse hastalığın tedavisinde yararlı olabilecek ilaçların denenebilmesi ve yeni ilaçların keşfi için oldukça önemlidir.

Çalışmanın amacı: Bu tez çalışmasında BB hasta ve sağlıklı kontrolden alınan fibroblast hücrelerinin IPS hücrelerine çevrilerek hastaya özgü modellerin oluşturulması ve bu IPS hücrelerin önce nöral progenitör hücrelere, daha sonra ise nöronlara farklılaştırılması, farklılaşmanın belirli zaman noktalarında örnekler toplanarak (2-, 4- ve 6-hafta) bir örnek kütüphanesinin oluşturulması, son olarak da tüm örneklerde global miRNA profillemesi yapılarak sağlıklı/hasta grupları arasında farklı ifade düzeylerine sahip ve hastalığın patogenezi ile ilişkili olabilecek miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın Hipotezi: BB hastalarına ait NPH ve nöronlarda, sağlıklı bireylere kıyasla miRNA ifade profili farklı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bipolar Bozukluk

2.1.1. Tanımı

Bipolar bozukluk (BB), belirli bir düzene bağlı olmaksızın tekrarlayan manik ve depresif dönemler arasında iyilik dönemleri (ötimi) ile nitelendirilen, kronik bir nöropsikiyatrik hastalıktır [(Craddock ve Sklar, 2013); (Charney ve ark., 2017)].

Duygudurum bozukluklarına (DDB) ilişkin bilinen ilk gözlemler oldukça eski zamanlara dayanmakla birlikte, hastalığın belirtilerinin, gidiş ve sonlanışının tanımlanmasını ilk kez Kraepelin tarafından 1896 yılında yapılmıştır (Marneros, 2001).

2.1.2. Sınıflandırma ve Tanı Kriterleri

BB, Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El kitabı yeniden gözden geçirilmiş dördüncü baskısında (DSM-4-TR) “*Duygudurum Bozuklukları*” başlığı altında yer almaktaydı. 2013 yılında kullanıma giren DSM-5’te ise DSM-4-TR’den farklı olarak BB ile Depresif Bozukluklar ayrı başlıklar altında toplanmış ve *Duygudurum Bozuklukları* üst başlığı kaldırılmıştır (American Psychiatric Association, 2013).

DSM-5’e göre duygudurum dönemleri mani, hipomani ve majör depresyon dönemlerinden oluşmaktadır. Mani dönemi tanı ölçütleri kabarmış, taşkın, çabuk kızan ya da olağandışı ve sürekli bir duygudurumun bulunmasıdır. Ayrıca amaca yönelik etkinliklerde ve içsel güçte, olağandışı ve sürekli bir artışın olduğu ayrı bir dönemin, en az bir hafta (ya da hastaneye yatırılmayı gerektirmişse herhangi bir süre), neredeyse her gün ve günün büyük bir bölümünde sürmesidir.

Ayrıca bu belirtilerden üç ya da daha fazlası mevcut tabloya eşlik etmelidir:

- Benlik saygısında abartılı artış ya da büyüklük düşünceleri,
- Uyku gereksiniminde azalma,
- Her zamankinden daha konuşkan olma,
- Düşünce uçuşmaları ya da düşüncelerin sanki yarışıyor gibi birbirlerinin peşi sıra gelmesi yaşantısı,
- Dikkat dağınıklığı (distraktibilite),

- Amaca yönelik etkinliklerde artma ya da psikomotor ajitasyon,
- Kötü sonuçlar doğurabilecek etkinliklere aşırı katılma.

Hipomani dönemi için tanı ölçütleri kısaca mani dönemi belirtilerinin en az dört ardışık gün süreyle, neredeyse her gün, günün büyük bölümünde bulunması olarak tanımlanabilir. Bireyin işlevselliğinde değişik saptanabilmektedir ancak, hipomani döneminin mani döneminden farkı toplumsal ya da mesleki işlevsellikte belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da hastaneye yatırılmayı gerektirecek kadar ağır olmamasıdır. Ancak psikotik özellikleri görülüyorsa mani dönemi olarak tanımlanır.

Majör depresif dönemi için tanı ölçütleri ise, en az iki hafta süren depresif duygudurum ya da ilgi kaybı/ artık zevk alamama durumunun bulunmasıdır. Ayrıca bu belirtilerden beş ya da daha fazlası mevcut tabloya eşlik etmelidir:

- Neredeyse her gün, yaklaşık gün boyu süren çökkün duygudurum,
- İştah ya da kilonun artmış/azalmış olması, uykuda ve psikomotor etkinlikte değişiklikler, yorgunluk ve enerji kaybı,
- Değersizlik düşüncelerinin ya da suçluluk duygularının bulunması,
- Düşünme ya da düşüncelerini belirli bir konu üzerinde yoğunlaştırma becerisinde azalma, karar vermede güçlük,
- Yineleyen ölüm ya da intihar düşünceleri, tasarıları ya da girişimleri.

Bu belirtilerin klinik ya da toplumsal olarak belirgin sıkıntıya ya da işlevsellikte bozulmaya neden olması, genel bir tıbbi durumdan ve fizyolojik nedenlerden bağımsız olması gerekmektedir (American Psychiatric Association, 2013).

BB, DSM-5' te yedi alt tipte sınıflandırılmıştır:

- I. Bipolar I Bozukluk (En az bir mani atağı bulunmalı, mani atağın öncesinde ya da sonrasında hipomani ya da majör depresyon ataklar bulunabilir)
- II. Bipolar II Bozukluk (En az bir hipomani ve en az bir depresyon atağı bulunmalı)
- III. Siklotimik Bozukluk (En az iki yıl süre ile hipomanik veya bir depresif atak belirtilerinin bulunması, ancak belirtilerin tanı ölçütlerini karşılamaması ile belirli)
- IV. Maddenin/İlacın Yol Açtığı Bipolar ve İlişkili Bozukluk

- V. Başka Bir Sağlık Durumuna Bağlı Bipolar ve İlişkili Bozukluk
- VI. Tanımlanmış Diğer Bir Bipolar ve İlişkili Bozukluk (Kısa süren veya yeterli belirti göstermeyen hipomani/ depresyon dönemleri)
- VII. Tanımlanmamış Bipolar ve İlişkili Bozukluk

2.1.3. Epidemiyoloji

BB'nin yaşam boyu yaygınlık oranları çalışmalar arasında farklılık göstermekle birlikte, geniş katılımlı epidemiyolojik bir çalışmada BB Tip I'in yaşam boyu yaygınlığı %0,6; BB Tip II'nin yaşam boyu yaygınlığı ise %0,4 olarak hesaplanmıştır. Eşik altı BB içinse yaşam boyu yaygınlığın %2,4, bir yıllık yaygınlığın ise %1,4 olduğu belirlenmiştir (Merikangas ve ark., 2011).

BB yaşamın her döneminde ortaya çıkabilmektedir. BB Tip I tanısı alan hastaların %50' den fazlasında belirtiler 15-25 yaş aralığında başlarken, BB Tip II başlangıç yaşı daha geçtir [(Baldessarini ve ark., 2012); (Merikangas ve ark., 2011)]. Ayrıca ailede BB öyküsü olması halinde BB daha erken yaşlarda başlayabilmektedir. BB Tip I, kadın ve erkeklerde eşit oranlarda gözlenirken, BB Tip II kadınlarda daha sık görülmektedir (Nivoli ve ark., 2011).

2.1.4. Etiyoloji

BB etiyojisi henüz net olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte biyolojik, çevresel ve nöroendokrin faktörler, doğum travmaları, kullanılan ilaç ve maddeler sorumlu tutulmuştur. Bu etkenler aşağıdaki alt başlıklarda ayrı ayrı ele alınmıştır.

2.1.4.1. Biyolojik Etkenler

a. Genetik Bulgular

Daha önce gerçekleştirilmiş aile çalışmaları, hastalığın patofizyolojisinde genetik faktörlerin önemini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalarda, BB'nin tüm tipleri için fenotipik uyumunun monozigot ikizlerde 0,5-0,6 aralığında, dizigot ikizlerde ise 0,39-0,43 aralığında olduğu saptanmıştır. Ayrıca, BB Tip I için birinci derece akrabalarda bağlı riskin %8-10 olduğu bildirilmiştir [(Kerner, 2014); (Smoller ve Finn, 2003)]. Ailesel uyumun incelendiği bir çalışmada da ebeveynlerden bir tanesinde bipolar spektrum bozukluk olması durumunda çocuklarda bir DDB

görülme olasılığının %27,2'ye, eğer her iki ebeveyn de hasta ise bu olasılığın %64,3'e yükseldiği saptanmıştır (Vandeleur ve ark., 2012).

Kalıtsal faktörlerin patofizyoloji ile ilişkisi pek çok açıdan gösterilmiş olsa da monozigot ikizlerde BB görülme oranının %40-70 aralığında kalması, hastalığın gen etkinliği (penetrans) tam olmayan, genetik ve çevresel etmenlerin birlikte rol oynadığı bir etiyolojiye sahip olduğunu düşündürmektedir (Craddock ve Sklar, 2013). Öte yandan, aile çalışmaları ile hastalığa yatkınlık olup olmadığını belirlenebilse de yatkınlığı oluşturan asıl etmenin ne olduğu belirlenememektedir.

Genom çaplı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), yüksek sayıda (>1000) hasta/kontrol örneği kullanarak, 1 milyon SNP (tek nükleotid polimorfizmleri; single nucleotide polymorphism) ve CNV (kopya sayısı varyantları; copy number variants) farklılıklarını eşzamanlı olarak test eder. BB üzerine GWAS araştırmalarının sayısı son 10 yılda önemli ölçüde artmıştır. Bu çalışmalar, BB için tanımlanan çok sayıda yatkınlık lokusu ve SNP, hastalığın ortaya çıkmasında çok sayıda varyantın rol oynadığı poligenik bir yapıyı işaret etmiştir [(Baum ve ark., 2008); (Ferreira ve ark., 2008); (Jiang ve Zhang, 2011); (Cichon ve ark., 2011); (PGCBDW Group, 2011); (Chen ve ark., 2013); (Bergen ve ark., 2012); (Muhleisen ve ark., 2014); (Hou ve ark., 2016); (Ikeda, Takahashi, ve ark., 2018); (Charney ve ark., 2017); (Stahl ve ark., 2017)]. 2011'de Psikiyatrik Genomik Konsorsiyum'u tarafından yayımlanan Bipolar Bozukluk Çalışma Grubunun (Bipolar Disorder Working Group: PGCBD) araştırmasına kadar, yapılan çalışmalara genellikle küçük örneklemeler dahil edilmiş ve farklı GWAS örneklemelerinde Ankyrin 3 (*ANK3*: <http://omim.org/entry/600465>) ve Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C (*CACNA1C*: <http://omim.org/entry/114205>), genlerinin hastalık ile ilişkili olduğu tekrarlı şekilde görülmüştür (Cichon ve ark., 2011). PGCBD araştırmasına ise, 11 ayrı çalışmadan toplam 16731 örnek ve 46912 tekrarlı örnek dahil edilmiş ve bu çalışmanın sonucunda genom çapında anlamlılık kriterlerini karşılayan ve *ODZ4*, *ANK3* ve *SYNE1* gen bölgelerine çok yakın dört lokus saptanmıştır (PGCBDW Group, 2011) (Tablo 1).

Tablo 1. BB üzerine yapılmış GWAS bulgularının özeti (Aşağıdaki tablo, (Ikeda, Saito, ve ark., 2018) makalesinden uyarlanmıştır).

Kromozom	Genomik Konum(hg19)	Gen	SNP-Risk alleli	Popülasyon	Referans
13	42653437	<i>DGKH</i>	rs1012053-A	Avrupa	(Baum ve ark., 2008)
10	62179812	<i>ANK3</i>	rs10994336-T	Avrupa	(Ferreira ve ark., 2008)
6	31327701	<i>NR</i>	rs9378249-?	Avrupa	(Jiang ve Zhang, 2011)
16	23634026	<i>PALB2</i>	rs420259-?	Avrupa	
19	19361735	<i>NCAN</i>	rs1064395-A	Avrupa	(Cichon ve ark., 2011)
11	79077193	<i>ODZ4</i>	rs12576775-G	Avrupa	
12	2419896	<i>CACNA1C</i>	rs4765913-A	Avrupa	(PGCBDW Group, 2011)
1	79238015	<i>PTGFR/IFI44L/ADGRL4</i>	rs4650608-T	Avrupa+ Asya	
2	97405440	<i>LMAN2L</i>	rs2271893-G	Avrupa+ Asya	
3	36856030	<i>TRANK1</i>	rs9834970-C	Avrupa+ Asya	(Chen DT ve ark., 2013)
3	52279594	<i>PRM1M</i>	rs7618915-G	Avrupa+ Asya	
10	62185494	<i>ANK3</i>	rs4948418-T	Avrupa+ Asya	
3	1897973	İntergenik	rs2727943-T	Avrupa	
6	166155457	<i>RP11-252P19.1</i>	rs1039002-T	Avrupa	(Bergen ve ark., 2012)
3	36864489	<i>TRANK1</i>	rs6550435-G	Avrupa	
5	7519185	<i>ADCY2</i>	rs17826816-G	Avrupa	
6	98576223	<i>POU3F2, MIR2113</i>	rs1487441-G	Avrupa	(Muhleisen ve ark., 2014)
10	62322034	<i>ANK3</i>	rs10994415-C	Avrupa	
11	79083620	<i>ODZ4</i>	rs12290811-A	Avrupa	
3	36856030	<i>TRANK1</i>	rs9834970-T	Avrupa	
6	98553894	<i>POU3F2, MIR2113</i>	rs1487441-G	Avrupa	
7	1896413	<i>MAD1L1</i>	rs4236274-G	Avrupa	(Hou ve ark., 2016)
9	23347865	İntergenik	rs12553324-C	Avrupa	
12	49389320	<i>DDN</i>	rs1054442-A	Avrupa	
17	37846512	<i>ERBB2</i>	rs2517959-T	Avrupa	
2	97380229	<i>LMAN2L</i>	rs56361249-T	Avrupa	
3	36856030	<i>TRANK1</i>	rs9834970-T	Avrupa	
3	52814256	<i>ITIH1</i>	rs2302417-T	Avrupa	
6	152714606	<i>SYNE1</i>	rs1203233-G	Avrupa	(Charney AW ve ark., 2017)
10	62076628	<i>ANK3</i>	rs10994299-C	Avrupa	
10	111774807	<i>ADD3, LOC100505933, XPNPEP1</i>	rs10884920-A	Avrupa	
12	2419896	<i>CACNA1C</i>	rs4765913-A	Avrupa	
12	49466994	<i>RHEBL1/DHH</i>	rs10459221-C	Avrupa	
3	36856030	<i>TRANK1</i>	rs9834970-C	Avrupa+ Asya	
7	1950809	<i>MAD1L1</i>	rs4332037-T	Avrupa+ Asya	
11	61589481	<i>C11orf9, DAGLA, C11orf10, FEN1, FADS1, FADS2</i>	rs28456-G	Avrupa+ Asya	
11	61603510	<i>FADS2, C11orf9, C11orf10, FEN1, FADS1</i>	rs174576-A	Avrupa+ Asya	(Ikeda ve ark., 2018)
11	79077193	<i>ODZ4</i>	rs12576775-G	Avrupa+ Asya	
19	13153035	<i>NFIX</i>	rs4926298-G	Avrupa+ Asya	
1	150138699	<i>OTUD7B, VPS45, PLEKHO1, ANP32E, CA14, APH1A, C1orf54, C1orf51</i>	rs7544145-T	Avrupa	
2	97376407	<i>LMAN2L</i>	chr2_97376407-I	Avrupa	
2	166152389	<i>SCN2A, CSRN3</i>	rs17183814-A	Avrupa	
2	194465711	<i>intergenic</i>	chr2_194465711_I	Avrupa	
3	36856030	<i>TRANK1</i>	rs9834970-T	Avrupa	
3	52814256	<i>ITIH1, ITIH3</i>	rs2302417-A	Avrupa	
3	107793709	<i>CD47, IFT57</i>	rs3804640-A	Avrupa	
4	162294038	<i>FSTL5</i>	rs11724116-T	Avrupa	
5	7587236	<i>ADCY2</i>	chr5_7587236-I	Avrupa	
5	80796368	<i>RNU5E-1, RNU5D-1, ACOT12, SSBP2</i>	rs10035291-T	Avrupa	
6	72519394	<i>intergenic</i>	chr6_72519394-D	Avrupa	
6	98591622	<i>POU3F2</i>	rs2388334-A	Avrupa	
6	166995260	<i>RPS6KA2</i>	rs10455979-C	Avrupa	
7	11871787	<i>THSD7A</i>	rs113779084-A	Avrupa	
7	105048158	<i>SRPK2, PUS7</i>	rs73188321-T	Avrupa	
7	140700006	<i>BRAF, MRPS33, TMEM178B</i>	chr7_140700006-D	Avrupa	
10	62125856	<i>ANK3</i>	rs10994318-C	Avrupa	
10	111745562	<i>ADD3</i>	chr10_111745562-I	Avrupa	
11	61591907	<i>FADS1</i>	rs12226877-A	Avrupa	(Stahl ve ark., 2017)
11	65945186	<i>SART1, EIF1AD, BANF1, CST6, CATSPER1, GAL3ST3, SF3B2, PACS1, KLC2, RAB1B, CNIH2, YIF1A, TMEM151A, CD248, RIN1, BRMS1</i>	rs10896090-A	Avrupa	
11	66662731	<i>SPTBN2, C11orf80, RCE1, PC, LRFN4</i>	rs7122539-A	Avrupa	
11	70517927	<i>SHANK2, SHANK2-AS1</i>	rs12575685-A	Avrupa	
12	2387099	<i>CACNA1C</i>	rs10744560-T	Avrupa	
15	42904904	<i>SNAP23, LRRC57, HAUS2, STARD9</i>	rs4447398-A	Avrupa	
15	85357857	<i>LOC440300, LOC388152, LOC642423, GOLGA6L4, DNM1P41, GOLGA6L5, UBE2Q2P1, LOC100506874, ZSCAN2, SCAND2P, WDR73, NMB, SEC11A, ZNF592, ALPK3, SLC28A1</i>	chr15_85357857-I	Avrupa	
6	9926966	<i>GRIN2A</i>	rs11647445-T	Avrupa	
17	42201041	<i>G6PC3, HDAC5, C17orf53, ASB16, ASB16-AS1, TMUB2, ATXN7L3, UBTf</i>	rs112114764-T	Avrupa	
18	60243876	<i>ZCCHC2</i>	rs11557713-A	Avrupa	
19	19358207	<i>NCAN</i>	rs111444407-T	Avrupa	
20	43682549	<i>PABPC1L, TOMM34, STK4-AS1, STK4, KCNS1, WFDC5, WFDC12</i>	chr20_43682549-I	Avrupa	
20	43750410	<i>STK4, KCNS1, WFDC5, WFDC12, PI3</i>	rs6130764-T	Avrupa	

Tüm bu veriler BB'nin, küçük etki değerine sahip çeşitli varyantların birikimsel genetik etkisi ile duyarlılığa yol açtığı, poligenik bir hastalık olduğunu düşündürmektedir.

b. Biyokimyasal Bulgular

Nörotransmitterler: BB etiyojisinde biyokimyasal etkenlerin rolünü araştıran çalışmalarda ilk olarak monoaminlere odaklanılmıştır. Hastalıkta özellikle serotonin, norepinefrin, dopamin ve melatonin mekanizmalarındaki anormalliklerin rol oynadığı ileri sürülmüştür. Serotonin sistemi ve BB arasındaki ilişkiyi inceleyen pek çok araştırma ile de depresif dönemde merkezi serotonerjik aktivitenin azaldığını gösterilmiştir (Vadodaria ve ark., 2018). Mani döneminde ise dopaminerjik hiperaktivasyonun dopamin reseptör duyarlılığında azalmaya yol açtığı, bunun ise depresyon dönemini tetiklediği öne sürülmüştür. Dopaminerjik aktivitede azalmaya yol açan antipsikotik ilaçların aynı zamanda antimanik etki göstermesi de bu hipotezi desteklemektedir (Tohen ve Vieta, 2009). Ayrıca, mani oluşumunda "Noradrenerjik-kolinerjik" sistemler arasında denge bozukluğunun bulunduğu, artmış noradrenalinin mani, artmış kolinerjik aktivitenin ise depresyonu uyardığı bildirilmiştir [(Kurita, 2016); (Post ve ark., 1977)]. Ancak gerçekleştirilmiş tüm çalışmalar, nörotransmitterlerin salınım mekanizmasını değiştirerek tedavi imkânı tanımış olsa da kullanılan ilaçlar hastalığın sağaltımını sağlayamamakta ve yüksek tekrarlama riskini önleyememektedir. Bu durum hastalığın çok faktörlü doğasını işaret etmektedir.

Nöroendokrin Sistem Bulguları: Duygudurum bozukluğu olan hastalarda çok sayıda nöroendokrin düzensizlik kaydedilmiş olması, BB patofizyolojisinde nöroendokrin sistemdeki anormalliklerin de önemli bir rol oynadıkları düşündürmüştür. Hipotalamik-pitüiter-adrenal (HPA) ve hipotalamik-pitüiter-tiroid (HPT) eksen hormonları en fazla araştırılmış olan sistemlerdendir (Turan ve Lushi, 2014). BB hastalarının DEX/CRH (Deksametazon Supresyon Testi veya Deksametazon/Kortikotropin Salgılatıcı Faktör Testi) sonuçlarında hiperaktif HPA eksenine, ve yüksek sistemik kortizol seviyelerine sahip oldukları gözlenmiştir (Watson ve ark., 2004).

Nöroanatomi Bulgular: Yapısal [Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG); Bilgisayarlı Beyin Tomografisi (BT); Difüzyon Tensor Görüntüleme (DTG); Manyetik Rezonans Spektroskopi (MRS) vb.] ve işlevsel [Pozitron Emisyon Tomografisi (PET); Single Photon Emission

Computerized Tomography (SPECT); fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme (fMRG) vb.] beyin görüntüleme teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar, beyinde BB ile ilişkili yapısal ve işlevsel değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Başlıca beyin görüntüleme bulguları arasında lateral ventriküllerde genişleme (Brambilla ve ark., 2001), derin beyaz cevher ve subkortikal gri cevher alanlarında hiperintensite artışı (Ahn ve ark., 2004), ventromedial prefrontal korteks (VMPFC), ventrolateral PFC (VLPFC), dorsolateral PFC (DLPFC) bölgelerinde hacim azalması ve işlev bozukluğu [(Phillips ve Swartz, 2014); (Schneider ve ark., 2012); (Strakowski ve ark., 2012)], amigdala hacminde artma ya da azalma, hipokampus hacminde azalma, bazal ganglionlarda hiperintens lezyonlarda artış ya da glial hücre azalması sayılabilir [(Brooks ve ark., 2015); (Cousins ve Grunze, 2012)].

Çalışma sonuçları, hastalığın süresi ve atak sayısının beynin işlevi ve yapısı üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu, ayrıca değişikliklerinin hastalığın görece erken dönemlerinden itibaren bulunduğunu işaret etmektedir.

2.1.4.2. Çevresel Etkenler

Çevresel etkenlerin, hastalık riski taşıyan bireylerde hastalığın ortaya çıkışını ve seyrini (atakların sıklığı, zamanı, atak tipi) etkilediği bilinmektedir. Duyarlılaşma Modeli, geçirilen ilk manik ya da depresif atağın, stresli yaşam olayları ile tetiklendiğini, bu durumun ise beyin biyokimyasında değişikliklere yol açarak bireyi stresör etkenlere daha duyarlı hale getirdiğini ileri sürmektedir. Bu model, hastalığın ilerlemesine paralel olarak atakların sayısını artmasını ve sürelerinin uzamasını açıklamaktadır (Charney ve ark., 2017).

2.1.5. BB Tedavisi

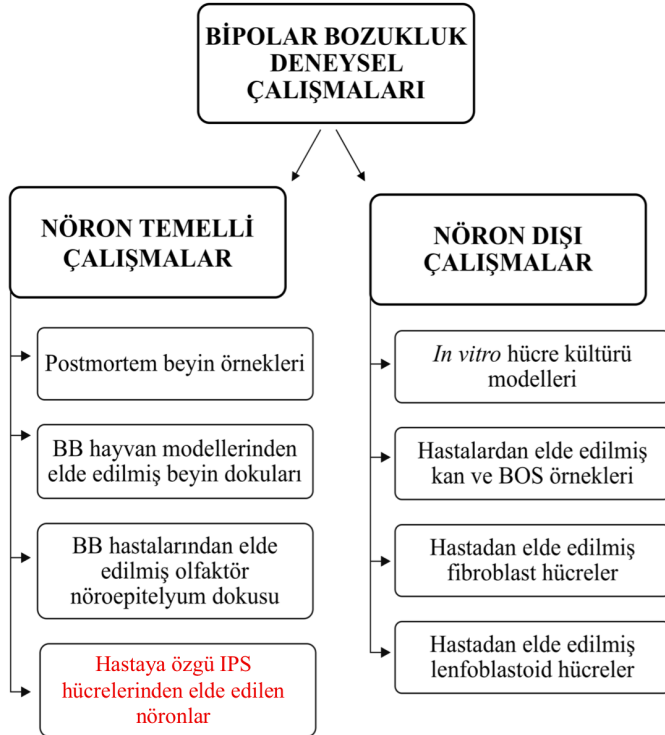
BB tedavisi akut tedavi ve koruma tedavisi olmak üzere iki aşamada planlanmaktadır. Akut mani tedavisinin başlıca hedefleri, belirtilerin yatıştırılması, hastanın riskli davranışlarının kontrol altına alınması, hastanın ve çevrenin güvenliğinin sağlanması ve yeni hastalık dönemlerinin önlenmesine yönelik koruyucu tedaviye hazırlık yapılmasıdır. Bu evrede seçilen ilk ilaç bir duyugudurum dengeleyici (DDD) olup, gereksinim doğrultusunda diğer psikotrop ilaçlar eklenebilir (Geddes ve Miklowitz, 2013). Lityum, tarihsel açıdan DDD sıfatını alan ilk ilaç olmakla birlikte,

yıllar içerisinde bazı antikonvülsan ilaçların da (valproat, karbamazepin, lamotrijin vb.) duygudurumu dengelemede etkili oldukları gözlenmiştir (Goodwin, 2003).

Koruma tedavisi (profilaksi) ise depresif kayma, depresme ve gelecek hastalık dönemlerini önlemeyi hedeflemektedir. Bu amaçla yine lityum ve bazı antiepileptikler (valproik asit, karbamazepin, lamotrijin) duygudurum düzenleyici olarak kullanılmakla birlikte son dönemde atipik antipsikotikler de koruyucu tedavide tercih edilmeye başlanmıştır. İlaç seçimi hastanın baskın atak türü, atak özellikleri ve yaşadığı yan etkilere göre ve hastalığın uzun dönem seyri gibi pek çok faktör göz önünde bulundurularak hastaya özgü yapılmalıdır (Eroglu ve Ozpoyraz, 2010).

2.1.6. BB Çalışmalarında Kullanılan Modeller

BB'nin etiyojisi ve patolojisini anlamak üzerine yapılan çalışmalarda hayvan modelleri, nörogörüntüleme bulguları, hastalardan elde edilmiş örnekler [postmortem beyin dokuları veya nöron dışı örnekler (kan veya beyin omurilik sıvısı, lenfoblastoid hücre hattı, fibroblastlar vb.)] kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. BB çalışmalarında kullanılan deneysel modellerin özeti.

Hastaya özgü nöronal modellerin oluşturulması ve kullanılması yakın zamanda gelişen yöntemler ile mümkün olmuştur. Bu amaçla yakın zamanda kullanılmaya başlanan yöntemlerden birisi de IPS hücrelerdir (Viswanath ve ark., 2015).

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşmış hücreler oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Farklılaşma ise sitokinlerin, büyüme faktörlerinin (growth factors), hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası etkileşimin kombine etkisiyle meydana gelmektedir.

Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler yüksek potentsiden aza doğru totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak sınıflandırılır (Schöler, 2007). Totipotent karakterdeki zigot ve ilk blastomerler çoğalarak blastosistin iç hücre kitlesini oluşturduktan sonra, gelişim potansiyelleri sınırlanarak pluripotent hale gelirler. Bu hücreler doğal ortamlarından izole edilip uygun şartlarda *in vitro* olarak kültüre alındığında embriyonik kök hücre hatları elde edilmektedir. Pluripotent kök hücreler ise farklılaşarak, gelişim potansiyelleri daha düşük multipotent kök hücrelere dönüşmektedirler. Gelişimin ilerleyen evrelerinde multipotent kök hücreler daha da özelleşir ve erişkin kök hücreleri oluştururlar. Unipotent hücreler ise sadece bir hücre tipini üretebilen ve kendini yenileme özelliğine sahip olan hücre tipidir.

2.2.1. Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, hemen hemen sınırsız sayıda kendilerini yenileme kapasitesine ve somatik hücrelere farklılaşma yeteneklerine sahip olmakla birlikte, yüksek alkalen fosfataz aktivitesi, yüksek telomeraz aktivitesi ve yüksek çekirdek-sitoplazma oranına sahiptirler [(Wobus, 2001); (Draper ve Fox, 2003)].

2.2.1.1. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

IPS hücreler pluripotent olmayan, farklılaşmış hücrelerin yapay olarak pluripotent genlerin ifadesinin uyarılmasıyla oluşturulan hücrelerdir (Baker, 2007). Embriyonik kök hücrelerin (Embryonic Stem Cells; ESCs) birçok karakteristik özelliği IPS hücrelerde de bulunmaktadır; alkalen fosfataz aktivitesi yüksektir, her üç germ tabakasına da (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklılaşabilmektir ve morfolojileri de ESC'lere benzemektedir (Puri ve Nagy, 2012).

IPS hücreler ilk olarak embriyonik ve erişkin fare fibroblastlarının dört transkripsiyon faktörünün [Octamer 3/4 (OCT3/4), SRY-box containing gene 2 (SOX2), cytoplasmic Myc protein (c-MYC) ve Krueppel-like factor 4 (KLF4)] ile yeniden programlanması yöntemiyle üretilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Günümüzde Yamanaka faktörleri olarak adlandırılan bu faktörleri ifade eden somatik hücreler, embriyonik kök hücreler gibi kendini çoğaltma (self-renewing) ve farklı dokulara değişebilme (pluripotensi) özelliği kazanırlar. Ancak IPS hücre eldesinde yeniden programlama faktörlerinin lentiviral/retroviral eklemeleri genom bütünlüğü için önemli riskler ile ilişkilendirilmesi üzerine alternatif yöntemler araştırılmıştır. Bu amaçla, genoma entegre olmayan adenoviral vektörler (Stadtfield ve ark., 2008), plazmidler (Yu ve ark., 2009), rekombinant proteinler (Zhou ve ark., 2009), değiştirilmiş messenger-RNA'lar (mRNA'lar) (Warren ve ark., 2010) ve küçük epigenetik değiştirici moleküller (Shi ve ark., 2008) gibi farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerin yeniden programlama etkinlikleri lentiviral/retroviral vektörlere göre düşük bulursa da başarılı sonuçlar alınmıştır [(Buganim ve ark., 2014); (Kumar ve ark., 2015)].

Günümüzde IPS hücreleri, nöronlar da dahil olmak üzere pek çok farklı hücre tipine başarılı bir şekilde çevrilmiştir.

2.2.1.2. IPS Hücrelerin Nöronal Hücrelere Farklılaştırılması

Beyin zengin bir nöronal alt tip çeşitliliğine sahiptir ve bu çeşitlilik karmaşık genetik ve çevresel girdiler ile belirlenir. Embriyogenez sırasında, nöroektodermin morfogenezini morfojen kombinasyonlarına bağlı olarak belirlenen iki ekseninde devam eder; rostro-dorsal ekseninde WNT, FGF (Fibroblast Growth Factor)ler ve retinoik asit rol oynarken, dorso-ventral ekseninde WNT, BMP (Bone Morphogenetic Protein)ler ve SHH (Sonic hedgehog) rol oynamaktadır (Liu ve Zhang, 2011). Bu bilgilerin ışığında, IPS hücre çalışmalarında da farklı nöronal alt tipleri ve bölge-spesifik nöronları elde edebilmek amacıyla morfojenler ve büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Örneğin, nöroepitel hücrelerin farklılaştırılmasında ekzojen morfojen bulunmaması (ortamdaki endojen WNTlerin ventralizasyonu baskılayarak dorsal kaderi uyarması sonucunda) glutamerjik nöronların oluşmasını sağlamaktadır (Li ve ark., 2009). Ventral ön beyinde en sık görülen nöronal alt tip olan GABAerjik nöronlar ise, IPS hücrelerin SHH aktivasyonu ve WNT inhibisyonu ile elde edilebilmektedir [(Liu ve ark., 2013); (Xu ve ark., 2010)]. IPS hücrelerine sinir büyüme faktörü

(NGF) ile birlikte SHH veya Purmorfamin (Smoothened proteininin agonisti)'in uygulanması ise bazal önbeyin kolinerjik nöronlarının oluşmasını tetiklemektedir (Duan ve ark., 2014). Öte yandan IPS hücrelerin SHH ile ventralizasyonu ile birlikte retinoik asit ile kaudalizasyonu sonucunda ise motor nöronlar oluşmaktadır [(Hu ve Zhang, 2009); (Du ve ark., 2015)].

2.2.1.3. IPS Hücrelerin Psikiyatrik Hastalıklarda Kullanımı

IPS hücreleri psikiyatrik hastalıkları modellemede ilk kez Brennand ve ark. tarafından kullanılmıştır. Şizofreni hastalarından elde edilen IPS hücrelerin nöronlara farklılaştırılması ile nöronal bağlantılar, morfoloji ve gen ifade düzeyleri incelenmiştir (Brennand ve ark., 2011). Şizofreniyi takiben pek çok psikiyatrik hastalık için IPS hücre modelleri oluşturulmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. BB hastaları ile yapılan çalışmalar Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. BB hastalarından elde edilen IPS hücrelerin kullanıldığı çalışmalar

Dahil Edilen Örnek Sayısı	Hücre Kaynağı	Hücre Tipi	Bulgular	(Varsa) İlaç Uygulaması	Kaynak
BB hasta: 3 Kontrol: 3	IPS hücre	Nöron	Kalsiyum yolağında iş gören genlerin ifadesinde değişiklik ve ventralizasyon saptanmış	Yok	(Chen HM ve ark., 2014)
BB hasta: 12 Kontrol: 6	iN**	Nöron benzeri	Hücre adhezyonunda lityum tedavisine bağlı değişiklikler saptanmış	Lityum	(Wang ve ark., 2014)
BB hasta: 2 Kontrol: 2	IPS hücre	NPH*	Hücre proliferasyonunda defektler saptanmış, GSK3 inhibitörü ile geri kazanım görülmüş.	GSK3 inhibitörü (CHIR-99021)	(Madison ve ark., 2015)
BB hasta: 6 Kontrol: 4	IPS hücre	DG granüler nöronlar	Artmış Ca^{++} akımı ve mitokondriyal defektler	Yok	(Mertens ve ark., 2016)
BB hasta: 4 Kontrol: 4	IPS hücre	Nöron	Kalsiyum sinyalleme ve telensefalik nöronal kaderin belirlenmesinde iş gören genlerin ifade düzeylerinde değişiklikler	Lityum	(Kim KH ve ark., 2015)
BB hasta: 1 Kontrol: 1	IPS hücre ve iN**	NPH* ve Nöron	BB hastalarında yüksek CXCR4 ifadesi gözlenmiş; nöronal gelişim ve plastisite ile ilişkili genlerde de ifade değişimleri saptanmış	Yok	(Bavami n ve ark., 2015)
BB hasta: 10 Kontrol: 6	IPS hücre	Nöron	CRMP2 fosforilasyonunun BB hastalarının lityuma yanıt verme/vermeme durumuna etkisi incelenmiş ve etkisi olabileceği saptanmış	Lityum	(Tobe ve ark., 2017)
BB hasta: 4 Kontrol: 6	IPS hücre	DG granüler nöronlar	İnstrikt hücre parametrelerinin BB- Li^{+} Responder ve Li^{+} Non-responder hastalarda farklı olduğu ve kronik Li tedavisinin hastalardan elde edilen nöronlarda farklı elektrofizyolojik yanıtlara yol açtığı saptanmıştır.	Lityum	(Stern ve ark., 2017)

*NPH: Nöral progenitor hücre

**iN indüklenmiş nöron

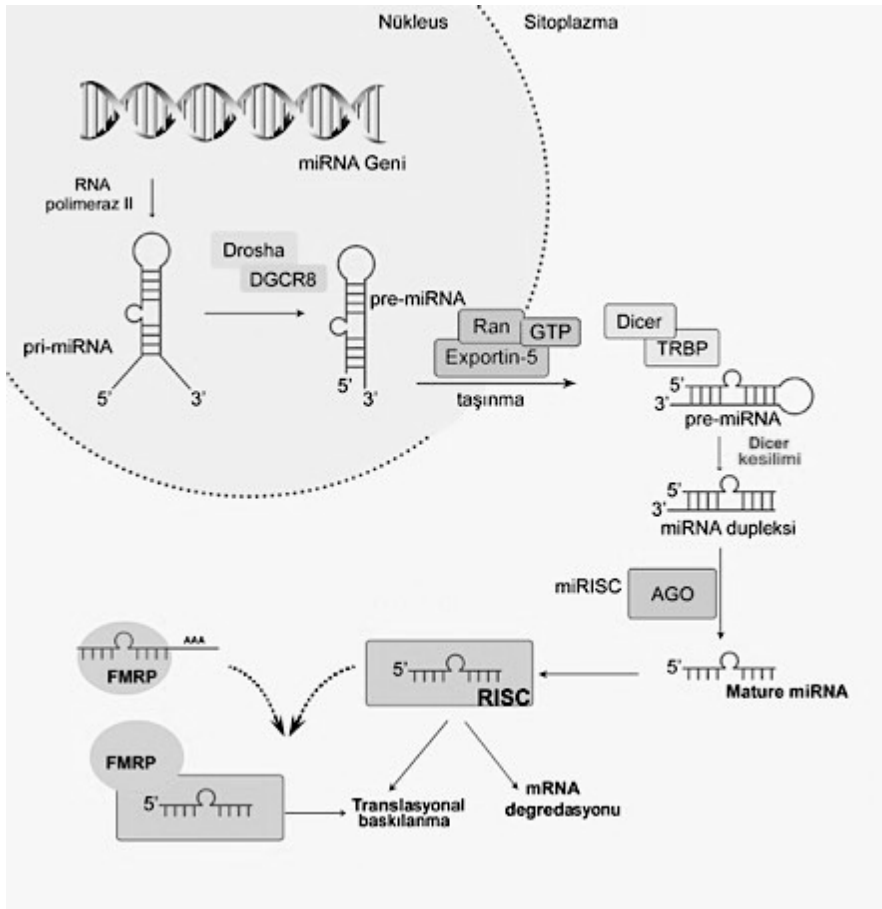
2.3. MikroRNA'lar

2.3.1. Tanım ve Fonksiyon

MikroRNA'lar (miRNA), post-transkripsiyonal ve translasyonel düzeyde iş gören, küçük (yaklaşık 22 nükleotidden oluşan), tek zincirli, endojen kodlanmayan RNA molekülleridir. Olgun biçimlerinde, hedef mRNA'ların çoğunlukla tamamlayıcı zincirinde 3'-UTR (untranslated region/anlatım yapmayan bölge) ve nadir durumlarda 5'- UTR ya da anlatım yapan bölgelerine bağlanırlar. Bu durumun sonucunda ise mRNA yıkımı ya da translasyonun başlaması ve ilerlemesinin baskılanması yoluyla protein ifadesi düzenlenir (Hamzeiy ve ark., 2014). miRNA'ların yapısında bulunan, yaklaşık 2-8 nükleotid uzunluktaki 'seed sequence/region', hedef mRNA'ların tanınmasından sorumludur (Lewis ve ark., 2003).

2.3.2. miRNA Biyogenezi

Kanonikal miRNA biyogenezi çoğu miRNA ailesinin olgunlaşmasını sağlayan yolak olarak tanımlanır. Ancak farklı yolaklar ile olgunlaşan özel miRNA aileleri de keşfedilmiştir (Hammond, 2015). Kanonikal yolağın ilk aşamasında miRNA'lar nükleusta bulunan RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript (Pri-miRNA) olarak transkibe edilirler. Bu transkriptlerin birer başlığı ve poliA kuyruğu vardır (Kim ve ark., 2004). İkinci aşamada pri-miRNA'lar, Drosha ve 'DiGeorge syndrome critical region gene 8' (DGCR8) enzimleri aracılığıyla kesilirler ve öncül miRNA (Pre-miRNA)'lara dönüşürler. Daha sonra eksportin-5 (çift zincirli RNA-bağlayıcı protein) aracılığıyla sitoplazmaya taşınan pre-miRNA'lar burada Dicer (endonükleaz) tarafından kesilirler. Dicer kesiminden sonra oluşan yaklaşık 22 baz çifti boyutunda ve saç tokası (hairpin loop) formundaki ürün olgun (mature) miRNA olarak adlandırılır (Ha ve Kim, 2014). Son aşamada ise olgun miRNA'lar RISC'e (RNA-Induced Silencing Complex) yüklenir; miRNA hedef genleri ile arasındaki tamamlayıcılığa bağlı olarak ya translasyonu baskılar, ya da hedef mRNA'nın yıkımına neden olur (Dalmay, 2013) (Şekil 2).



Şekil 2. miRNA biyogenezinin genel bir özeti. (Şekil, (Alural ve ark., 2017) makalesinden uyarlanmıştır.)

2.3.3. Beyine Özgül miRNA'lar

Bugüne kadar tanımlanmış miRNA'ların yaklaşık %75'i beyinde ifade edilmektedir. Bu miRNA'lar hem beynin fizyolojik gelişimi hem de nöronal fonksiyonlarla ilgili süreçlere (nörogenez, nöronal farklılaşma, sinaptogenez vb.) katkıda bulunmaktadır (Ji ve ark., 2013). Ayrıca miRNA'lar, sürece özgül genlerin ifadelerini baskılamalarından dolayı nöronal ve glial hücrelerin hücre kaderlerinin belirlemede (cell-fate determination) kritik öneme sahiptirler. Beyinde yüksek düzeyde ifade edilen miR-124, üzerinde en çok çalışılan miRNA'lardan biridir ve hem beyin gelişiminde hem de nöronal farklılaşmada rol oynadığı gösterilmiştir (Sun ve ark., 2015). Beyine özgül bir başka miRNA olan miR-9 hem nöronlarda hem de glial hücrelerde ifade edilir ve nörogeneze ilişkin pek çok süreçte önemli role sahiptir (Smirnova ve ark., 2005).

miRNA'ların, beyin bölgelerine göre farklı dağılım gösterdikleri (Hommers ve ark., 2015), hatta beyin bölgesi/nöron tipine özgül ifade farklılıklarına ek olarak, nöron içerisinde de miRNA bölümlenmelerinin (compartmentalisation) bulunduğu saptanmıştır (O'Carroll ve Schaefer, 2013). Sinapslar, dendritler ve aksonlarda belirli miRNA'ların zenginleşmelerine katkıda bulunan olası mekanizmalar henüz aydınlatılmamış olsa da, bazı RNA-bağlayıcı proteinlerin miRNA'ların belirli nöron bölgesine taşınması ve orada sabitlenmesinde (anchoring) iş görebileceği öne sürülmüştür (O'Carroll ve Schaefer, 2013).

2.3.4. BB ve miRNA

BB hastalarından elde edilen postmortem beyin örnekleri, kan ve serum örnekleri ya da IPS hücre ve indüklenmiş nöronlar ile yapılan çok sayıda araştırma hastalığın oluşumu/seyri ve miRNA ifade düzeylerinde değişiklikler arasında bir ilişki bulunduğunu gösterir niteliktedir. Ayrıca hasta örneklerinin yanı sıra, oluşturulan hayvan modelleri özellikle hastalıkta kullanılan ilaçların doğrudan etkilerinin incelenmesi açısından önemlidir. Gelişen yöntemler ile birlikte, bireylerin ilaca bağlı olarak hücresel yanıtlarının incelenmesinde IPS hücre ve indüklenmiş nöronlar da kullanılmaya başlanmıştır.

BB ile ilişkili olduğu belirlenen miRNA'lar çalışmalar arasında farklılık gösterse de bazı miRNA'lar birden fazla çalışmada tespit edilmiştir. Günümüze kadar ifade farklılığı saptanmış tüm miRNA'lar Tablo 3'te özetlenmiştir.

2.3.4.1. Postmortem Örneklerde miRNA Analizi

BB üzerine yapılmış postmortem çalışmalar Tablo 3'te özetlenmiştir. Bu çalışmalarda genellikle iki beyin bölgesine -PFC (BA9 ve BA10) ile DLPFC (BA46)- odaklanılmış olup, hastalıkla birlikte pek çok farklı miRNA'nın ifade düzeylerinde değişiklik olduğu saptanmıştır [(Banigan ve ark., 2013); (Kim ve ark., 2010); (Miller ve ark., 2012); (Moreau ve ark., 2011); (Smalheiser ve ark., 2014)]. BB hastalarının PFC'lerinde miRNA düzeylerini araştıran bir çalışmada CREB ve NMDA reseptörleriyle ilişkili olan miR-132 ifade düzeyinin kontrollere kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır (Miller ve ark., 2012). Öte yandan BB ve şizofreni hastalarından elde edilmiş postmortem DLPFC (BA 46) örneklerinde miR-346 düzeylerinin incelendiği bir çalışmada herhangi bir farklılık saptanamamıştır (Zhu ve ark., 2009). Yakın zamanda

gerçekleştirilmiş bir başka çalışmada ise, BB ve Majör Depresif Bozukluk hastalarından elde edilen postmortem örnekler kullanılmış ve duygudurum düzenlenmesinde iş gören anterior singulat korteks (BA 24) bölgesinde miRNA ifade düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, BB hastalarında dört miRNA'nın (miR-34a, miR-132, miR-133a ve miR-212) ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu (0,2-0,4-kat) bildirilmiştir (Azevedo ve ark., 2016).

2.3.4.2. Kan ve Serum Örneklerinde miRNA Analizi

BB ile ilgili olarak şimdiye kadar periferik dokularda yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. BB hastalarından mani döneminde ve tedavi sonrası ötimik dönemde alınan plazma örneklerinin kullanıldığı ilk çalışmada, manik dönemde bulunan hastalarda miR-134 düzeyinin 0,4-kat azaldığı, dört haftalık tedavi sürecinin ise miR-134 düzeylerini 1,3-kat arttırdığı saptanmıştır (Rong ve ark., 2011). miR-134'nın hedef genlerinden biri olan Limk1'in ise dendritik diken (spine) düzenlenmesini sağlayarak sinaptik gelişim ve olgunlaşma ve/veya plastisitede rol oynadığı düşünülmektedir (Schratt ve ark., 2006). Walker ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmaya ise BB için yüksek ailesel risk taşıyan ve taşımayan bireyler dahil edilmiş, çalışma sonucunda risk taşıyan grupta miR-15b, miR-132 ve miR-652 ifade düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (Walker ve ark., 2015). Takip eden diğer çalışmalarda da BB hastalarının kan örneklerinde miR-137, miR-499, miR-708 hsa-miR-1915-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-4793-3p, hsa-miR-4440 ve miR-1908 gibi farklı miRNA'ların ifade düzeylerinin düşük, miR-720, miR-140-3p, miR-1973, miR-30d5p, miR-3158-3p, miR-330-5p, miR-378a-5p, miR-4521, miR-21-3p, miR-29c-5p, miR-330-3p, miR-345-5p ifade düzeylerinin ise yüksek olduğu bildirilmiştir [(Strazisar ve ark., 2015); (Banach ve ark., 2017); (Maffioletti ve ark., 2016)].

2.3.4.3. Hastaya Özgü Hücre Modellerinde miRNA Analizi

Hastaya özgü örnekler ile yapılan ilk çalışmada, BB hastalarından ve sağlıklı kardeşlerinden üretilen lenfoblastoid hücre hatları kullanılmış, hücreler lityum ile çeşitli sürelerde inkübe edilerek miRNA düzeylerindeki değişimler izlenmiştir. On altı günlük lityum tedavisi sonrası lenfoblastoid hücre hatlarında miR-34a, miR-152, miR-155 ve miR-221 ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2009). Daha sonra Bavamian

ve ark. tarafından, hastaya özgü indüklenmiş nöronal hücre hatları ve postmortem beyin dokularında gerçekleştirilen çalışmada, BB hastalarında miR-34a ifade düzeylerinin kontrollere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca miR-34a'nın, BB risk genlerinden *ANK3* ve *CACNB3*'ü doğrudan olarak hedeflediği ve bu hücrelerde miR-34a ifadesinin sentetik miRNA mimikleri ile artırılmasının dendritik morfolojiyi etkilediği gözlenmiştir (Bavamian ve ark., 2015).

2.3.4.4. Hayvan Modellerinde miRNA Analizi

Literatürde BB için hayvan modelleri kullanan pek çok çalışma bulunmasına rağmen, miRNA ifade düzeylerinin analiz edildiği tek bir çalışma bulunmaktadır. Lityum ve valproatın sıçan hipokampuslarındaki etkilerini irdeleyen bu çalışmada, her iki ilacın let-7b, let-7c, miR-128a, miR-24a, miR-30a, miR-34a ve miR-221 düzeylerini azalttığı, miR-144 düzeyini ise arttırdığı saptanmıştır (Zhou ve ark., 2009).

Tablo 3. BB üzerine yapılmış olan miRNA çalışmalarının özeti. (Aşağıdaki tablo (Alural ve ark., 2017) makalesinden uyarlanmıştır.)

	miRNA	Örnek Sayısı	Örnek Tipi	Önemli miRNA hedefleri
(Kim AH ve ark., 2010)	Yüksek: miR-454*, miR-29a, miR-520c-3p, miR-140-3p, miR-767-5p, miR-874, miR-32, miR-573 Düşük: miR-504, miR-145, miR-145*, miR-22*, miR-133b, miR-154*, miR-889	35 BB Hasta 35 Kontrol	Postmortem doku: DLPFC (BA46)	<i>TH</i> (Tyrosine hydroxylase), <i>PGD</i> (phosphogluconate dehydrogenase) <i>GRM3</i> (metabotropic glutamate receptor 3)
(Moreau ve ark., 2011)	Yüksek: miR-330, miR-33, miR-193b, miR-545, miR-138, miR-151, miR-210, miR-324-3p, miR-22, miR-425, miR-181a, miR-106b, miR-193a, miR-192, miR-301, miR-27b, miR-148b, miR-338, miR-639, miR-15a, miR-186, miR-99a, miR-190, miR-339	35 BB Hasta 35 Kontrol	Postmortem doku: PFC	İncelenmemiş
(Miller ve ark., 2012)	Düşük (düzeltilmemiş p-değeri): miR-132, miR-132*, miR-150 Yüksek (düzeltilmemiş p-değeri): miR-320, miR-320c, miR-628-3p, miR-874, miR-105, miR-17*, let-7b, let-7f-1* Yüksek (düzeltilmiş p-değeri): miR-383, miR-32*, miR-490-5p, miR-196b, miR-513-5p, miR-876-3p, miR-449b, miR-297, miR-188-5p, miR-187	31 BB Hasta 34 Kontrol	Postmortem doku: DLPFC	İncelenmemiş
(Smalheiser ve ark., 2014)	Düşük: miR-145-5p, miR-485-5p, miR-370, miR-500a-5p, miR-34a-5p Yüksek: miR-17-5p, miR-579, miR-106b-5p, miR-29c-3p	15 BB Hasta 15 Kontrol	Postmortem doku: PFC (BA10)	İncelenmemiş
(Banigan ve ark., 2013)	Yüksek: miR-29c	9 BB Hasta 13 Kontrol	Postmortem doku: PFC (BA9) ve ekzozomal miRNA	İncelenmemiş

(Bavamian ve ark., 2015)	Yüksek: miR-34a	29 BB Hasta 34 Kontrol	Postmortem doku -serebelar doku ve BB Hastaya özgü nöronlar	<i>ANK3</i> (Ankyrin-3) <i>CACNB3</i> (voltage dependent L-type calcium channel subunit beta-3)
(Zhu ve ark., 2009)	Sadece miR-346 ifade düzeyi incelenmiş, anlamlı değişiklik saptanmamış.	35 BB Hasta, 34 Kontrol 35 Şizofreni	Postmortem doku - DLPFC (BA 46)	<i>CSF2RA</i> (colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit), <i>GRID1</i> (glutamate ionotropic receptor delta type subunit 1)
(Azevedo ve ark., 2016)	Düşük: miR-132, miR-133a miR-212, miR-34a	8 BB Hasta 15 MDB hasta 14 Kontrol	Postmortem doku- Anterior singulat (BA 24)	<i>PDE4B</i> (cAMP-specific 3',5'-cyclic Phospho-diesterase 4B), <i>NCOR1</i> (Nuclear Receptor Co-Activator 1), <i>NCOR2</i> (Nuclear Receptor Co-Activator 2)
(Strazisar ve ark., 2015)	Düşük: miR-137	345 BB Hasta, 426 Şizofreni, 1376 Kontrol	Kan	İncelenmemiş
(Rong ve ark., 2011)	Düşük: miR-134	21 BB Hasta, 21 sağlıklı kontrol	Plazma	<i>Limk1</i> (LIM domain kinase 1)
(Banach ve ark., 2017)	Düşük: miR-499, miR-708 ve miR-1908	17 MDB hasta 15 BB hasta	Kan	<i>KLC2</i> (kinesin light chain 2; connected with microtubular transport)
(Maffioletti ve ark., 2016)	Yüksek: miR-720, miR-140-3p, miR-1973, miR-30d5p, miR-3158-3p, miR-330-5p, miR-378a-5p, miR-4521, miR-21-3p, miR-29c5p, miR-330-3p, miR-345-5p Düşük: hsa-miR-1915-5p, hsa-miR-1972, hsa-miR-4793-3p ve hsa-miR-4440	10 BB Hasta, 10 MBD Hasta 20 Kontrol	Kan	miRNA'ların hedef genlerinin bulunduğu yollar: Wnt sinyal yolağı, mTOR sinyal yolağı, ErbB sinyal yolağı ve insulin sinyal yolağı olarak belirlenmiş.
(Walker ve ark., 2015)	Yüksek: miR-15b, miR-132 ve miR-652	34 BB için ailesel risk taşıyan birey ve 46 sağlıklı kontrol	Kan	İncelenmemiş
(Chen H ve ark., 2009)	Disregüle: miR-34a, miR-152, miR-155, ve miR-221	10 BB Hasta, 10 sağlıklı kardeş	Lenfoblastoid hücre hattı (LCLs)	İlaç etkisi (lityum) incelenmiş.

Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda miRNA'ların BB patogenezinde ve ilaç yanıtlarında rolleri olduğu söylenebilir. Ancak incelemelerde kullanılan doku/hücre kaynaklarındaki farklılıklar, elde edilen sonuçların da farklı olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, hastaya özgü *in vitro* hastalık modellenmesine olanak sağlayan IPS hücrelerinin kullanılması tercih edilmiştir. BB hastalarından elde edilen hücrelerden oluşturulan bu modelde ilk aşamada global miRNA profillemesi yapılarak sağlıklı kontroller ve BB hastaları arasında farklı ifade düzeylerine sahip ve hastalığın patogenezi ile ilişkili olabilecek miRNA'ların belirlenmesi amaçlanmıştır. İkinci aşamada ise, hastalığın tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olan lityumun miR-34a ifade düzeyi üzerine etkisi ve hücrelerdeki fonksiyonel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Ekim 2016-Kasım 2017 tarihleri arasında IPS hücre ile ilgili çalışmalarının tamamı Harvard Üniversitesi Massachusetts General Hospital-Chemical Neurobiology Laboratory’de yürütüldü. Transfeksiyon deneyleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi’nde yürütüldü.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Hücre kültürü çalışmasıdır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmanın ilk aşamasında, BB tanılı hastalardan ve sağlıklı kontrollerden dermal biyopsi ile elde edilen fibroblast hücreleri IPS hücrelerine çevrildi ve deneylerde bu IPS hücreleri kullanıldı.

Transfeksiyon deneylerinde ise 1970’de Biedler ve arkadaşları tarafından oluşturulan ve SK-N-SH hattından köken alan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: miR-34a ve hedef genlerinin ifade düzeyleri

Bağımsız Değişken: Lityum uygulaması

3.6. Veri Toplama Araçları

Bu tez çalışması kapsamında, IPS hücrelerin programlanması Cellular Reprogramming firması tarafından gerçekleştirildi. Nanostring hibridizasyon ve veri analizleri bölümü New Mexico Üniversitesi, Sinirbilimler Anabilim Dalı’nda görev yapmakta olan Doç. Dr. Nikolaos Mellios ile birlikte gerçekleştirildi. IPS hücreler ile ilgili tüm deneyler Harvard Üniversitesi Massachusetts General Hospital-Chemical Neurobiology Laboratory’de, transfeksiyon deneyleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi Sinirbilimler Anabilim Dalı’nda, tez sahibi tarafından gerçekleştirildi.

3.6.1. Dermal Biyopsi ve Fibroblast Eldesi

Tüm dermal biyopsi işlemleri yetkili bir doktor tarafından gerçekleştirildi. Örnekler, 3,0 veya 4,0 mm iğne ile, baskın olmayan ön koldan, subakutan %1 Lidokain enjeksiyonu takiben toplandı ve %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM'den (Gibco) oluşan nakil ortamına aktarıldı. Daha sonra örnekler %10 penisilin/streptomisin ve %10 L-glutamin içeren PBS ile iki kez yıkandı ve 60 mm'lik doku kültür kaplarına aktararak mümkün olan en küçük boyutlara parçalandı. Kültür kapları 15 dk. boyunca 37 °'de tutulduktan sonra yapışmaları gözlemlendi ve üzerlerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM eklendi. Daha sonra fibroblast hücreler, çoğaltma amacıyla %89 DMEM, %10 FBS ve %1 esansiyel olmayan aminoasit solüsyonundan oluşan ortama alındı ve yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra her hat için 1×10^6 hücre/tüp olacak şekilde donduruldu.

3.6.2. IPS Hücrelerinin Programlanması

Sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait fibroblast hücrelerinin IPS hücelere programlanması stabil ve xeno-free koşullar altında Cellular Reprogramming (San Diego, ABD) firması tarafından gerçekleştirildi. IPS hücre programlanması için sentetik mRNA transfeksiyonu yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedenleri arasında entegre olmayan DNA vektörleri veya RNA virüslerinin aksine, yeniden programlanmanın sonunda mRNA ile yeniden programlanma sırasında temizleme aşaması gerek olmaması (mRNA'nın sitoplazmada degrade olması ile hedef hücrelerde ektopik ekspresyonunun hızla azalarak bitmesi sayesinde); rastgele genomik entegrasyon veya kalıcı viral enfeksiyon riskinin olmaması sayılabilir (Warren ve ark., 2010).

Bu amaçla, 3.6.1. bölümde bahsedildiği şekilde çoğaltılarak saklanan fibroblast örnekleri soğuk zincir ile işlemin gerçekleştirileceği firmaya gönderildi. Firmanın kullandığı yöntem akışı ise şu şekilde özetlenebilir:

- Transfeksiyonda kullanılacak mRNA kokteylinin hazırlanması: *in vitro* transkripsiyon reaksiyonları ile LIN28, GFP (Green Fluorescent Protein; yeşil floresans protein) ve dört kanonikal Yamanaka faktörüne (KLF4, c-MYC, OCT4, ve SOX2) ait sentetik mRNA'lar sentezlenmiştir.
- Fibroblast hücrelerinin katyonik lipid aracılı ajanlar kullanılarak sentetik mRNA kokteyli ile transfekte edilmesi: transfeksiyon işlemi, mRNA'ların çok kısa yarı ömrü nedeniyle, 8-10 gün boyunca, her gün tekrarlanmıştır.

- Koloni seçilmesi: 8-10 gün boyunca transfekte edilen hücrelerde IPS kolonilerinin oluşumları gözlenmiş ve primer koloniler seçilerek çoğaltılmıştır.
- Elde edilen IPS hücrelerin karakterize edilmesi: hücrelerin IPS kolonisi oluşturma verimliliği TRA-1-60 seviyesinin ölçülmesi ile, pluripotensilerinin değerlendirilmesi için ise çeşitli pluripotensi belirteçleri (SSEA3, TRA-1-81, Oct3/4 ve Sox2) ile immünfloresans görüntüleme işlemleri gerçekleştirilmiştir (Warren ve ark., 2012). Doğrulama işlemlerini başarı ile geçen IPS örnekleri tarafımıza gönderilmiştir.

3.6.3. Nöral Progenitör Hücre Eldesi ve Kültürü

3.6.3.1. IPS Hücrelerinin Kültüre Alınması

Hücreler teslim alındıktan sonra, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ilk üç pasaj boyunca hücreler 10 µg/mL insan rekombinant rLaminin-521 ile kaplanmış kültür kaplarında, 10 µM Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitörü (Y-27632) ile desteklenmiş NutriStem® XF/FF ortamı kullanarak kültüre edildi. Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızlıca su banyosunda çözülerek 3 ml NutriStem ortamı içinde süspanse hale getirildi ve kültür kabına ekildi. Sadece yeni kültür kaplarına ekilecekleri zamanlarda ortam 10 µM Y-27632 ile desteklendi.

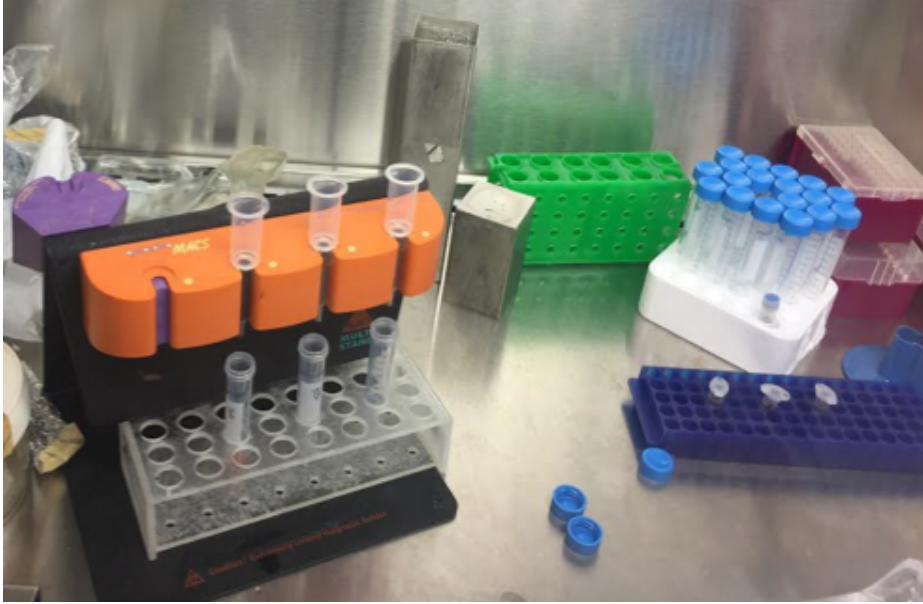
Hücrelerin, canlılık ve sağlık durumları sürekli kontrol edilerek ve her gün ortamları değiştirilerek koloni oluşturmaları beklenildi. Koloniler, farklılaşmamış hücrelerden oluştuğu gözlemlendikten sonra ReLeSR™ (StemCell, Kanada) ile 1:3- 1:5 oranlarında pasajlandı ve taze kaplanmış kültür kaplarına ekildi. Her pasajlama işlemi sırasında her hücre hattı için en az bir tüp hücre %10 DMSO eklenmiş kültür ortamı ile dondurularak saklandı.

Üçüncü pasaj ve sonrasında hücreler Geltrex ile kaplanmış kültür kaplarında ve komplet Essential 8™ Medium (E8 Bazal Medium + E8 Supplement) ortamı kullanılarak idame edildi (Thermo Fisher, ABD).

3.6.3.2. IPS Hücrelerinin Nöral Progenitör Hücrelere Farklılaştırılması

E8 komplet ortamı kullanılarak çoğaltılan IPS hücreleri, koloniler yeterli boyuta ulaştığında (~%80-90 hücre yoğunluğu), steril koşullarda manyetik hücre ayırım sistemi (Magnetic-Activated Cell Sorting; MACS) ile saflaştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, üretici firmanın önerileri doğrultusunda LC kolonları ve insan embriyonik kök hücre belirteci olan TRA-1-60 ile yüklenmiş

manyetik boncuklar (Miltenyi Biotec, Almanya) kullanıldı (Şekil 3). Hücreler antikor taşıyan boncuklarla işaretlendikten sonra, LC kolonlarından geçirildi ve kolona tutunmuş hücreler iki sefer PBS ile yıkanarak saflaştırıldı. Daha sonrasında sayılan TRA-1-60⁺ hücreler, 6-kuyulu kültür kaplarına ve E8 ortamı kullanılarak, 2,5-3x10⁵ hücre/kuyu yoğunluğunda ekildi.



Şekil 3. Deneylerde kullanılan manyetik hücre ayırım sisteminin görüntüsü.

Nöral indüksiyon, ticari bir kit olan Neural Induction Supplement (Gibco, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi (Yan ve ark., 2013). Farklılaşmanın ilk aşamasında kullanılan Neural Induction Media (NIM) komplet ortam Tablo 4’te belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 4. NIM komplet ortamının içeriği

Bileşen	Stok	Hacim
Neurobasal® Medium	1x	490 mL
Neural Induction Supplement	50x	10 mL
Toplam:		500 mL

TRA-1-60 saflaştırmasını takiben ertesi gün, hücrelerin ortamı tamamen aspire edilerek yerine 2ml/kuyu olacak şekilde NIM eklendi. Ortam değiştirilmesinin ikinci gününde hücreler faz kontrast mikroskopunda gözlendi ve nöral olmayan hücre tiplerinin büyümediğinden emin olundu. Hücrelerin %80-90 civarı yoğunluğa ulaşmaları beklendikten sonra (takriben 7-9 gün) PSA-NCAM antikoruna yönelik ikinci MACS seçilimi yapıldı. Bu amaç ile, üretici firmanın önerileri doğrultusunda LC kolonları ve nöral progenitör hücre belirteci olan PSA-NCAM ile yüklenmiş manyetik boncuklar (Miltenyi Biotec, Almanya) kullanıldı. Kolona tutunmuş hücreler üç sefer PBS ile yıkanarak saflaştırıldı ve 15 ml tüpte toplandı. Daha sonrasında sayılan NCAM⁺ hücreler, 6-kuyulu kültür kaplarına, 2,5-3x10⁵ hücre/kuyu gelecek şekilde ekildi. Ekim sırasında NIM komplet ortamı kullanıldı ve ortam 10 µM Y-27632 ile desteklendi.

PSA-NCAM seçiminden iki gün sonra, nöral hücrelerin çoğalmasını sağlamak amacı ile hücre ortamları Neural Expansion Media (NEM) ile değiştirildi. Bu aşamada kullanılan NEM komplet ortamı Tablo 5'te belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 5. NEM komplet ortamının içeriği

Bileşen	Stok	Hacim
Neurobasal® Medium	1x	245 mL
Advanced DMEM/F12 Medium	1x	245 mL
Neural Induction Supplement	50x	10 mL
Toplam:		500 mL

PSA-NCAM pozitif hücreler, %80-90 civarı yoğunluğa ulaştıktan sonra (ortalama 8-10 gün), 1 ml/kuyu Accutase® (Stemcell, Kanada) ile bir dakika muamele edilerek toplandı. Daha sonra 300xg'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet oluşumu sağlandı ve 1:5 oranında, Y-27632 ile desteklenmiş NEM içerisine ekildi. Hücreler pasaj numarası beşe erişene kadar yukarıda anlatıldığı şekilde pasajlandı. Daha sonra hücreler, son MACS seçilimi için toplandı ve iki antikora karşı seçim yapıldı; ilk aşamada CD133⁺ hücreler, PSA-CD133 antikor taşıyan boncuklarla işaretlendikten sonra, LC kolonlarından geçirildi ve kolona tutunmuş hücreler üç sefer PBS ile yıkanarak saflaştırıldı.

İkinci aşamada ise, toplanmış CD133⁺ hücreler, PSA-CD271 antikor ile negatif seçilime maruz bırakıldı. Bu amaçla hücreler, PSA-CD271 antikor taşıyan boncuklarla işaretlendikten sonra

LC kolonlarından geçirildi ve kolona tutunmayan (negatif) hücreler toplandı. Ayrıca kolona tutunan ve nöral krest hücreleri temsil eden CD271⁺ hücreler de toplanarak başka çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu.

Daha sonrasında sayılan CD271⁻/CD133⁺ hücreler, 6-kuyulu kültür kaplarına, 2,5-3x10⁵ hücre/kuyu gelecek şekilde ekildi. Ekim sırasında NEM komplet ortamı kullanıldı ve ortam 10 µM Y-27632 ile desteklendi.

3.6.3.3. Farklılaştırılmış Nöral Progenitör Hücrelerin Karakterizasyonu

Nöral progenitör hücreler (NPH), 24-kuyulu kültür kaplarına yerleştirilmiş ve geltex ile kaplanmış olan cam lamellere, kuyu başına 1x10⁵ hücre gelecek şekilde ekildi. 24 saat tutunmaları beklendikten sonra, %4 paraformaldehit solüsyonu ile 30 dakika süre ile oda sıcaklığında fiks edildi. Fiks edilen hücreler 1 ml/kuyu PBS-T (PBS ve 0,25% Triton X-100) ile permeabilize edilip %5 normal serum ile 30 dakika boyunca blokladı. Primer antikorlar Tablo 6'da belirtildiği şekilde hazırlandı ve 4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

Tablo 6. NPH karakterizasyonunda kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları

Primer Antikor	Marka/Katalog No	Seyreltme oranı	Sekonder Antikor
Rabbit Anti-Nestin	Millipore (AB5922)	1:2000	Anti-Rabbit Alexa Flour-594
Goat Anti-Sox1	Santa Cruz (Sc-17318)	1:200	Anti-Goat Alexa Flour-594
Rabbit Anti-Sox2	Cell signalling (#3579)	1:200	Anti-Rabbit Alexa Flour-594
Rabbit Anti-Musashi	Millipore (AB5977)	1:200	Anti-Rabbit Alexa Flour-594

Ertesi gün cam lameller iki kere PBS ile yıkanarak ilgili 1:500 seyreltilmiş sekonder antikorlar (Alexa Fluor-594) ile işaretlendi (Invitrogen, ABD). Sekonder antikorlar ile 2 saat süre ile inkübe edilen cam lameller bir kere PBS ile yıkandı ve DAPI (1 µg/ml; Invitrogen) ile nükleus boyaması gerçekleştirildi. Tüm işlemlerin bitiminde cam lameller Prolong Antifade Reagent (Invitrogen, ABD) ile cam lam üzerine sabitlendi ve IN Cell Analyzer 6000 Cell Imaging System (GE Healthcare Life Sciences, ABD) kullanılarak görüntü alındı. Her bir kuyudan, her bir antikor

için toplam dokuz adet görüntü çekildi ve görüntüler Image J programı ile birleştirilerek değerlendirildi (NIH, ABD).

3.6.3.4. NPH'lerin Olgun Nöronlara Farklılaştırılması

NPH'lerin olgun nöronlara farklılaştırılmasında büyüme faktörü uzaklaştırma (Growth Factor- Withdrawal) metodu kullanıldı (Kim ve ark., 2015). Bu amaçla hücreler uygun kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra, Neural Induction Supplement ve içeriğindeki farklılaşmayı engelleyerek hücreleri progenitör durumunda tutan büyüme faktörlerinden yoksun bir ortama alındı (Tablo 7).

Tablo 7. Nöron farklılaştırma ortamının içeriği

Bileşen	Stok	Miktar
DMEM	1x	345 mL
F12 Medium	1x	145 mL
B27 Supplement	50x	10 mL
Toplam:		500 mL

İlk hafta her gün, ikinci ve sonraki haftalarda haftada üç kez olmak üzere ortam değişimi gerçekleştirildikten sonra hücrelerden 2. (erken nöronlar), 4. ve 6. hafta (olgun nöronlar) sonlarında karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Nöral hücre karakterizasyonu için **3.6.3.3.** bölümde detayları verilen protokol uygulandı; ancak işlemler sırasında Tablo 8'de verilen antikorlar kullanıldı.

Tablo 8. Karakterizasyonda kullanılan antikorlar ve seyreltme oranları

Primer Antikor	Marka/Katalog No	Seyreltme oranı	Sekonder Antikor
Guinea pig Anti-TUJ1 (Nöron-Spesifik Class III β -Tubulin izoformu)	SynapticSystems (#302 304)	1:1000	Anti-Guinea Alexa Fluor-594
Chicken Anti-MAP2	EnCor Biotech (CPCA-MAP2)	1:2500	Anti-Chicken Alexa Fluor-594

3.6.4. Nanostring İçin Örnek Kütüphanesinin Oluşturulması

Karakterizasyon sonrasında tüm NPH hatları geltrex ile kaplanmış 6-kuyulu kültür kaplarına, kuyu başına 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekildi (Tablo 9). NPH örnekleri ekimden 48 saat sonra hücre kazıyıcı ile kazındı ve santrifüj edildi (1000 rpm, 5 dakika). Pelletler hızlıca kuru buz üzerine alınarak donduruldu (snap-freeze) ve Nanostring analizine kadar -80°C 'de saklandı. Nöral örnekler için hücreler geltrex ile kaplanmış 6-kuyulu kültür kaplarına, kuyu başına 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekildikten 48 saat sonra ortamları farklılaştırma ortamı ile değiştirildi (Tablo 9). Hücreler farklılaştırmanın 2., 4., ve 6. haftalarında hücre kazıyıcı ile kazınarak santrifüj edildi (1000 rpm, 5 dakika). Pelletler hızlıca kuru buz üzerine alınarak donduruldu (snap-freeze) ve Nanostring analizine kadar -80°C 'de saklandı.

Tablo 9. miRNA profillemesi için kullanılan sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait örnek kütüphanesi

	Hat Numarası	Nanostring Örnek Kütüphanesi			
		NPH	2-haftalık nöronlar	4-haftalık nöronlar	6-haftalık nöronlar
BB Hastası	BB-LR	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	BB-LNR-1	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	BB-LNR-2	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	GM05224*	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
Sağlıklı Kontrol	SK-1	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	SK-2	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	SK-3	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar
	GM08330*	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar	3 tekrar

Nanostring için oluşturulan örnek kütüphanesine, başka bir proje kapsamında farklılaştırılmış ve karakterize edilmiş bir sağlıklı kontrol (GM08330; sağlıklı baba) ve bir BB hastası (GM05224; hasta oğul) örneği de dahil edildi. Bu iki hücre hattı Coriell Institute for Medical Research tarafından bağışlanmış olup, iki bilimsel yayında yer almıştır [(Bavamian ve ark., 2015); (Madison ve ark., 2015)].

3.6.5. Total RNA İzolasyonu ve miRNA Örneklerinin Hazırlanması

Total RNA izolasyonu miRNeasy Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapıldı. RNA konsantrasyonları ve kalitesi Nanodrop 2000 ve Qubit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlendi. Tüm örneklerden miRNA profillenmesi, miRBase v21 veritabanında bulunan toplam 800 adet miRNA'nın probunu içeren nCounter Human miRNA Expression Assay Kit v3 (Nanostring Technologies, ABD) kullanılarak yapıldı.

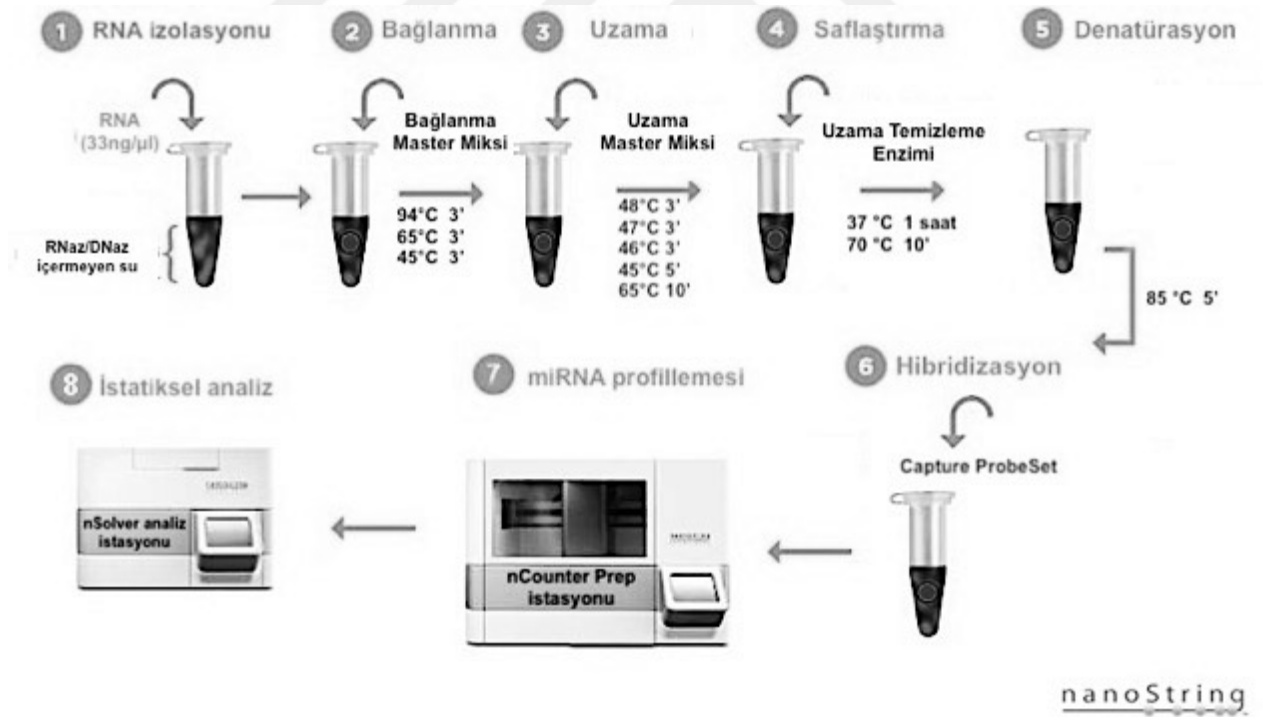
Kit protokolüne uygun olarak her bir örnek, 33 ng/μL RNA içerecek şekilde (toplamda 100 ng/örnek) RNaz içermeyen su ile seyreltildi. Kit içeriğinden çıkan miRNA Assay kontrolü de temiz bir tüp içerisinde 1:500 oranında RNaz içermeyen su ile seyreltildi ve buz üzerine kondu. Temiz bir başka tüp içerisinde 13 μL Bağlanma Tamponu, 26 μL nCounter miRNA Tag Reagent ve 6,5 μL miRNA Assay kontrol miksi karıştırılarak Bağlanma Master Miksi hazırlandı. Şerit PCR tüplerine, tüp başına 3,5'er μL Bağlanma Master Miksi eklendikten sonra tüpler örnek isimleri ile etiketlendi ve üzerlerine her bir örneğe ait 3 μL seyreltilmiş RNA (3,5 ng/μL) eklendi. Kapakları kapatılarak hafifçe vortekslenen tüpler PCR cihazında Bağlanma protokolünde tutuldu (Tablo 9). Aynı zamanda, temiz bir tüpte 19,5 μL PEG ve 13 μL Uzama Tamponu karıştırılarak Uzama Master Miksi hazırlandı. Protokol bitiminde her tüpe, tüp başına 2,5 μL Uzama Master Miksi eklendi ve hafifçe vortekslenen tüpler PCR cihazına geri kondu (48°C'de 5 dakika). Süre bitiminde tüplere 1 μL/ tüp Ligaz eklendi, ekleme işlemi sırasında tüpler ısı bloğunda bırakılarak sıcaklık değişmesi önlenildi. Ekleme işlemi takiben kapaklar kapatıldı ve Uzama Protokolü başlatıldı (Tablo 10). Protokol bitiminde tüplere 1 μL Uzama Temizleme Enzimi eklendi ve hafifçe vorteksledikten sonra Saflaştırma Protokolü başlatıldı. Protokol bitiminde tüpler cihazdan alındı ve 40 μL/tüp RNaz içermeyen su eklenerek bir sonraki aşamaya kadar -20 °C'de saklandı.

Tablo 10. Bağlanma, uzama ve saflaştırma protokolleri

Bağlanma protokolü		Uzama Protokolü		Saflaştırma protokolü	
Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
94 °C	3 dakika	48 °C	3 dakika	37 °C	1 saat
65°C	3 dakika	47°C	3 dakika	70 °C	10 dakika
45°C	3 dakika	46°C	3 dakika	4 °C	∞
48°C	∞	45°C	5 dakika		
		65°C	10 dakika		

3.6.6. Nanostring Hibridizasyonu ve Veri Analizi

Hibridizasyon işlemleri kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak örnek başına 10 µL Reporter CodeSet ve 10 µL hibridizasyon tamponu olacak şekilde hazırlanan karışım temiz bir şerit PCR tüplerine bölündü (20 µL/tüp). Bir önceki bölümde bahsedildiği şekilde hazırlanmış miRNA örnekleri 85°C’de 5 dakika tutularak denatüre edildi ve derhal buz üzerine kondu. PCR cihazının 65 °C’ye gelmesi beklendikten sonra her bir PCR tüpüne, 5 µL denatüre edilmiş miRNA örneği ve 5’er µL Capture ProbeSet konarak hızlıca cihaza yüklendi. Hibridizasyon işleminin gerçekleşmesi için örnekler cihazda en az 12 saat tutuldu. Daha sonra örnekler PCR cihazından alınarak son aşama olan miRNA profillemesi için nCounter Prep istasyonuna yüklendi. Tüm basamakların genel bir özeti Şekil 4’te verildi.



Şekil 4. Nanostring miRNA profillemesinin tüm basamaklarının özeti.

Nicel bir karşılaştırma yapılabilmesi için elde edilen veriler nSolver analiz yazılımı (NanoString Technologies, ABD) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda normalize edildi (Tablo 11). Normalizasyon sonrası kat değişimlerinin hesaplanmasında her miRNA probu için tekrarlı örneklerin geometrik ortalamaları kullanıldı ve gruplar arasında en az 1,5-kat değişim gösteren miRNA'lar listelendi.

Tablo 11. Normalizasyonda kullanılan kontrol problemlerine ait bilgiler

Kontrol Tipi	Sayısı	Tanımı	Kullanım amacı
Pozitif Kontroller	6	Belirli konsantrasyonlarda ve CodeSet'e dahil edilmiş sentetik mRNA hedefleri tanıyan problemlerdir (Bağlanma basamağına ihtiyaç duymazlar).	Pozitif kontroller nSolver'daki kalite kontrol metriklerinde kullanılır. Girdi miktarlarına doğrusal yanıtı doğrular ve düşük giriş sinyalinin (low-signal input) arka plan (background signal) değerinin üzerinde olduğunu onaylar.
Negatif Kontroller	8	Belirli konsantrasyonlarda ve CodeSet'e dahil edilmemiş sentetik mRNA hedefleri tanıyan problemlerdir (Bağlanma basamağına ihtiyaç duymazlar).	Negatif Kontrol, nSolver'daki QC metrikleri tarafından ligasyondan bağımsız arka plan sinyalini belirlemek için kullanılır. Bu sinyal daha sonra miRNA'nın ifadesini tanımlamak için eşik (threshold) ayarında kullanılabilir.
Bağlanma Pozitif Kontrolleri	3	Örnek hazırlık kitine (hedefler, köprüleri ve miRtagleri içerir) dahil edilmiş sentetik miRNA hedefleri tanıyan problemlerdir.	Bağlanma pozitif kontrolleri örnekteki miRNA'lardan bağımsız olarak bağlanma etkinliğinin takibinde kullanılır.
Bağlanma Negatif Kontrolleri	3	Örnek hazırlık kitine dahil edilmemiş sentetik miRNA hedefleri tanıyan problemlerdir.	Bağlanma negatif kontrolleri spesifik olmayan bağlanma takibinde kullanılır.
mRNA Referans Kontrolleri	5	Dokuların genelinde ifade edilen endojen mRNA hedefleri tanıyan problemlerdir.	mRNA ölçümü, hücre içermeyen örneklerde hücresel kontaminasyon olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Bağlanma aşaması başarısız olsa bile, örneklerde mRNA saptanabilmektedir.

3.6.7. miR-34a İfade Düzeylerinin RT-qPCR Tekniğı ile Doğrulanması

İstatiksel olarak anlamlı farklılığı Nanostring tekniğı ile gösterilen miRNA'lardan biri olan hsa-miR-34a-5p'nin ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) tekniğı ile doğrulandı. Bu amaçla Tablo 9'da belirtilen örnek kütüphanesi tekrar oluşturuldu ve pelletlerden total RNA izolasyonu miRNeasy Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. RNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (Nanodrop 2000/3000) belirlendi. cDNA sentezi, örnek başına 500 ng RNA kullanılarak High Capacity cDNA synthesis Kit (Thermo, ABD) kitiyle gerçekleştirildi.

RT-qPCR deneylerinde hsa-miR-34a-5p'ye ve referans genlere (U6 ve SNORD_95) özgül proplar (Taqman™ miRNA Assay, Katalog No: 4427975) ve TaqMan™ Universal PCR Master Miksi kullanıldı. Reaksiyonlar LightCycler®480 (Thermo, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Referans gen olarak U6 ve SNORD_95 kullanıldı ve miR-34a düzeylerindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre analiz edildi (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.6.8. miRNA Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Yolak Analizi

miR-34a-5p'nin hedeflediğı olası genler, biyoinformatik yaklaşımlar ve güncel veri tabanları kullanılarak belirlendi. Hedef genlerin belirlenmesinde miRWalk2.0 veri tabanı tarafından sağlanan karşılaştırmalı platform (miRWalk, miranda, miRbridge, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22 ve Targetscan algoritmaları arasında) kullanıldı (Dweep ve Gretz, 2015). En az dört algoritma tarafından ortak olarak tahmin edilen genler (toplam 2251 adet gen) gen ontoloji ve yolak analizlerine dahil edildi.

Gen Ontoloji (GO) Analizi: Belirlenen ortak genlerin gen ontoloji (GO) analizleri DAVID v6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp> Sürüm 6.8; Ekim 2016) programı kullanılarak, standart parametreler kullanılarak gerçekleştirildi. Analizlerin değerlendirmesinde $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ve her bir kategori için (GOTERM_BP: biyolojik süreç; GOTERM_CC: hücresel bileşen; GOTERM_MF: moleküler fonksiyon) $p < 0,05$ değerine sahip beşten fazla terim olması durumunda ilk 10 terim alındı. Tabloda ayrıca düzeltilmiş p-değerleri yanlış bulgu oranı (False Discovery Rate=FDR) verilerine de yer verildi.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ve Reactome Yolak Analizi: Analize dahil edilen hedef genlerin yer aldığı hücre içi yolların belirlenmesi için KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ve Reactome (<http://www.reactome.org>) yolak analizi gerçekleştirildi. Analizlerin değerlendirilmesinde $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

PITA (Probability of Interaction by Target Accessibility) Analizi: PITA algoritması, belirlenen her miRNA-hedef çifti için toplam etkileşim enerjisini hesaplayarak her bir bağlanma bölgesi için bir skor üretmektedir. PITA skoru, tek bir miRNA'nın belirli bir anlatım yapmayan bölge (UTR) üzerinde tahmini etkileşim enerjisini belirtir ve bir $\Delta\Delta G$ değerine sahiptir. $\Delta\Delta G$ değerinin serbest enerjiyi ifade ettiği düşünüldüğünde, daha düşük (daha negatif) $\Delta\Delta G$ değerleri, miRNA'nın verilen yere daha güçlü bağlanma gerçekleştireceğini işaret etmektedir. Genel olarak skorun -10'dan düşük olduğu durumlarda, miRNA'nın endojen ifade düzeylerinde fonksiyonel olması muhtemeldir. Bununla birlikte, yüksek miRNA konsantrasyonlarında, -10'dan yüksek skorlarda da fonksiyonel bir baskılanmanın meydana gelebileceğini işaret etmektedir.

miR-34a'nın hedeflediği olası tüm genler incelendiğinde *BDNF* (Brain-Derived Neurotrophic Factor; Beyin kökenli büyüme faktörü) geni, dahil edilen sekiz veri tabanı içerisinde sadece tek bir veri tabanında tahmini gen olarak listelenmektedir. Bu nedenle, ek olarak PITA analizi gerçekleştirilerek, farklı *BDNF* transkriptleri ile miR-34a-5p arasındaki olası ilişki incelendi.

3.6.9. mRNA İfadesinin Analizi

mRNA düzeylerindeki değişimler RT-qPCR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla işlemler, ilgilenilen genlere ve referans genlere (*GAPDH* ve *RPLP0*) özgül probalar (TaqMan™ Gene Expression Assay, Katalog No: 4331182) ve TaqMan® Universal PCR Master Miksi kullanılarak, LightCycler® 480 (Thermo, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Referans gen olarak *GAPDH* ve *RPLP0* problemleri kullanıldı ve gen ifade düzeylerindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre analiz edildi (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.6.10. Lityumun NPH Canlılığına ve Çoğalmasına Etkisinin Belirlenmesi

Real Time Glo Yöntemiyle Hücre Canlılığının Belirlenmesi: NPH'lerin lityum inkübasyonuna bağlı canlılığının ve çoğalmasının değişiminin belirlenmesi amacıyla Real Time-Glo™ MT boyası (Promega, ABD) kullanıldı. Bu boya, patentli içeriği sayesinde aynı kuyudan 72 saate kadar sürekli ölçüm alınmasına imkân sağlamaktadır. Hücreler 96-kuyulu kültür kaplarına, kuyu başına 1×10^5 hücre gelecek şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelerin üzerine doz ve zaman eğrisi hazırlamak amacıyla değişik dozlarda lityum (0-10 mM) ile birlikte Real Time-Glo™ MT boyası da eklendi. Kültür kabı 37 °C'ye kaldırıldı ve ilk ölçüm için 120 dakika beklendi. İlk luminesans ölçüm T_0 olarak kullanıldı ve tüm diğer ölçümler ekim normalizasyonu için T_0 değerinde oranlandı. Diğer luminesans ölçümler ise inkübasyonun 6. saatinden itibaren 6 saatte bir olmak üzere 72 saat boyunca mikropate okuyucu ile alındı (Envision, PerkinElmer).

PrestoBlue Yöntemiyle Hücre Canlılığının Belirlenmesi: NPH'lerin lityum inkübasyonuna bağlı canlılık değişiminin doğrulanması amacıyla PrestoBlue boyası (Thermo, ABD) kullanıldı. Resazurin tabanlı bir boya olan PrestoBlue boyası metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenerek floresan ışına verebilen rezorufine dönüştürülmektedir. Bu amaçla NPH'ler 96-kuyulu kültür kaplarına, kuyu başına 1×10^5 hücre gelecek şekilde ekildi. Zaman eğrisi hazırlamak amacıyla hücreler, 1mM lityum ile 24-72 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücrelerin ortamlarına, ortam hacminin 1:10 oranında PrestoBlue boyası eklendi ve hücre kültür kabı 37°C'de 30 dakika bekletildi. Süre bitiminde floresans sinyal ölçümü (560 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon) mikropate okuyucu ile alındı (Envision, PerkinElmer). Sonuçlar kontrole oranlanarak yüzde (%) olarak verildi.

3.6.11. Lityumun Nörojeneze Etkilerinin Belirlenmesi

Farklılaştırılmaya alınmış NPH'lerde nörojenizin belirlenmesi amacıyla ilk olarak immunfloresans boyamayı takiben nörit uzunlukları ölçüldü. Bu amaçla NPH'ler 96-kuyulu kültür kaplarına, kuyu başına 5×10^4 hücre gelecek şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelerin ortamları lityum içeren veya içermeyen farklılaştırma ortamı ile (Tablo 7) değiştirildi. Toplam bir hafta süre ile, gün aşırı ortamları değiştirilerek farklılaştırılan hücreler süre bitiminde %4 paraformaldehit solüsyonu ile 10 dakika fikse edildi. Fikse edilen hücreler 1 ml/kuyu PBS-T (PBS ve 0,25% Triton X-100) ile

permeabilize edilip %5 normal serum ile 30 dakika boyunca bloklandı. İmmunfloresans boyama için Anti-MAP2 antikoru (EnCor Biotech, CPCA-MAP2) ve nükleus boyaması için DAPI (1 µg/ml; Invitrogen) kullandı ve 3.6.3.3. bölümde detayları verilen protokol uygulandı.

Boyama sonrasında IN Cell Analyzer 6000 hücre görüntüleme sistemi (GE Healthcare Life Sciences, ABD) kullanılarak her kuyu için sekiz görüntü alındı. Image J programı yardımıyla her bir görüntüde en az 30 nöritin uzunluğu ölçüldü ve değerler grup ortalaması alınarak sunuldu.

Nörogenez ayrıca sinaptik genlerden *SYT1*, *SYN* ve *SYP*; yetişkin nörogenez belirteçlerinden *DCX* ve nöronal belirteç *MAP2* genlerinin ifade düzeylerinin analizleri ile de incelendi. Bu amaçla genlere özgü Predesigned- Taqman Gene Expression Assay problemleri ile 3.6.9. bölümde detayları verilen protokol kullanılarak RT-qPCR gerçekleştirildi.

3.6.12. SH-SY5Y Hücrelerinin miR-34a ile Transfeksiyonu

Transfeksiyon deneylerinde nöron benzeri hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri kullanıldı. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Biochrom AG, Almanya), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM:F/12 ortam kullanılarak kültüre edildi.

Yapılan PITA tahmini hedef gen analizi sonrasında miR-34a ile *BDNF* geni arasında sınırda bir ilişki bulunmasının üzerine, SH-SY5Y hücrelerinde miR-34a aşırı ifade deneyleri tasarlandı. SH-SY5Y hücreleri 6-kuyulu plaklara, kuyu başına 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekildi. Transfeksiyon işlemlerinde HiPerFect Transfeksiyon ajanı ile, ticari olarak temin edilmiş sentetik miR-34a mimiği ve kontrol olarak herhangi bir miRNA'yı hedeflemeyen bir oligonükleotid dizisi (Kontrol mimiği) kullanıldı (Qiagen, ABD). Transfeksiyon için uygun miRNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla doz denemesi (25-100 nM arası) yapıldı. Daha sonra seçilen dozda (50 nM) miR-34a veya kontrol mimiği ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. RNA izolasyonu transfeksiyondan 48 saat sonra, miRNeasy Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak yapıldı.

İlk aşamada transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla miR-34a düzeyleri ölçüldü. Daha sonra miR-34a aşırı ifadesinin BDNF üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla RT-qPCR ile BDNF mRNA düzeyleri ve BDNF ELISA kiti ile de kültür ortamına salınan protein düzeyleri ölçüldü.

3.6.13. BDNF ELISA

SH-SY5Y hücreleri miR-34a mimiği ile transfekte edildikten sonra, hücreler tarafından kültür ortamına salınan BDNF protein miktarı 'BDNF ELISA Kit'i (Boster Biomedical, Çin) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde belirlendi (Kit hassasiyeti <15 pg/ml; Ölçüm aralığı 31,2-2000 pg/ml). Total protein eldesi için ise her bir kuyuya proteaz inhibitörleri içeren lizis solüsyonu eklenerek hücreler lizise uğratıldı (15 dakika, buz üzerinde). Sonrasında 15000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek total protein elde edildi ve konsantrasyonları BCA protein analiz yöntemi ile, üretici firma protokolüne uygun şekilde belirlendi (Thermo, ABD). Her kuyudan ölçülen değer (pg/ml) total protein miktarına (mg/ml) oranlanarak normalize edildi ve elde edilen değerler pg/mg şeklinde ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın takvimi şu şekildedir:

	Ekim- Aralık 2016	Ocak- Mart 2017	Nisan- Haziran 2017	Temmuz- Aralık 2017	Ocak- Haziran 2018
IPS hücrelerinin nöral hücelere farklılaştırması ve karakterizasyonu	X	X			
Hücrelerin miRNA profillerinin incelenmesi ve doğrulanması		X			
miR-34a hedef genlerinin yolak analizi ve RT-qPCR ile doğrulanması		X	X	X	
Lityumun miR-34a düzeylerine etkisinin moleküler ve fonksiyonel olarak incelenmesi			X	X	
Literatür Okuma	X	X	X	X	X
Tez yazımı					X

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deney sonuçlarının istatistik analizleri SPSS v.19.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm deneylerde ikili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafikler üzerinde * işareti $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ve **** $p \leq 0,0001$ değerini ifade etmektedir. Veriler aksi belirtilmedikçe ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi.

Nanostring miRNA profillemeye sonuçlarının analizi ise nSolver Analysis Software kullanılarak gerçekleştirildi. Kat değişimlerinin hesaplanmasında her miRNA probu için tekrarlı örneklerin geometrik ortalamaları kullanıldı ve en az 1,5-kat değişim görülen miRNA'lar listelendi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın en önemli sınırlılığı, çalışmaya dahil edilen BB hasta ve kontrol sayısının az olmasıdır. Hastaya özgü hücreler ile gerçekleştirilen çalışmalara, mali ve iş gücü büyüklüğü nedeniyle genellikle az sayıda örnek dahil edilse de (Tablo 2), elde edilen sonuçların hastalığın doğasına ışık tutabilmesi için daha fazla örnekleme ihtiyaç duyulmaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma, Massachusetts Hastanesi Etik Kurulu tarafından 2009P000238/PHS protokolü ve karar numarası ile 29/12/2016 tarihinde onaylanmıştır.

4. BULGULAR

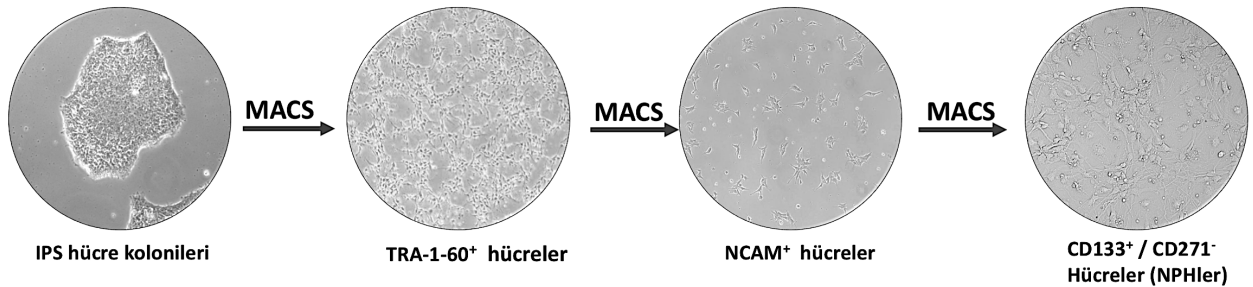
4.1. NPH Hücreslerinde Nöral Kök Hücre Belirteç Proteinlerinin İfadesi

Çalışmamıza üç BB hastası ve üç sağlıklı kontrolden alınmış olan doku örneklerinden oluşan IPS hücre örnekleri dahil edildi (Tablo 12). BB hastalarının ilaç geçmişleri incelendiğinde, bir hastanın (BB-LR) lityum tedavisine yanıt verdiği (Lityum-Responder), diğer iki hastanın ise (BB-LNR-1 ve BB-LNR-2) lityum tedavisi ile tam iyileşme görmeyerek ek diğer ilaçlar kullandığı öğrenildi (Lityum-Non-responder).

Tablo 12. Çalışma kapsamında NPH üretilen sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait bilgiler

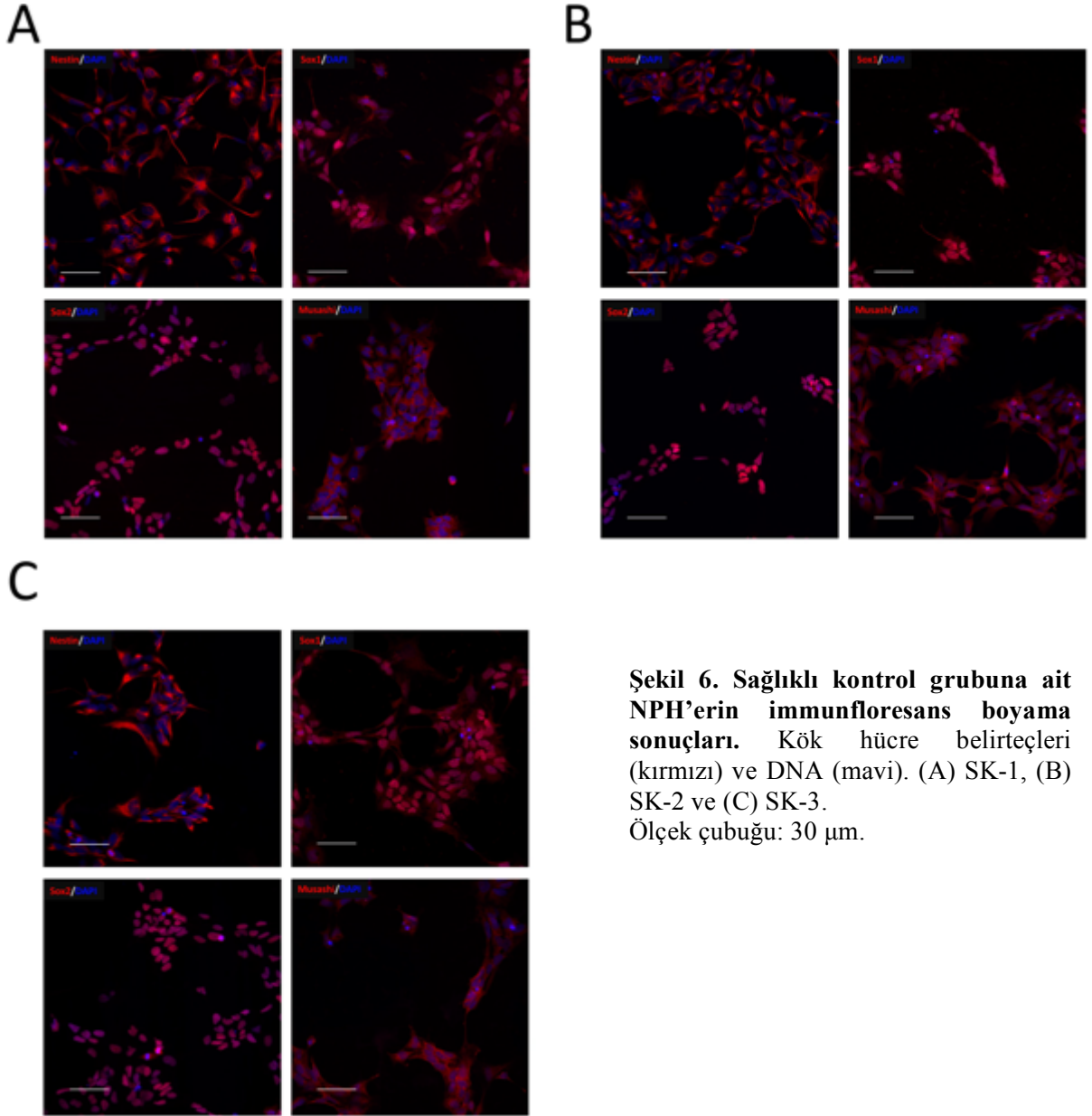
Hat Numarası	Durum	Yaş	Cinsiyet	
SK-1	Sağlıklı Kontrol	53	Erkek	
SK-2	Sağlıklı Kontrol	37	Kadın	
SK-3	Sağlıklı Kontrol	45	Erkek	
BB-LR	Bipolar Bozukluk	51	Erkek	Lityum-Responder
BB-LNR-1	Bipolar Bozukluk	52	Erkek	Lityum-Non-responder
BB-LNR-2	Bipolar Bozukluk	49	Kadın	Lityum- Non-responder

Elde edilen IPS hücreleri sırasıyla TRA-1-60, NCAM ve CD133/CD271 antikorları ile manyetik hücre ayırımlarına tabi tutuldu ve hücreler her aşama sonrasında faz-kontrast mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 5).

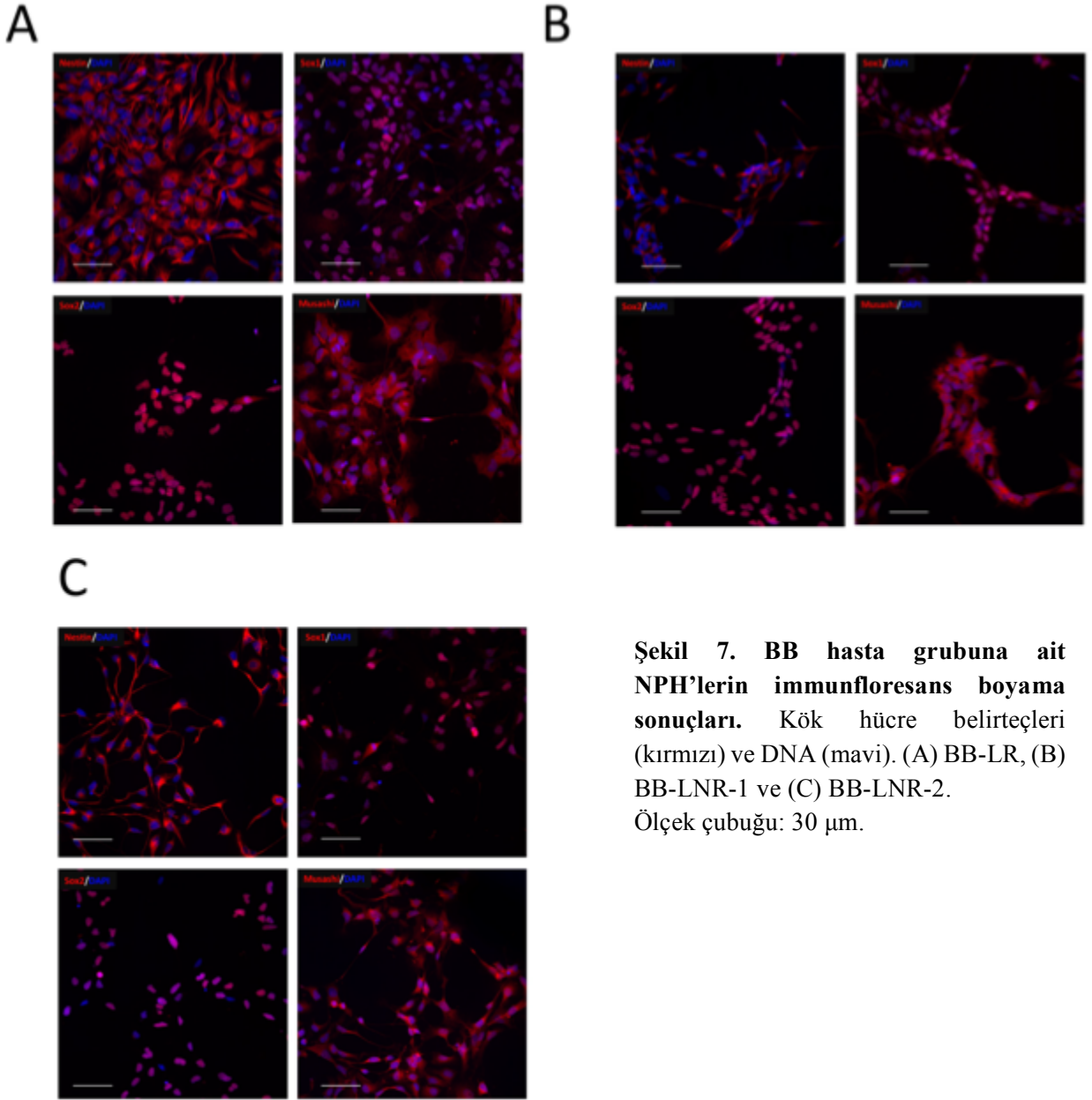


Şekil 5. IPS hücrelerinin NPH'lere farklılaştırma basamaklarında hücrelerin temsili bir görüntüsü.

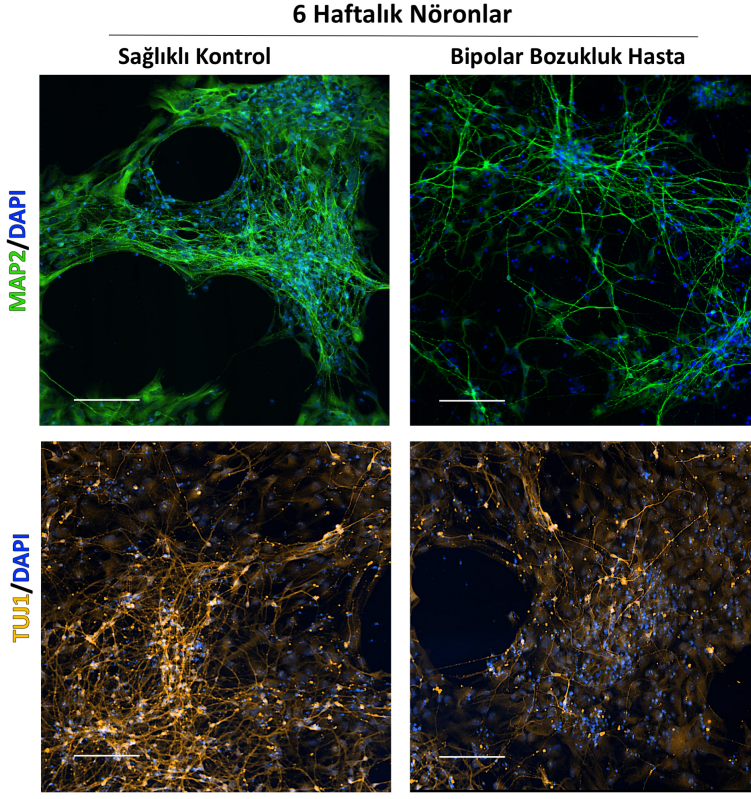
IPS hücrelerden farklılaştırıldıktan sonra, elde edilen NPH hatları nöral kök hücre belirteçleri (Nestin, Sox1, Sox2 ve Musashi) kullanılarak karakterize edildi. Sağlıklı kontrol grubuna (Şekil 6A-C) ve BB hasta grubuna ait tüm hatlar (Şekil 7A-C) kalite kontrolünü (QC) geçerek dört farklı kök hücre belirteci için de pozitif görüntü verdi.



Şekil 6. Sağlıklı kontrol grubuna ait NPH’erin immunfloresans boyama sonuçları. Kök hücre belirteçleri (kırmızı) ve DNA (mavi). (A) SK-1, (B) SK-2 ve (C) SK-3. Ölçek çubuğu: 30 µm.



NPH karakterizasyonunu takiben, elde edilen hücrelerin olgun nöronlara farklılaşıp farklılaşmadıklarını kontrol etmek amacıyla nöronal belirteçler protein düzeyinde incelendi. Bu amaçla hücreler farklılaşmanın 6. haftasında fiks edilerek nöronal belirteçlerden MAP2 ve TUJ1 (nöron spesifik β -Tubulin) proteinlerine özel antikorlar ile boyandı. Tüm NPH hücre hatlarının başarılı şekilde nöronlara farklılaştığının gözlenmesi üzerine diğer deneylere geçildi (Şekil 8).



Şekil 8. Sağlıklı kontrol ve BB hastalarına ait 6-haftalık nöronların immunfloresans boyama sonuçlarının temsili görüntüsü. Nöron belirteçleri (yeşil, turuncu) ve DNA (mavi). Ölçek çubuğu: 30 µm.

Çalışmanın miRNA profillenmesi aşamasına, başka bir proje kapsamında farklılaştırılmış ve karakterize edilmiş bir sağlıklı kontrol (GM08330; sağlıklı baba) ve bir BB hastası (GM05224; hasta oğlu) örneği de dahil edildi. Bu iki hücre hattı Coriell Institute for Medical Research tarafından bağışlanmış olup, iki bilimsel yayında yer almıştır [(Bavamian ve ark., 2015); (Madison ve ark., 2015)].

4.2. NPH ve Nöronlarda miRNA İfade Düzeylerinin Profillenmesi

Tüm örneklerden miRNA profillenmesi nCounter Human miRNA Expression Assay Kit v3 (Nanostring Technologies, Seattle, ABD) ile yapıldı. Sağlıklı kontrollere ve BB hastalarına ait örneklerde toplam 799 adet miRNA'nın ifade düzeylerinin incelenmesi sonucunda kat değişimi 1,5-kattan büyük olan miRNA'lar listelendi (Tablo 13).

Tablo 13. Nanostring miRNA profillemeye sonuçları. miRNA ifadesindeki değişimler, sağlıklı kontrol grubu örneklerine göre kat değişimi olarak hesaplanmış ve değişim oranı 1,5-kattan büyük olan miRNA tabloda verilmiştir ; **kırmızı** işaretliler artan, **mavi** işaretliler azalan miRNA'ları temsil etmektedir.

miRNA adı	Kat değişimi (BB/Kontrol)
NPH'ler	
hsa-let-7a-5p	76,25
hsa-let-7d-5p	30,65
hsa-miR-98-5p	28,01
hsa-let-7i-5p	24,6
hsa-let-7g-5p	18,36
hsa-let-7f-5p	15,15
hsa-let-7c-5p	10,5
hsa-let-7b-5p	8,21
hsa-let-7e-5p	5,67
hsa-miR-100-5p	4,57
hsa-miR-491-5p	4,26
hsa-miR-125b-5p	3,19
hsa-miR-582-5p	3,11
hsa-miR-9-5p	2,58
hsa-miR-125a-3p	2,56
hsa-miR-99a-5p	2,51
hsa-miR-125a-5p	2,3
hsa-miR-23a-3p	2
hsa-miR-99b-5p	1,76
hsa-miR-149-5p	1,54
hsa-miR-643	-4,79
hsa-miR-126-3p	-4,58
hsa-miR-92a-3p	-3,51
hsa-miR-106a-5p+hsa-miR-17-5p	-3,47
hsa-miR-548y	-2,59
hsa-miR-6724-5p	-2,28
hsa-miR-4488	-2,23
hsa-miR-522-3p	-2,04
hsa-miR-4455	-1,83
hsa-miR-92b-3p	-1,8
hsa-miR-874-5p	-1,69
hsa-miR-128-1-5p	-1,62

miRNA adı	Kat değişimi (BB/Kontrol)
2-haftalık nöronlar	
hsa-let-7b-5p	4,18
hsa-miR-23a-3p	3,02
hsa-miR-34a-5p	2,8
hsa-miR-24-3p	2,1
hsa-miR-873-5p	-15,9
hsa-miR-204-5p	-8,52
hsa-miR-182-5p	-4,93
hsa-miR-514b-5p	-3,13
hsa-miR-1249-3p	-3
hsa-miR-664b-5p	-2,59
hsa-miR-629-5p	-2,09
hsa-miR-107	-2,05
hsa-miR-548h-5p	-2
hsa-miR-374b-5p	-1,75
hsa-miR-324-5p	-1,73
hsa-miR-9-5p	-1,69
hsa-miR-95-3p	-1,65

4-haftalık nöronlar	
hsa-miR-34a-5p	3,24
hsa-miR-146b-3p	-3,41
hsa-miR-3605-3p	-2,34
hsa-miR-548h-5p	-1,9
hsa-miR-301a-5p	-1,86
hsa-miR-483-5p	-1,83
hsa-miR-9-5p	-1,75
hsa-miR-297	-1,66

6-haftalık nöronlar	
hsa-miR-34a-5p	2,4
hsa-miR-486-3p	-2,7
hsa-miR-425-5p	-2,03
hsa-miR-629-5p	-1,72
hsa-miR-590-5p	-1,58
hsa-miR-324-5p	-1,55

BB hasta NPH örneklerinde 20 miRNA'nın seviyesinin yüksek, 12 miRNA'nın seviyesinin ise düşük olduğu saptandı. Nöronal örnekler incelendiğindeyse, 2-haftalık nöronlarda dört miRNA'nın seviyesinin yüksek, 13 miRNA'nın seviyesinin düşük olduğu; 4-haftalık nöronlarda

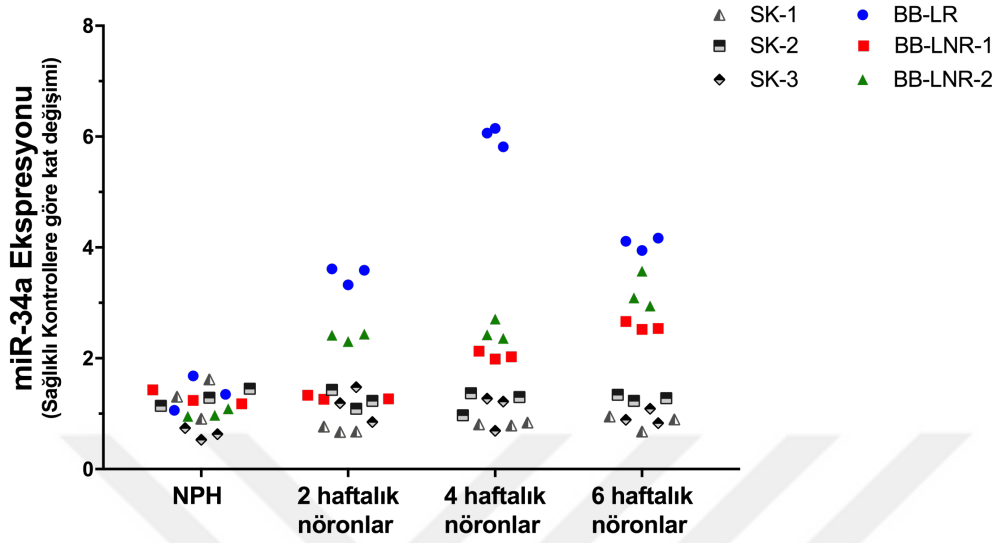
bir miRNA'nın seviyesinin yüksek, yedi miRNA'nın seviyesinin ise düşük olduğu görüldü. Benzer şekilde 6-haftalık nöronlarda da sadece bir miRNA'nın seviyesinin yüksek, beş miRNA'nın seviyesinin ise düşük olduğu saptandı.

Analize dahil edilen örnek sayısının oldukça az olması nedeniyle (BB hasta sayısı=4; sağlıklı kontrol sayısı=4) yapılan analizler istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında, BB hasta örneklerinde tüm zaman noktalarında stabil artış gösteren (2-haftalık erken evre nöronlarda 2,8-kat; 4-haftalık nöronlarda 3,24-kat ve 6-haftalık nöronlarda 2,4-kat artış), ayrıca literatürdeki diğer çalışmalarda da BB ile ilişkili olduğu bildirilmiş olan (Tablo 3) **hsa-miR-34a-5p** üzerine odaklanıldı (ilerleyen bölümlerde kısaca **miR-34a** olarak belirtilecektir).

4.3. NPH ve Nöronlarda miR-34a İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

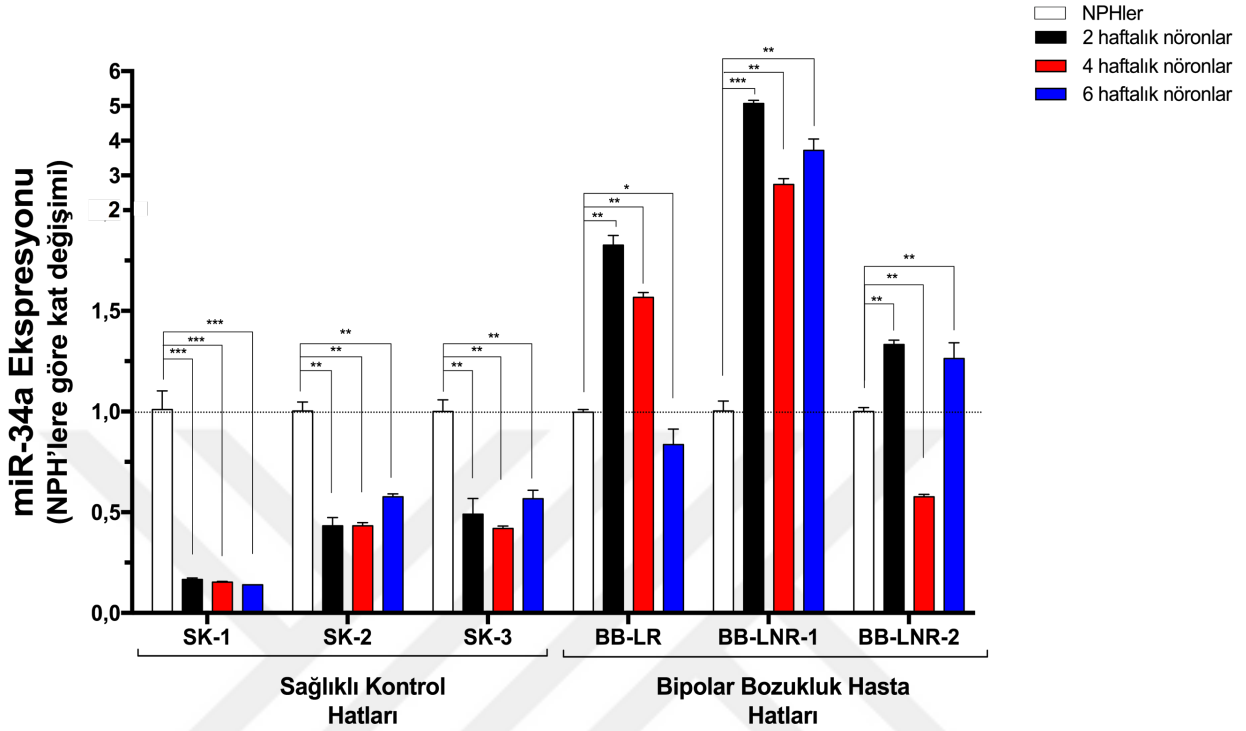
Nanostring sonuçları miR-34a ifade düzeylerinin 2-, 4- ve 6-haftalık nöronlarda yüksek olduğu gösterdi. Bunun üzerine, bu artışın doğrulanması amacıyla aynı zaman noktalarında miR-34a seviyeleri RT-qPCR kullanılarak belirlendi. Bu deneyler için öncelikle Tablo 9'da belirtilen zaman noktalarına sadık kalınarak yeni bir örnek kütüphanesi oluşturuldu ve her bir örnek için en az üç biyolojik tekrar analiz edildi. Elde edilen sinyaller, referans olarak kullanılan U6 ve SNORD_95 sinyallerinin geometrik ortalamasına oranlanarak normalize edildi ve bağıl miRNA ifadesi $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. BB hasta örneklerinde ölçülen miR-34a düzeyleri, sağlıklı kontrollerden elde edilen ölçümlerin ortalamasına oranlandı ve sağlıklı kontrollere göre kat değişimleri Şekil 9'da verildi.

Nanostring sonuçlarıyla uyumlu şekilde BB hastalarına ait NPH örneklerinde ölçülen miR-34a seviyeleri sağlıklı kontrollere benzerlik göstermektedir (kontrol ortalaması=1, BB hasta ortalaması=1,121; Mann-Whitney U testi, $p=0,489$). Öte yandan BB hastalarına ait 2-haftalık nöronlarda miR-34a düzeyinin sağlıklı kontrol ortalamasına kıyasla 2,39-kat arttığı (Mann-Whitney U testi, $p=0,0012$); 4-haftalık nöronlarda bu artışın 3,52-kat (Mann-Whitney U testi, $p<0.0001$), 6-haftalık nöronlarda ise 3,28-kat (Mann-Whitney U testi, $p<0.0001$) olduğu saptandı.



Şekil 9. Sağlıklı kontrol ve BB örneklerinde miR-34a ifade değişimleri. Nanostring sonuçlarının doğrulanması amacıyla NPH ve nöronlarda miR-34a seviyeleri RT-qPCR ile ölçüldü. Her hücre hattı için, miR-34 kat değişimlerinin belirlenmesi için sağlıklı kontrollerden elde edilen sinyallerin ortalaması kullanıldı, tüm hatlara ait biyolojik tekrarlar ayrı birer nokta olarak ifade edildi (İstatistik analiz sonuçları metin içerisinde verildi).

NPH'lerden nöronlara farklılaşması sürecinde, miR-34a ifade düzeylerinin farklılaşmaya bağlı olarak nasıl değiştiğinin değerlendirilmesi için ikinci bir analiz gerçekleştirildi. Bu analizde ise, normalize edilmiş kontrol ve hasta örneklerinde ölçülen miR-34a ifade düzeyleri, her hücre hattının kendi NPH seviyelerinde ölçülen miR-34a miktarlarına oranlandı ve NPH'lere göre kat değişimleri Şekil 10'da verildi. Her üç sağlıklı kontrol hücre hattında da miR-34a ifade düzeylerinin hücrelerin NPH'lerden olgun nöronlara farklılaşması sırasında azaldığı gözlemlendi. Öte yandan, BB hasta grubunda ise miR-34a ifade düzeylerinin farklılaşma ile birlikte azalmadığı, bilakis çoğu zaman noktasında istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı.



Şekil 10. Sağlıklı kontrol ve BB örneklerinde miR-34a ifadesinin farklılaşmaya bağlı değişimi. BB hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait NPH ve nöronlarda miR-34a seviyeleri RT-qPCR ile belirlendi. Her hücre hattı için, miR-34 ifade düzeyleri her hücrenin kendi NPH seviyesine oranlanarak elde edilen sonuçlar kat değişim olarak ifade edildi (Mann-Whitney U testi, n=3, *: p<0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001).

4.4. miR-34a Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Yolak Analizi

miR-34a-5p'nin hedeflediği olası genler, miRWalk2.0 veri tabanı tarafından sağlanan karşılaştırmalı platform (miRWalk, miranda, miRbridge, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22 ve Targetscan algoritmaları arasında) kullanıldı (Dweep ve Gretz, 2015). En az dört algoritma tarafından miR-34a hedef geni olarak tahmin edilen toplam 2251 genin dahil edildiği GO analizi doğrultusunda bu genler, yer aldıkları biyolojik süreçler, moleküler fonksiyonlarına ve hücresel bileşenlere göre sınıflandırıldı (Tablo 14).

Tablo 14. GO analizine göre miR-34a hedef genlerinin sınıflandırılması

	GO_ID	GO terimleri	İlişkilendirilen Gen Sayısı	p-değeri	FDR
Biyolojik Süreçler (GOTERM_BP)	GO:0045944	RNA polimeraz II promotor bölgesinden transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi	163	6,80E-06	4,60E-01
	GO:0007411	Aksonların yönlendirilmesi	36	2,10E-04	3,40E-01
	GO:0019229	Kan damarlarının daralmasının düzenlenmesi	10	2,30E-04	2,90E-01
	GO:0043401	Steroid hormon aracılığıyla sinyal iletimi	18	2,30E-04	2,70E-01
	GO:0008285	Hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi	72	2,50E-04	2,60E-01
	GO:0051926	Kalsiyum iyonlarının taşınmanın negatif düzenlenmesi	8	3,00E-04	2,30E-01
	GO:0042981	Apoptotik süreçlerin düzenlenmesi	44	3,40E-04	2,10E-01
	GO:0030512	Dönüştürücü büyüme faktörü- beta (TGF-beta) reseptör sinyal iletim yolunun negatif düzenlenmesi	19	3,50E-04	1,90E-01
	GO:0001822	Böbrek gelişimi	23	3,60E-04	2,20E-01
	GO:0046847	Filopodium organizasyonu	9	3,60E-04	2,30E-01
Moleküler Fonksiyonlar (GOTERM_MF)	GO:0005515	Protein bağlama	1149	6,50E-07	9,60E-04
	GO:0008270	Çinko iyonlarını bağlama	185	3,10E-05	5,00E-02
	GO:0044212	Transkripsiyon düzenleyici bölge DNA bağlanması	47	4,00E-05	6,60E-02
	GO:0043565	Diziye özgül DNA'ya bağlanma	92	8,00E-05	1,30E-01
	GO:0003707	Steroid hormon reseptör aktivitesi	18	1,80E-04	3,10E-01
	GO:0004842	Ubiquitin-protein transferaz aktivitesi	60	8,20E-04	1,30E+00
	GO:0001227	Transkripsiyon baskılayıcı aktivite, RNA polimeraz II transkripsiyon düzenleyici bölgeye özgül bağlanma	17	1,10E-03	1,90E+00
	GO:0019900	Kinaz bağlama	19	2,60E-03	4,20E+00
	GO:0019904	Protein bölgesine özgül bağlanma	40	2,60E-03	4,20E+00
	GO:0005516	Kalmodulin bağlama	37	2,80E-03	1,90E+00
Hücresel Bileşenler (GOTERM_CC)	GO:0000139	Golgi zarı	118	2,80E-09	4,10E-06
	GO:0043005	Nöron projeksiyonu	57	1,20E-07	1,80E-04
	GO:0030054	Hücre bağlantısı	88	2,00E-06	3,10E-03
	GO:0045202	Sinaps	41	3,80E-05	3,90E-02
	GO:0031410	Sitoplazmik kesecik	48	1,20E-04	5,70E-02
	GO:0016020	Hücre zarı	306	2,30E-04	1,80E-01
	GO:0005794	Golgi cisimciği	134	2,90E-04	3,50E-01
	GO:0008021	Sinaptik kese	23	6,50E-04	4,40E-01
	GO:0045121	Hücre zarı raftı	41	6,70E-04	7,20E-01
	GO:0005887	Hücre zarının integral bileşeni	199	2,10E-03	8,20E-01

Aynı genler için Reactome analizi yapıldığında, hedef genlerin sinaptik formasyon ve olgunlaşmada iş gören 'LGI-ADAM etkileşimleri' yolağı (R-HSA-5682910), apoptotik yolak, (R-HSA-111457), aksonal yönlendirmede de iş gören 'NrCAM etkileşimleri' yolağı (R-HSA-447038), sinaptogenez ve dendritik dallanmalarda iş gören 'L1 ve Ankyrinler arası etkileşimler' (R-HSA-445095) gibi çeşitli yolları etkilediği belirlendi.

İkinci aşamada, analize dahil edilen (en az dört algoritma tarafından ortak olan) genler arasından, aşağıda belirtilen seçim kriterlerine uygun altı gen seçildi:

- 1) BB ile direkt ilişkisi olduğu saptanmış/bildirilmiş genler ve
- 2) Hastalık patogenezinin biyolojik sürecinde rol oynayabilecek genler (sinaptik plastisite, transkripsiyonal düzenleme vb.) olarak belirlendi. İfade düzeylerinin analizi için belirlenen genler Tablo 15’te verildi.

Tablo 15. İfade analizi için belirlenen miR-34a hedef genleri

Gen adı	miRNA Hedef Genlerin Belirlenmesinde Kullanılan Algoritmalar								
	miRWalk	miRanda	mirbridge	miRDB	Pictar2	PITA	RNA22	Targetscan	Toplam Skor
ANK3 (Ankyrin-3)	1	1	0	1	1	0	0	1	5
AXIN2 (Axin-related protein)	1	1	0	0	0	0	1	1	4
BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)	1	0	0	0	1	1	1	1	5
CACNA1C (Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C)	1	1	0	1	0	1	0	1	5
CACNB3 (Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit)	1	1	0	1	1	1	1	1	7
SYT1 (Synaptotagmin 1)	1	1	1	1	1	0	1	1	7

İfade düzeylerinin incelenmesi için seçilen bu genlere ek olarak *BDNF* geni de analize dahil edildi. Her ne kadar miR-34a hedef genleri için yapılan analizlerde *BDNF* sadece bir algoritmada tahmini gen olarak bildirilse de, yapılan PITA analizi sonucunda miR-34a-5p ve *BDNF* transkriptleri arasında sınırda [Transkriptler: *BDNF*-211 (ENST00000439476), *BDNF*-212 (ENST00000525528) ve *BDNF*-207 (ENST00000395986) transkriptleri için Skor: -7,17] ancak potansiyel bir ilişki saptandı. Ensembl veri tabanı (<https://www.ensembl.org/> Sürüm 93, 2018)

kullanılarak ilgili transkriptlerin protein kodlama durumları incelendiğinde, her üç transkriptin de protein kodlayan tipte olduğu belirlendi (Şekil 11).

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq
BDNF-212	ENST00000525528.1	4766	247aa	Protein coding	CCDS7866	A0A0E3SU01 P23560	NM_170735 NP_733931
BDNF-211	ENST00000439476.6	4532	247aa	Protein coding	CCDS7866	A0A0E3SU01 P23560	NM_001143816 NP_001137288
BDNF-207	ENST00000395986.6	3979	262aa	Protein coding	CCDS41628	P23560	NM_170734 NP_733930

Şekil 11. PITA analizinde miR-34a ile ilişkili olduğu saptanan BDNF transkriptleri.

Son olarak Tablo 16’da belirlenen yedi genin KEGG veri tabanına göre yer aldığı yollar ve bu genlerin daha önceki çalışmalarda BB ile kurulan ilişkileri özetlendi.

Tablo 16. İfade analizi için seçilen miR-34a hedef genlerine ait bilgiler

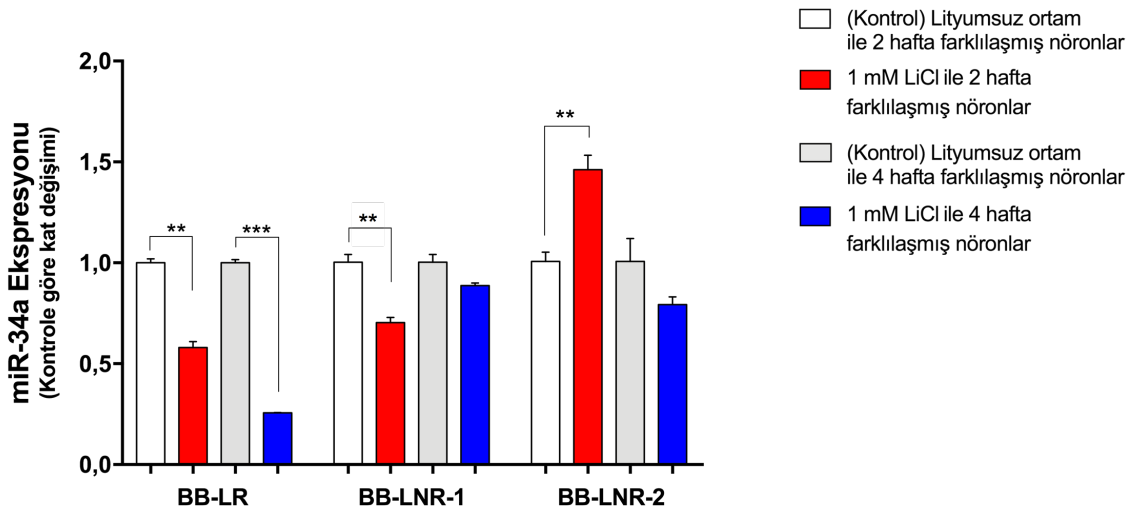
Gen Kısa adı	Gen adı	Hücre İçi Fonksiyonu	KEGG İlgili Yolak	BB ile Bağlantısı
ANK3	Ankyrin-3	Aktin/spektrin adaptör proteini	hsa05205 Kanserde proteoglikanlar	GWAS (BB) (Ferreira ve ark., 2008)
AXIN2	Axin-related protein	Wnt sinyal yolağında katenin stabilitesini düzenler	hsa04310 Wnt sinyal yolağı hsa04390 Hippo sinyal yolağı	Wnt yolağının BB patofizyolojisindeki olası rolü nedeniyle seçilmiştir (Valvezan ve Klein, 2012)
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hücrel apoptotik kaskadta rol oynar/nöroproteksiyonda anahtar role sahiptir	hsa04210 Apoptoz hsa04722 Nörotrofin sinyal yolağı hsa04725 Kolinerjik sinaps	GWAS (BB) (Uemura ve ark., 2016)
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	Bu proteinin kendi reseptörüne bağlanması nöronal sağ kalımı destekler	hsa04010 MAPK sinyal yolağı hsa04014 Ras sinyal yolağı hsa04024 cAMP sinyal yolağı hsa04151 PI3K-Akt sinyal yolağı hsa04722 Nörotrofin sinyal yolağı	Pek çok çalışma tarafından BB ile yakın ilişkili bulunması nedeniyle seçilmiştir (Pfaffenseller ve ark., 2018)
CACNA1C	Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 C	Hücre içi sinyal iletiminde rol oynar/kalsiyum kanalı elemanı	hsa04010 MAPK sinyal yolağı hsa04020 Kalsiyum sinyal yolağı hsa04725 Kolinerjik sinaps hsa04726 Serotonerjik sinaps hsa04727 GABAerjik sinaps hsa04728 Dopaminerjik sinaps	GWAS (BB) (Ferreira ve ark., 2008)
CACNB3	Calcium channel, voltage-dependent beta 3 subunit	Sinaptik iletimde rol oynar/kalsiyum kanalı elemanı	hsa04010 MAPK sinyal yolağı hsa04921 Oksitosin sinyal yolağı	GWAS (BB) (Bavamian ve ark., 2015)
SYT1	Synaptotagmin 1	Presinaptik akson terminal membranında Ca ²⁺ sensörü	hsa04721 Sinaptik vezikül döngüsü	Bu gen ailesinin nörit büyümesi ve akson dallanmasındaki rolleri nedeniyle seçilmiştir (Morgado ve ark., 2015)

4.5. Lityumun miR-34a ve Hedef Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi

Lityumun farklılaştırılmış nöronlarda miR-34a ve hedef genlerine etkisinin belirlenmesi için BB hastalarına ait NPH'ler 2- ya da 4-hafta boyunca lityum varlığında farklılaştırıldı ve RNA izolasyonu yapılarak miR-34a ve hedef genlerin ifade düzeylerindeki değişimler incelendi. Kat değişimleri lityum içermeyen ortam kullanılarak 2- ya da 4-hafta boyunca farklılaştırılmış (kontrol) hücrelere göre hesaplandı.

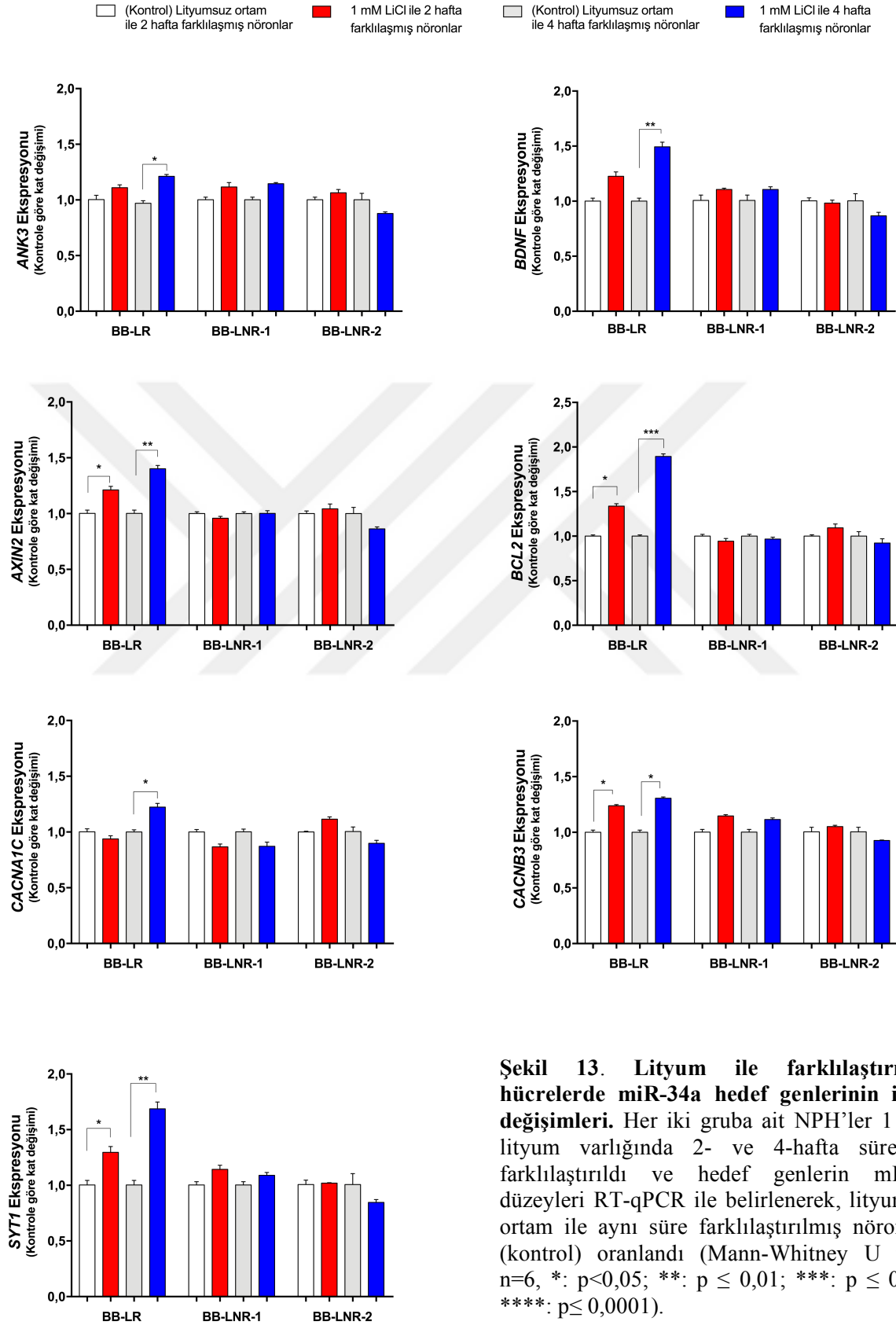
BB-LR (Responder) hattında, lityum içeren ortam ile 2-hafta boyunca farklılaştırılmış nöronlardaki miR-34 ifade düzeyinin, lityumsuz ortamda 2-hafta boyunca farklılaştırılmış nöronlara kıyasla 0,42-kat azaldığı görüldü ($p=0,0022$). 4-hafta boyunca lityum içeren ortam ile farklılaştırılmış nöronlardaki miR-34 ifade düzeyinin ise, lityumsuz ortamda 4-hafta boyunca farklılaştırılmış nöronlara kıyasla 0,75-kat azaldığı saptandı ($p=0,0002$).

BB-LNR-1 (Non-Responder) hattında miR-34a ifade düzeyinde sadece 2-haftalık nöronlarda 0,3-kat azaldığı saptandı ($p=0,0022$); 4-haftalık nöronlarda ise bu etki görülmedi ($p>0,05$). Son olarak BB-LNR-2 (Non-Responder) hattında ise sadece 2-haftalık nöronlarda miR-34a ifade düzeyinin 1,46-kat arttığı gözlemlendi; fakat bu etki 4-haftalık nöronlarda saptanmadı (Şekil 12).



Şekil 12. Lityum ile farklılaştırılmış hücrelerde miR-34a ifade değişimleri. Her iki gruba ait NPH'ler 1mM lityum varlığında 2- ve 4-hafta süre ile farklılaştırıldı ve miR-34a ifade düzeyleri RT-qPCR ile ölçüldü, aynı zaman noktasında tedavi almamış hücrelere oranlandı (Mann-Whitney U testi, $n=6$, *: $p<0,05$; **: $p\leq 0,01$; ***: $p\leq 0,001$).

Takip eden deneylerde, aynı örnekler kullanılarak belirlenmiş olan miR-34a hedef genlerinin ifade düzeyleri incelendi. BB-LR hattında 4-haftalık lityum uygulamasının ANK3, AXIN2, CACNA1C ve CACNB3 mRNA'larında hafif ($<1,5$ -kat değişim), BCL2, BDNF ve SYT1 mRNA düzeylerinde ise 1,5-kat ve üzeri olacak şekilde, istatistiksel olarak anlamlı artış sağladığı belirlendi: ANK3 mRNA ifade düzeyi 1,3 katına ($p=0,032$), BDNF mRNA ifade düzeyi 1,51 katına ($p=0,0022$), AXIN2 mRNA ifade düzeyi 1,4 katına ($p=0,0022$); BCL2 mRNA ifade düzeyi 1,93 katına ($p=0,0002$); CACNA1C ve CACNB3 mRNA ifade düzeyleri 1,29 katına ($p=0,032$) ve SYT1 mRNA ifade düzeyi 1,69 katına ($p=0,022$) çıktı. Öte yandan BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında lityumun herhangi bir zaman noktasında istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 13).

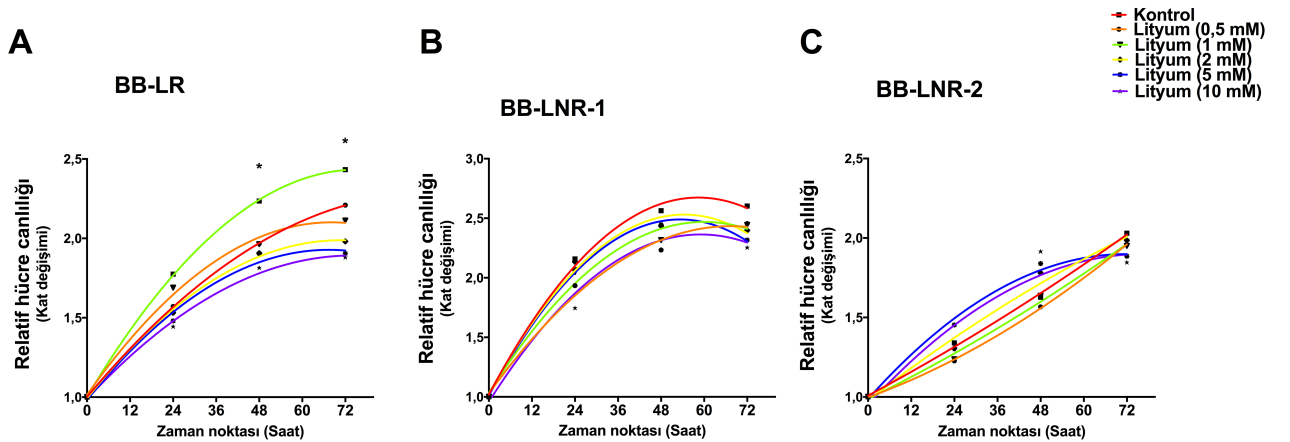


Şekil 13. Lityum ile farklılaştırılmış hücrelerde miR-34a hedef genlerinin ifade değişimleri. Her iki gruba ait NPH'ler 1 mM lityum varlığında 2- ve 4-hafta süre ile farklılaştırıldı ve hedef genlerin mRNA düzeyleri RT-qPCR ile belirlenerek, lityumsuz ortam ile aynı süre farklılaştırılmış nöronlara (kontrol) oranlandı (Mann-Whitney U testi, n=6, *: $p < 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ ****: $p \leq 0,0001$).

4.6. Lityumun BB hastalarına Özgü NPH'lerin Canlılığına Etkisi

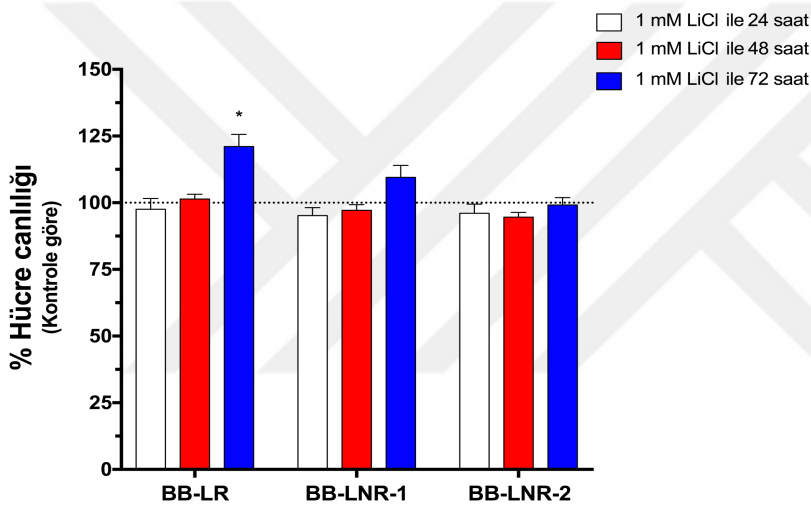
Bir önceki aşamada lityumun, özellikle nöronal sağ kalım ve nöroproteksiyon yollarında iş gören BDNF ve BCL2 mRNA ifade düzeylerinde artış sağladığı gözlenmişti. Ancak bu sonuçlar, uzun süreli (2- ve 4-hafta) lityum inkübasyonu ile elde edildi. Farklılaşmaya başlamış/farklılaşmasını tamamlamış nöronlarda hücre bölünmesinin durdurduğu göz önünde bulundurularak, bir sonraki aşamada, akut lityum inkübasyonunun (0-72 saat), aktif olarak bölünmesi devam eden NPH'ler üzerine nasıl bir etkisi olduğu incelendi. Bu amaçla BB hastalarına ait NPH'ler lityum ile inkübe edilerek hücre canlılığı ve çoğalması parametreleri Real Time-Glo ve PrestoBlue kitleri kullanılarak değerlendirildi.

İlk aşamada NPH'ler 96 kuyulu kültür kaplarına ekilerek doz ve zaman eğrisi hazırlamak amacıyla değişik dozlarda lityum (0-10 mM) ile birlikte Real Time-Glo™ MT boyası ile inkübe edildiler. Sonuçlar ilk luminesans ölçüme (T_0) oranlanarak hesaplandı. Lityumsuz ortam ile aynı süre inkübe edilmiş hücrelere (kontrol) kıyasla 1 mM lityum inkübasyonunun BB-LR hattında hücre çoğalmasını 48. saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı (48.saatte 1,3-kat artış, $p=0,016$; 72.saatte 1,28-kat artış, $p=0,016$) belirlendi. 5 mM ve daha yüksek dozların ise istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin bulunmadığı saptandı. Öte yandan BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında lityumun 0,5-10 mM dozlarının istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Lityum inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin Real Time-Glo ile ölçülmesi. NPH'ler lityum içeren ortam ile inkübe edilirken eş zamanlı olarak ölçümler alındı. Tüm zaman noktaları ilk ölçüme (T_0) oranlanarak bağıl hücre canlılığı hesaplandı. (A) Lityum responder hat BB-LR ve Lityum non-responder hatlar (B) BB-LNR-1 ve (C) BB-LNR-2 (Mann-Whitney U testi, $n=5$, *: $p \leq 0,05$).

Elde edilen sonuçların doğrulanması için ikinci bir yöntem olarak PrestoBlue boyası kullanıldı. Tüm hücre hatları 96 kuyulu kültür kaplarına ekilerek, anlamlı artışın gözlemlendiği doz olan 1 mM lityum ile inkübe edildi ve farklı zaman noktalarında ölçüm alındı. Real Time-Glo yöntemi ile alınan sonuçlara benzer şekilde, 1 mM lityum ile 72 saat inkübasyonun, BB-LR hattında canlılığı %21 arttırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,032$) belirlendi. Ancak BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında hücre canlılık parametrelerinde istatistiksel ve biyolojik olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 15).



Şekil 15. Lityum inkübasyonunun hücre canlılığına etkisinin PrestoBlue ile ölçülmesi. NPH'ler lityum içeren ortam ile 24, 48 ve 72 saat süre ile 1mM lityum ile inkübe edildi. Hücre canlılığı PrestoBlue kiti ile ölçülerek, bağıl hücre canlılığı aynı zaman noktasında tedavi almamış hücrelere (kontrol) oranlandı. (Mann-Whitney U testi, n=5, *: $p<0,05$).

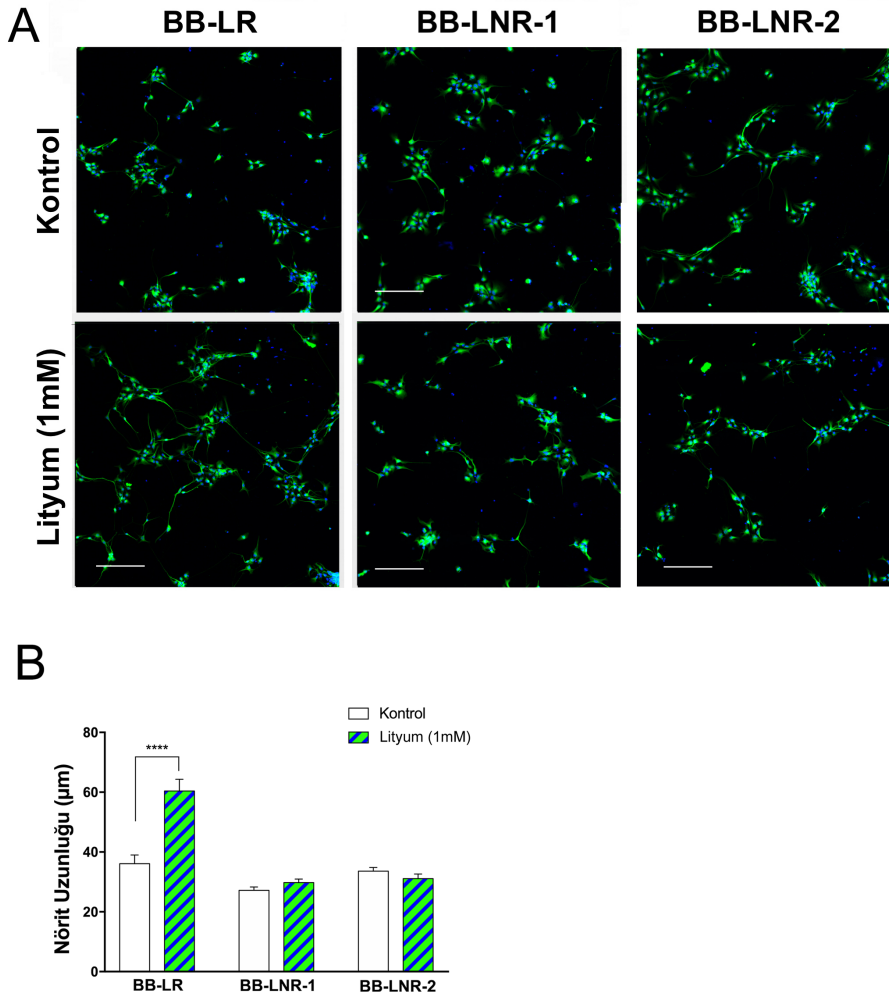
Lityumun BB-LR hattında canlılığa olan etkisi Real Time-Glo kitinde 48. saatten itibaren ölçülebilir iken PrestoBlue kitinde sadece 72. saatte gözlenmesi ise kitler arası hassasiyet farkına bağlandı.

4.7. Lityumun Nörojeneze Etkisi

Son aşamada ise lityumun nörojeneze olan etkilerini değerlendirmek amacıyla immunfloresans boyama deneyleri gerçekleştirildi. BB hastalarına ait NPH'ler lityum varlığında farklılaştırılarak erken nöronal evrede (1-hafta) nörit uzunlukları ölçüldü (Şekil 16). Birinci

haftadan sonra nöronal dallanmanın oldukça karmaşık hale gelmesi sonucu ölçümün yapılamaması nedeniyle, nörit ölçümleri için erken evre seçildi.

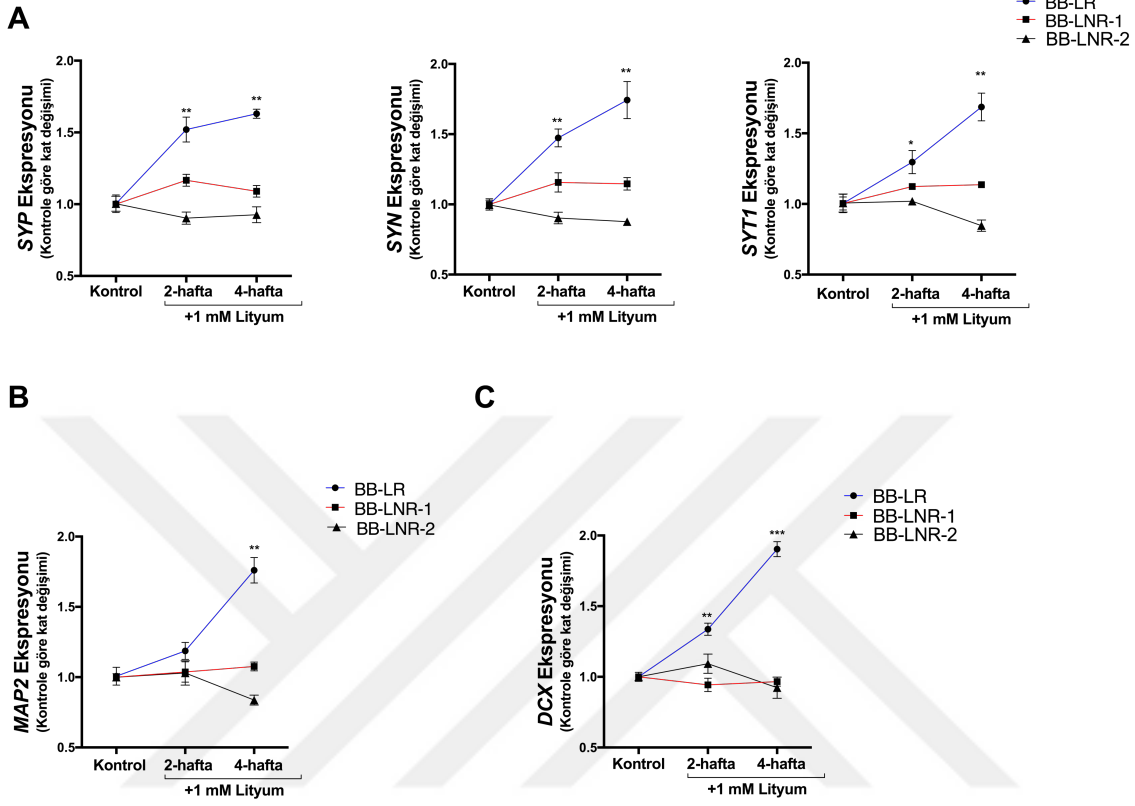
Lityum içeren/içermeyen ortamlar ile farklılaştırılan hücrelerden alınan görüntülerde, hücrelerin sahip oldukları nöritlerin uzunlukları ölçüldü. Lityum içermeyen ortamda farklılaşan hücrelerin ortalama nörit uzunluğu 36,12 μM , lityum ile farklılaştırılan BB-LR hattına ait hücrelerin ortalama nörit uzunluğu 60,42 μM olarak hesaplandı ve nörit uzunluğundaki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,0001$). Ancak BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik saptanmadı.



Şekil 16. Lityum varlığında hücre farklılaşmasının nörogeneze etkisi. (A) Erken nöronların temsili görüntüsü ve (B) her gruptan elde edilen görüntülerden nörit uzunluğu ölçümleri ImageJ programı ile analiz edildi ve aynı zaman noktasında tedavi almamış hücrelere (kontrol) oranlandı. (Mann-Whitney U testi, ****: $p \leq 0,0001$).

Nöroenez ayrıca, 2- ve 4-hafta süre ile farklılaştırılmış nöronlardan elde edilen RNA'lar kullanarak RT-qPCR yöntemi ile de değerlendirildi. Bu amaçla sinaptik genlerden *SYP*, *SYN* ve *SYT1*; yetişkin nöroenez belirteçlerinden *DCX* ve nöronal belirteç *MAP2* ifade düzeyleri analiz edildi. Lityum varlığında farklılaştırılan BB-LR hattına ait nöronlarda (aynı hatta ait ve herhangi bir tedavi uygulanmamış nöronlara kıyasla) sinaptik genlerin tümünde, her iki zaman noktasında da istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü. *SYP* mRNA ifade düzeyi 2-haftalık nöronlarda 1,52-kat, 4-haftalık nöronlarda ise 1,62-kat ($p=0,0022$); *SYN* mRNA ifade düzeyi 2-haftalık nöronlarda 1,46-kat, 4-haftalık nöronlarda ise 1,86-kat ($p=0,0022$); *SYT1* mRNA ifade düzeyi ise 2-haftalık nöronlarda 1,22 katına çıktı ($p=0,016$), 4-haftalık nöronlarda ise 1.72-katına çıktı ($p=0,0022$). Öte yandan bu genler için BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişim gözlenmedi.

Yetişkin nöroenez belirteci olan *DCX* mRNA ifade düzeyinin lityum ile 2-hafta boyunca farklılaştırılan BB-LR hattına ait nöronlarda 1,38-katına yükseldiği ($p=0,016$), 4-haftalık nöronlarda ise 1,93-katına ($p=0,0006$) yükseldiği görüldü. Son olarak, nöronal belirteçlerden biri olan *MAP2* mRNA ifade düzeyinin de lityum ile farklılaştırılan BB-LR hattına ait 2-haftalık nöronlarda 1,22-katına ($p>0,05$), 4-haftalık nöronlarda ise 1,86-katına yükseldiği ($p=0,0022$) saptandı. Sinaptik genlere benzer şekilde bu genler için de BB-LNR-1 ve BB-LNR-2 hatlarında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişim gözlenmedi (Şekil 17).



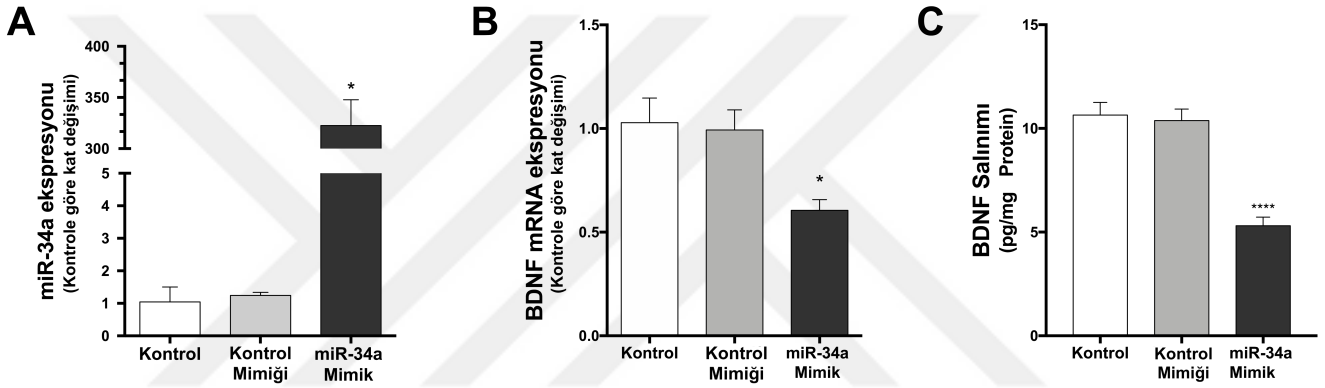
Şekil 17. Lityum varlığında farklılaştırmanın nörogenez yolağındaki genlere etkisi. NPH'ler lityum içeren ortam ile 1 hafta boyunca farklılaştırıldı. (A) Sinaptik genlerden SYT1, SYN ve SYP (B) yetişkin nörogenez belirteçlerinden DCX ve (C) nöronal belirteç MAP2 mRNA ifade düzeylerinin zamana bağlı değişimleri incelendi. Kat değişimleri aynı zaman noktasında tedavi almamış hücrelere (kontrol) oranlanarak verildi (Mann-Whitney U testi, n=5, *: $p < 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ ****: $p \leq 0,0001$).

4.8. miR-34a Aşırı İfadesinin BDNF mRNA ve Protein İfadesine Etkisinin SH-SY5Y Hücrelerinde İncelenmesi

miR-34a'nın hedef genleri incelendiğinde BDNF, TarBase ve miRTarBase veritabanlarında deneysel olarak doğrulanmış genler arasında bulunmamaktaydı. Ancak PITA veritabanında gerçekleştirilen analizde, miR-34a-5p ve BDNF transkriptleri arasında sınırda [BDNF-211 (ENST00000439476), BDNF-212 (ENST00000525528) ve BDNF-207 (ENST00000395986) transkriptleri için Skor = -7,17], ancak potansiyel bir ilişki saptandı.

Bu nedenle fonksiyonel deneyler aracılığıyla hücre içindeki ilişkinin saptanabilmesi için transfeksiyon deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneylerde nöron benzeri bir hücre hattı olan SH-

SY5Y hücreleri kullanıldı. Transfeksiyon etkinliği miR-34a seviyesinde yaklaşık 300 katlık bir artışın olduğunun saptanması ile doğrulandıktan sonra, aynı koşullarda BDNF mRNA ifade düzeyinin 0,4-kat azaldığı saptandı ($p=0,0077$) (Şekil 18A-B). Gen ifade düzeyindeki bu değişimin protein seviyesine olan yansımalarının incelendiği deneylerde ise, miR-34a mimiği ile transfekte edilen hücrelerde, kültür ortamına salınan BDNF protein miktarında yaklaşık %50 oranında azalma saptandı ($p\leq 0,0001$) (Şekil 18C).



Şekil 18. miR-34a aşırı ifadesinin BDNF mRNA seviyesine ve protein salınımına etkisi. SH-SY5Y hücreleri miR-34a veya negatif kontrol mimiği ile transfekte edildi ve hücrelerde (A) miR-34a seviyesi (B) BDNF mRNA seviyesi ve (C) hücre kültürüne salınan BDNF protein miktarları ölçüldü (Mann Whitney-U testi, $n=5$, *: $p<0,05$; ****: $p\leq 0,0001$).

5. TARTIŞMA

miRNA'ların beyin fonksiyonu ve hastalıkların ortaya çıkmasında/sürecindeki önemini işaret eden çalışmalara rağmen, BB'de miRNA'ların rolü hakkında az sayıda bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada BB hastalarından elde edilen IPS hücreleri nöronlara farklılaştırılmış ve bu nöronlarda global miRNA ifade değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

IPS hücre-tabanlı hastalık modellemesinde, hasta ve sağlıklı bireylerden elde edilen farklı somatik hücrelerden [örneğin fibroblasttan (Takahashi ve ark., 2007), kan mononükleer hücreler, (Staerk ve ark., 2010), idrar kökenli hücreler (Zhou ve ark., 2012) vb.] IPS hücreleri oluşturulabilmektedir. Belirli koşullarda ilgilenilen hücre tiplerine farklılaştırılan IPS hücreleri, ilgilenilen hastalığın tanı ve tedavisinde moleküler profillemeye, hücresel özelliklerin/bozuklukların incelenmesi, ilaç denemeleri gibi pek çok olanak sağlamaktadır. IPS hücre teknolojisinin gelişiminden önce, özellikle nöropsikiyatrik çalışmalarda hayvan modelleri, hastadan elde edilmiş örnekler [postmortem beyin dokuları veya nöron dışı örnekler (kan veya beyin omurilik sıvısı, lenfoblastoid hücre hattı, fibroblastlar vb.)] kullanılmıştır. Ancak bu modeller belirli sınırlılıklara sahiptir. Hayvan modelleri, insan ve hayvan beyni arasındaki türe özgü farklılıklar nedeniyle sonuçların hastalığın yorumlanmasında ve hastalık fenotiplerinin birebir tekrarlamasında kısıtlılıklara yol açmaktadır. Özellikle yüksek işlevlerin söz konusu olduğu nöropsikiyatrik hastalıklarda hastalık modelinin deney hayvanlarında oluşturulması ve analizi yüksek oranda davranış modellerine bağımlıdır ve bu gibi sınırlayıcı etmenler ilaç denemelerinde/geliştirmede de sıklıkla başarısızlığa yol açmaktadır (Nestler ve Hyman, 2010). Primer hücrelerin kullanımı ise, özellikle nöropsikiyatrik hastalıklarda taze beyin dokusuna erişim zorluğu nedeniyle tercih edilememektedir. Postmortem dokulara erişim nispeten kolay olsa da nöronal hücrelerin oksijen eksikliğine ve kan desteğine oldukça duyarlı olması bu dokulardan hücre izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Hastalardan alınan periferik doku örnekleri (kan, beyin omurilik sıvısı vb.), ilaç etkilerinin incelenmesi ve hastalığın ilerleyişinin takibi açısından önemli ipuçları sağlamakla birlikte, bu örnekler hastalığın kökeni olan nöronal dokuyu tam olarak temsil etmemektedir. Bu bağlamda, IPS hücre üretimi -özellikle güncel modelleme sistemleri ile karşılaştırıldığında sahip olduğu avantajlar ile birlikte- nöropsikiyatrik hastalıkların modellenmesinde hızla popüler olmuştur (Li ve ark., 2018). IPS hücrelerinin bu alanda ilk kullanımı şizofreni hastalığının

modellenmesi ile başlamıştır (Brennand ve ark., 2011). 2014 yılından itibaren ise BB hastalarından alınan fibroblastlardan elde edilmiş IPS hücrelerinin kullanıldığı yayınlar çıkmaya başlamıştır (Tablo 2).

Bu tez çalışmasında, sahip olduğu avantajlar göz önünde bulundurularak hastalık modellenmesi için IPS hücre teknolojisinden faydalanılmıştır. Öte yandan, bu teknolojinin mali yükünün ve iş gücü yükünün oldukça büyük olması nedeniyle çalışmada sadece üç BB hastası ve üç sağlıklı kontrolden alınan fibroblast hücreleri IPS hücrelerine çevrilebilmiştir. Daha sonra bu hücreler NPH'lere farklılaştırılarak karakterize edilmiş, elde edilen bu NPH'ler olgun nöronlara farklılaştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasına bir başka proje kapsamında elde edilen ve tarafımıza bağışlanmış olan bir BB hastası ve bir sağlıklı kontrol NPH'leri de dahil edilmiştir. Tüm NPH'lerden, nöronal farklılaşmanın belirli zaman noktalarında (2-, 4- ve 6-hafta) RNA örnekleri toplanmış, oluşturulan örnek kütüphanesinde ise global miRNA profillemesi gerçekleştirilmiştir. Seçilen zaman noktaları, daha önce literatürde bildirilen erken evre ve olgun nöron eldesi sürelerine uygun olarak belirlenmiştir (Kim ve ark., 2015). Hasta örneklerinde farklı ifade düzeylerine sahip olan miRNA'ların belirlenmesi için gerçekleştirilen Nanostring miRNA analizi sonucunda ise, BB hastalarında pek çok miRNA'nın ifade düzeyinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. BB hastalarına ait NPH'lerde en fazla artış, Let-7 ailesine ait let-7a-5p, let-7d-5p, let-7i-5p, let-7g-5p, let-7f-5p, let-7c-5p, let-7b-5p, let-7e-5p miRNA'larında görülmüştür. Literatüre bakıldığında, NPH'lerde Let-7 ailesi miRNA'ların hatalı ifade edilmesinin proliferasyonu azalttığı ve nöronal farklılaşmayı inhibe ettiği bildirilmiştir [(Cimadamore ve ark., 2013); (Zhao ve ark., 2010)]. Ayrıca bir tamamlayıcı genomik çalışmasında yapılan analizler sonucunda let-7 ailesinin lityum uygulaması ile istikrarlı biçimde azaldığı ve bu durumun hastaların lityuma yanıtının öngörülmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Hunsberger ve ark., 2015).

Nanostring sonuçlarında en az iki farklı zaman noktasında anlamlı değişiklik gösteren miRNA'lar incelendiğinde, BB hastalarında üç miRNA'nın (hsa-miR-16-5p: NPH ve 2-haftalık nöronlarda; hsa-miR-629-5p ve hsa-miR-324-5p ise 2- ve 6-haftalık nöronlarda) düzeylerinin düşük olduğu, üç miRNA'nın ise (hsa-miR-23a-3p: NPH ve 2-haftalık nöronlarda; let-7b: NPH ve 2-haftalık nöronlarda; hsa-miR-34a-5p 2-, 4- ve 6-haftalık nöronlarda) düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Öte yandan çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol sayısının çok az olması nedeniyle istatistiksel bir değerlendirme yapılamamış ve literatürdeki destekleyici bilgiler değerlendirilerek

(bir sonraki paragrafta özetlenmiştir) BB hastalarına ait nöronlarda sabit bir şekilde yüksek olduğu görülen (2-haftalık erken evre nöronlarda 2.8-kat; 4-haftalık nöronlarda 3.24-kat ve 6-haftalık nöronlarda 2.4-kat yüksek) miR-34a üzerine yoğunlaşmış, çeşitli biyoinformatik analizler ve fonksiyonel deneyler planlanmıştır.

Literatürde miR-34a ve beyin dokusu/hücreleri ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Farklı doku tiplerinde miR-34 ailesinin ifade profilini inceleyen bir çalışmada, diğer dokulara kıyasla beyin dokusunda miR-34a'nın daha yüksek düzeyde ifade edildiği saptanmıştır. Aynı çalışmada beynin farklı bölgelerinde miR-34 ailesinin ifade düzeyleri de kıyaslanmış ve serebellum dışında kalan bölgelerde miR-34a ifade düzeylerinin miR-34b ve miR-34c'ye kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Jauhari ve ark., 2018). Fare embriyonik hücrelerinden farklılaştırılmış nöronal hücrelerde miR-34a aşırı ifadesinin sinaptik proteinlerin ifadelerini negatif olarak etkilediği ve dendritik dallanmaları azalttığı gösterilmiştir (Agostini ve ark., 2011). Bu bağlamda yapılan bir diğer çalışmada ise insan fibroblastlarından elde edilen indüklenmiş nöronlar kullanılmış ve miR-34a'nın aşırı ifadesinin nöronal olgunlaşmayı ve sinaptogenezi engellediği saptanmıştır (Bavamian ve ark., 2015). Literatüre bakıldığında, miR-34a ifade düzeyinin bozulması ile BB arasında ilişki olduğunu bildiren de üç çalışma bulunmaktadır. Smallheiser ve ark. tarafından yapılan çalışmada 15 BB hastası ve 15 sağlıklı kontrolden alınmış postmortem doku örnekleri (PFC -BA10) incelenmiş ve bu beyin alanında miR-34a ifadesinde hafif bir azalma (yaklaşık %15) bildirilmiştir (Smallheiser ve ark., 2014). Benzer şekilde, Azevedo ve ark. da anterior singulat (BA 24) bölgesi için hafif bir azalma (yaklaşık %25) bildirmiştir (Azevedo ve ark., 2016). Öte yandan, Bavamian ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise literatürde daha önce bahsi geçen iki bölge ve ek olarak serebellumdaki miR-34a ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, PFC ve anterior singulat korteksteki miR-34a ifade düzeylerinde kontrol ve BB hastaları arasında farklılık saptanmazken, serebellumda yüksek miR-34a ifadesi belirlenmiştir. Aynı çalışmada, miR-34a seviyesinin iki BB hastasından alınan fibroblastlardan üretilmiş indüklenmiş nöronlarda da kontrollere kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir (Bavamian ve ark., 2015).

Çalışmamızda öncelikle miR-34a ifade düzeyinin BB hastalarında arttığı RT-qPCR kullanılarak doğrulanmıştır. Doğrulama deneyleri iki farklı grafik şeklinde sunulmuştur. İlk analiz, Nanostring profillemesinde izlenen yolun tekrarını temsil etmektedir; elde edilen sinyaller sağlıklı

kontrollerden elde edilen örneklere oranlanarak kat değişimi şeklinde verilmiştir. Bu analiz, Nanostring sonuçlarını doğrular nitelikte olup miR-34a ifade düzeyinin BB hastalarında arttığını göstermiştir. İkinci analizde ise, kat değişiminin hesaplanmasında her hücrenin kendi NPH sinyalleri kullanılmıştır. Böylece, miR-34a'nın farklılaşma ile birlikte ifadesinin nasıl değiştiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu analiz sonucunda ise, miR-34a düzeylerinin sağlıklı kontrollere ait nöronlarda, farklılaşma ile birlikte azaldığı, BB hasta örneklerinde ise aksine bir artış meydana geldiğini göstermiştir. Bu durum, miR-34a'nın hedef genlerinin nörojeniz ve sinaptogenez ile ilişkili genleri kapsadığı göz önünde bulundurulduğunda oldukça önemlidir; zira artmış miR-34a düzeyleri nörojeniz ve sinaptogenez ile ilişkili bu genlerin ifade düzeylerini de doğrudan etkileyebilmektedir (Bavarian ve ark., 2015).

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında, BB hasta örneklerinde artmış miR-34a düzeylerinin, hastalığın tedavisinde sıklıkla başvurulmuş bir DDD ajan olan lityum ile nasıl değişeceğini araştırılmıştır. Lityum, etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olsa da uzun yıllardır BB tedavisi için en sık kullanılan ilaçlardan biridir. Lityuma başlangıcı takiben, hastalar arasında ilaca yanıt verme süreleri arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır; ancak tedavinin etkili olup olmadığını belirlemek uzun zaman alır. Halen ne lityum ne de diğer DDD ilaçlar için 'uzun dönemli yanıt (long-term response)' tanımı üzerinde uzlaşmaya varılamamıştır. Lityum özelinde bakılacak olursa, BB hastalarının yaklaşık %20-30'u 10 yıl süre ile herhangi bir mani/depresif dönem varlığı olmaksızın klinik semptomlarda güçlü ve sürekli bir iyileşme göstermektedir ve bu gruptaki hastalar ilaca mükemmel yanıt verenler (responder) olarak sınıflandırılabilir (Miura ve ark., 2014). Öte yandan, hastaların yaklaşık %30'u ilaca kısmen yanıt vermekte, %40'ından fazlası ise lityuma hiçbir klinik yanıt vermemektedir (non-responder) [(Baldessarini ve Tondo, 2000); (Garnham ve ark., 2007); (Sportiche ve ark., 2017)]. Lityum yanıtındaki bu değişkenlik ile ilişkili faktörlerin uzun süredir araştırılmaktadır. Klinik profil, hastaların lityum tedavisine yanıtının öngörülmesinde halen en yararlı seçenektir [(Grof, 2010); (Kleindienst ve ark., 2005)]. Bu klinik profili oluşturan bileşenler arasında, epizodik tedavi öncesi ön tedavi klinik seyri, hastanın aile öyküsü (özellikle lityuma yanıt veren BB aile bireyi/akraba), düşük komorbidite oranları (özellikle anksiyete ve madde kötüye kullanımı bozuklukları) ve tipik klinik görünüm sayılabilir (Papiol ve ark., 2018). Çalışmamıza dahil edilen üç hasta için, tüm bu kriterler ve tedavi ile düzelme yanıtları

bir psikiyatrist tarafından değerlendirilmiştir. Daha sonra örnekler -çalışmanın sonuna kadar gizli tutulmak suretiyle- veritabanına responder/non-responder olarak kayıt edilmiştir.

Lityumun miR-34a üzerine olan etkisinin incelendiği deneylerde, tüm BB hastalarına ait NPH'ler lityum içeren/içermeyen ortamlar ile 2- veya 4- hasta boyunca farklılaştırılmış ve elde edilen nöronlarda miR-34a düzeyleri RT-qPCR ile ölçülmüştür. Bu deneylerin sonucunda, sadece tek bir hastaya ait (BB-LR) nöronlarda miR-34a ifade düzeylerinin, her iki zaman noktasında da lityum ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (sırasıyla %42 ve %75). Diğer iki hastaya ait nöronlar incelendiğinde, BB-LNR-1 hattında 2-hafta süre ile lityum içeren ortamda farklılaştırılan nöronlarda miR-34a ifade düzeyinde %30 azalış görülürken, aynı koşullarda BB-LNR-2 hattında %46 artış görülmüştür. Ancak bu değişimler, 4-haftalık nöronlarda saptanamamıştır. Literatürde, lityumun miRNA ifade düzeyleri üzerine olan etkilerini inceleyen bazı çalışmalar bulunmakla birlikte, bu tezin yazıldığı tarihte hastaya özgü nöronlarda bu konuda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, her ne kadar sadece üç adet hastaya ait örnekler değerlendirebilmiş olsa da bu sonuçların ilerleyen çalışmalara ön veri sağlayabileceği düşünülmüştür.

Teorik olarak bir miRNA yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilmektedir. Bu hedefler hücre çeşitlerine özgü olabileceği gibi, miRNA'lar farklı dokularda farklı genleri de hedefleyebilir (Tran ve Montano, 2017). Bu durum göz önünde bulundurularak, gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda özellikle nöronal yollarda iş gören genler listelenmiş ve bu listeden, daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda BB ile ilişkilendirilmiş genlerin seçilmesine özen gösterilmiştir. Belirlenen bu genler *ANK3*, *AXIN2*, *BCL2*, *BDNF*, *CACNA1C*, *CACNB3* ve *SYT1*'dir. Takip eden deneylerde ise, belirlenen bu genlerin ifade düzeyleri incelenmiştir. Bu deneylerin sonucunda, lityum ile birlikte her iki zaman noktasında da miR-34a düzeylerinde azalış görülen hastaya ait (BB-LR) nöronlarda hedef gen düzeylerinin de lityum ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı saptanmıştır. *ANK3*, *AXIN2*, *CACNA1C* ve *CACNB3* mRNA düzeylerindeki artış hafif iken (<1,5-kat değişim), *BCL2*, *BDNF* ve *SYT1* mRNA düzeylerinde 1,5-kat ve üzeri artış saptanmıştır. Öte yandan, sadece 2-haftalık lityum ile farklılaşma miR-34a seviyesinde %30 azalma görülen BB-LNR-1 ve %46 artış görülen BB-LNR-2 hatlarında hedef genlerin ifade düzeylerinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır.

BDNF hariç, belirlenen tüm hedef genler miR-34a'nın doğrulanmış hedef genleri arasında olduğundan, bu genler için ek bir doğrulama işlemi yapılmamıştır [(Agostini ve ark., 2011); (Cha ve ark., 2012); (Bavamian ve ark., 2015)]. Bununla birlikte, karşılaştırmalı hedef gen analizlerinde sadece bir algorithmada tahmini gen olarak bildirilen *BDNF* geni için ek olarak PITA analizi gerçekleştirilmiş ve miR-34a-5p ile *BDNF* transkriptleri arasında sınırda ancak potansiyel bir ilişki saptanmıştır. Bu genin çalışmaya dahil edilmek istenmesinin başlıca nedenlerinden biri, literatürde BB hastalarında *BDNF* deregülasyonuna dair pek çok çalışmanın bildirilmiş olmasıdır. *BDNF*, nörotrofin ailesinin bir üyesidir ve nöroenez, olgunlaşma, plastisite gibi nörogelişimsel süreçlerde önemli bir rol oynamanın yanı sıra (Gomez-Palacio-Schjetnan ve Escobar, 2013) yetişkin beyinde nöronal sağ kalıma da aracılık eder (Kowianski ve ark., 2018). Literatürde *BDNF* ve BB arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışmada, hasta serum örneklerinde *BDNF* düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla düşük olduğu (Fernandes ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2009; Li ve ark., 2014; Monteleone ve ark., 2008), ayrıca *BDNF* genindeki Val66Met polimorfizminin de BB ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mandolini ve ark., 2018).

Bu nedenle, kurulan ek deneyler ile miR-34a aşırı ifadesinin nöron benzeri bir hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinde *BDNF* gen ve protein düzeylerine nasıl bir etkisi olduğu incelenmiştir. Transfeksiyon işlemlerinin NPH'lerde optimize edilememiş olması ve zaman kısıtlılığı nedeniyle, sadece bu deneylerde transfeksiyon verimliliği yüksek olan ve geçmiş çalışmalarımızda optimize edilmiş olan SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Transfeksiyon deneylerinin sonucunda, artmış miR-34a ifade düzeylerinde *BDNF* mRNA'sında ve hücrelerden salınan *BDNF* protein miktarlarında da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (sırasıyla %40 ve %50) saptanmıştır. Deneysel miRNA-hedef gen doğrulanmasında lusiferaz aktivitesi analizlerinin geçerliliği kabul edilmektedir (Heyn ve ark., 2013); ancak çalışma bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle lusiferaz aktivitesi analizi gerçekleştiremediği için, kurulan bu deney seti ile, dolaylı yoldan da olsa miR-34a ve *BDNF* arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Ancak bu sonuçların, NPH'ler ile ve lusiferaz aktivitesi analizi ile doğrulanması şarttır.

Çalışma sonuçlarımızda dikkat çeken önemli noktalardan birisi ise lityum etkinliğinin sadece bir hücre hattında (BB-LR; lityuma klinik olarak yanıt veren hasta) gözlenmiş olmasıydı. Diğer iki hücre hattında (BB-LNR-1 ve BB-LNR-2; lityuma klinik olarak yanıt vermeyen hastalar) ise ya yüksek dozlarda/ufak bir etkinlik saptanmış, ya da herhangi bir yanıt alınamamıştır.

Çalışmaya dahil edilen örnek sayısının oldukça az olması nedeniyle, örneklemimizde lityuma yanıt verdiği bilinen tek bir hastaya ait hücreler değerlendirilebilmiştir. Bu durum, elde edilen sonuçların genelleştirilebilmesinin önünde büyük bir engel teşkil etmektedir. Yine de literatürde hastaların lityuma verdiği yanıtların IPS hücrelerden elde edilen nöronlarda da saptanabileceğini işaret eden çalışmalar mevcuttur. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, BB hastalarına özgü IPS hücrelerinden üretilmiş nöronların, sağlıklı kontrol deneklerinden alınan nöronlara kıyasla hipereksitabil olduğu, hücelere lityum uygulandığında ise lityuma klinik olarak cevap veren hastalara ait hücrelerde hipereksitabilitede azalma meydana gelirken, cevap vermeyen hücrelerden herhangi bir düzelme olmadığı bildirilmiştir (Mertens ve ark., 2015). BB hastalarına özgü immortalize lenfositlerden üretilen IPS hücrelerden elde edilen nöronların kullanıldığı bir başka çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Stern ve ark., 2017). Literatürdeki bu veriler, bir hastanın klinik olarak lityum tedavisine yanıt verip vermemesinin, hücre düzeyinde *in vitro* olarak da gözlenebileceğini işaret etmesi açısından oldukça önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, BB hastalarından elde edilen nöronların sahip olduğu miRNA ifade profilinin, sağlıklı kontrollere kıyasla önemli farklılıklar içerdiğini işaret etse de çalışmaya sadece üç adet BB hastası ve üç adet sağlıklı kontrolün dahil edilebilmiş olması çok önemli bir kısıtlılıktır. Bunun neticesinde, miRNA profillemesi sonucunda istatistiksel olarak 1,5 kat ve daha fazla değişim gösterdiği tespit edilen miRNA'lar belirlenmiş ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında çalışılmak üzere miR-34a seçilmiştir. Bu miRNA'nın seçilmesinin başlıca nedenleri miR-34a'nın literatürdeki çalışmalarda BB ile ilişki olduğunun bildirilmiş olması ve bizim de tüm örneklerimizde artmış olmasıdır. Bununla birlikte, gelecekte planlanacak çalışmalarda, çalışma öncesinde gerçekleştirilerek güç analizine uygun sayıda hastadan örnek elde edilerek yeni bir global miRNA analizinin gerçekleştirilmesi, hastalık oluşumunda ve gidişatında rol oynayan tüm miRNA'ların belirlenebilmesi açısından oldukça önemlidir.

Ek olarak, BB tedavisinde sıklıkla başvuru alan bir ilaç olan lityumun, hastalık ile ilişkili olduğu düşünülen miR-34a ifadesindeki artışı geri çevrilebilir olması ihtimali oldukça ilgi çekici olmakla birlikte, bu verilerin tek bir hastadan elde edilen bulgulara dayanıyor olması oldukça yetersizdir. Bu deney sonuçlarının yorumlanabilmesi ve lityumun etki mekanizmasında miR-34a'nın rolü olup olmadığının anlaşılabilmesi için daha fazla lityum-responder/non-responder hastalarda incelenmesi kesinlikle gereklidir.

7. KAYNAKLAR

Agostini M, Tucci P, Steinert JR, Shalom-Feuerstein R, Rouleau M, Aberdam D, Forsythe ID, Young KW, Ventura A, Concepcion CP, Han YC, Candi E, Knight RA, Mak TW, & Melino G. (2011). microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(52), 21099-21104. doi:10.1073/pnas.1112063108

Ahn KH, Lyoo IK, Lee HK, Song IC, Oh JS, Hwang J, Kwon J, Kim MJ, Kim M, & Renshaw PF. (2004). White matter hyperintensities in subjects with bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*, 58(5), 516-521. doi:10.1111/j.1440-1819.2004.01294.x

Alural B, Genc S, & Haggarty SJ. (2017). Diagnostic and therapeutic potential of microRNAs in neuropsychiatric disorders: Past, present, and future. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 73, 87-103. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.03.010

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). Washington, DC.

Azevedo JA, Carter BS, Meng F, Turner DL, Dai M, Schatzberg AF, Barchas JD, Jones EG, Bunney WE, Myers RM, Akil H, Watson SJ, & Thompson RC. (2016). The microRNA network is altered in anterior cingulate cortex of patients with unipolar and bipolar depression. *J Psychiatr Res*, 82, 58-67. doi:10.1016/j.jpsychires.2016.07.012

Baker M. (2007). Adult cells reprogrammed to pluripotency, without tumors. *Nature Reports Stem Cells*, doi:10.1038/stemcells.2007.124.

Baldessarini RJ, & Tondo L. (2000). Does lithium treatment still work? Evidence of stable responses over three decades. *Arch Gen Psychiatry*, 57(2), 187-190,

Baldessarini RJ, Tondo L, Vazquez GH, Undurraga J, Bolzani L, Yildiz A, Khalsa HM, Lai M, Lepri B, Lolich M, Maffei PM, Salvatore P, Faedda GL, Vieta E, & Tohen M. (2012). Age at onset versus family history and clinical outcomes in 1,665 international bipolar-I disorder patients. *World Psychiatry*, 11(1), 40-46.

Banach E, Dmitrzak-Weglarz M, Pawlak J, Kapelski P, Szczepankiewicz A, Rajewska-Rager A, Slopian A, Skibinska M, Czerski P, & Hauser J. (2017). Dysregulation of miR-499, miR-708 and miR-1908 during a depression episode in bipolar disorders. *Neurosci Lett*, 654, 117-119. doi:10.1016/j.neulet.2017.06.019

Banigan MG, Kao PF, Kozubek JA, Winslow AR, Medina J, Costa J, Schmitt A, Schneider A, Cabral H, Cagsal-Getkin O, Vanderburg CR, & Delalle I. (2013). Differential expression of exosomal microRNAs in prefrontal cortices of schizophrenia and bipolar disorder patients. *PLoS One*, 8(1), e48814. doi:10.1371/journal.pone.0048814

Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, Schulze TG, Cichon S, Rietschel M, Nothen MM, Georgi A, Schumacher J, Schwarz M, Abou Jamra R, Hofels S, Propping P, Satagopan J, Detera-Wadleigh SD, Hardy J, & McMahon FJ. (2008). A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 13(2), 197-207. doi:10.1038/sj.mp.4002012

Bavamian S, Mellios N, Lalonde J, Fass DM, Wang J, Sheridan SD, Madison JM, Zhou F, Rueckert EH, Barker D, Perlis RH, Sur M, & Haggarty SJ. (2015). Dysregulation of miR-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 20(5), 573-584. doi:10.1038/mp.2014.176

Bergen SE, O'Dushlaine CT, Ripke S, Lee PH, Ruderfer DM, Akterin S, Moran JL, Chambert KD, Handsaker RE, Backlund L, Osby U, McCarroll S, Landen M, Scolnick EM, Magnusson PK, Lichtenstein P, Hultman CM, Purcell SM, Sklar P, & Sullivan PF. (2012). Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 17(9), 880-886. doi:10.1038/mp.2012.73

Brambilla P, Harenski K, Nicoletti M, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Keshavan MS, & Soares JC. (2001). MRI study of posterior fossa structures and brain ventricles in bipolar patients. *J Psychiatr Res*, 35(6), 313-322.

Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, & Gage FH. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473(7346), 221-225. doi:10.1038/nature09915

Brooks JO, 3rd, Vizueta N, Penfold C, Townsend JD, Bookheimer SY, & Altshuler LL. (2015). Prefrontal hypoactivation during working memory in bipolar II depression. *Psychol Med*, 45(8), 1731-1740, doi:10.1017/S0033291714002852

Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, Hoke H, Wu T, Ganz K, Akhtar-Zaidi B, He Y, Abraham BJ, Porubsky D, Kulenkampff E, Faddah DA, Shi L, Gao Q, Sarkar S, Cohen M, Goldmann J, Nery JR, Schultz MD, Ecker JR, Xiao A, Young RA, Lansdorp PM, & Jaenisch R. (2014). The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell*, 15(3), 295-309. doi:10.1016/j.stem.2014.07.003

Cha YH, Kim NH, Park C, Lee I, Kim HS & Yook JI. (2012). MiRNA-34 intrinsically links p53 tumor suppressor and Wnt signaling. *Cell Cycle*, 11(7):1273-81. doi: 10.4161/cc.19618.

Charney AW, Ruderfer DM, Stahl EA, Moran JL, Chambert K, Belliveau RA, Forty L, Gordon-Smith K, Di Florio A, Lee PH, Bromet EJ, Buckley PF, Escamilla MA, Fanous AH, Fochtmann LJ, Lehrer

DS, Malaspina D, Marder SR, Morley CP, Nicolini H, Perkins DO, Rakofsky JJ, Rapaport MH, Medeiros H, Sobell JL, Green EK, Backlund L, Bergen SE, Jureus A, Schalling M, Lichtenstein P, Roussos P, Knowles JA, Jones I, Jones LA, Hultman CM, Perlis RH, Purcell SM, McCarroll SA, Pato CN, Pato MT, Craddock N, Landen M, Smoller JW, & Sklar P. (2017). Evidence for genetic heterogeneity between clinical subtypes of bipolar disorder. *Transl Psychiatry*, 7(1), e993. doi:10.1038/tp.2016.242

Charney DS, Nestler EJ, Sklar P, Buxbaum JD, Burdick KE, Ospina LH, Haggarty SJ, & Perlis RH. (2017). Charney & Nestler's Neurobiology of Mental Illness *The Neurobiology and Treatment of Bipolar Disorder*.

Chen DT, Jiang X, Akula N, Shugart YY, Wendland JR, Steele CJ, Kassem L, Park JH, Chatterjee N, Jamain S, Cheng A, Leboyer M, Muglia P, Schulze TG, Cichon S, Nothen MM, Rietschel M, BiGs, McMahon FJ, Farmer A, McGuffin P, Craig I, Lewis C, Hosang G, Cohen-Woods S, Vincent JB, Kennedy JL, & Strauss J. (2013). Genome-wide association study meta-analysis of European and Asian-ancestry samples identifies three novel loci associated with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 18(2), 195-205. doi:10.1038/mp.2011.157

Chen H, Wang N, Burmeister M, & McInnis MG. (2009). MicroRNA expression changes in lymphoblastoid cell lines in response to lithium treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12(7), 975-981. doi:10.1017/S1461145709000029

Chen HM, DeLong CJ, Bame M, Rajapakse I, Herron TJ, McInnis MG, & O'Shea KS. (2014). Transcripts involved in calcium signaling and telencephalic neuronal fate are altered in induced pluripotent stem cells from bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*, 4, e375. doi:10.1038/tp.2014.12

Cichon S, Muhleisen TW, Degenhardt FA, Mattheisen M, Miro X, Strohmaier J, Steffens M, Meesters C, Herms S, Weingarten M, Priebe L, Haenisch B, Alexander M, Vollmer J, Breuer R, Schmal C, Tessmann P, Moebus S, Wichmann HE, Schreiber S, Muller-Myhsok B, Lucae S, Jamain S, Leboyer M, Bellivier F, Etain B, Henry C, Kahn JP, Heath S, Bipolar Disorder Genome Study C, Hamshere M, O'Donovan MC, Owen MJ, Craddock N, Schwarz M, Vedder H, Kammerer-Ciernioch J, Reif A, Sasse J, Bauer M, Hautzinger M, Wright A, Mitchell PB, Schofield PR, Montgomery GW, Medland SE, Gordon SD, Martin NG, Gustafsson O, Andreassen O, Djurovic S, Sigurdsson E, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Kapur-Pojksic L, Oruc L, Rivas F, Mayoral F, Chuchalin A, Babadjanova G, Tiganov AS, Pantelejeva G, Abramova LI, Grigoriou-Serbanescu M, Diaconu CC, Czerski PM, Hauser J, Zimmer A, Lathrop M, Schulze TG, Wienker TF, Schumacher J, Maier W, Propping P, Rietschel M, & Nothen MM. (2011). Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder. *Am J Hum Genet*, 88(3), 372-381. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.017

- Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, & Terskikh AV. (2013). SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(32), E3017-3026. doi:10.1073/pnas.1220176110
- Cousins DA, & Grunze H. (2012). Interpreting magnetic resonance imaging findings in bipolar disorder. *CNS Neurosci Ther*, 18(3), 201-207. doi:10.1111/j.1755-5949.2011.00280.x
- Craddock N, & Sklar P. (2013). Genetics of bipolar disorder. *Lancet*, 381(9878), 1654-1662. doi:10.1016/S0140-6736(13)60855-7
- Dalmay T. (2013). Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem*, 54, 29-38. doi:10.1042/bse0540029
- Draper JS, & Fox V. (2003). Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Arch Med Res*, 34(6), 558-564. doi:10.1016/j.arcmed.2003.08.006
- Du ZW, Chen H, Liu H, Lu J, Qian K, Huang CL, Zhong X, Fan F, & Zhang SC. (2015). Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 6, 6626. doi:10.1038/ncomms7626
- Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Pan L, Miller RJ, & Kessler JA. (2014). Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Mol Neurodegener*, 9, 3. doi:10.1186/1750-1326-9-3
- Dweep H, & Gretz N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*, 12(8), 697. doi:10.1038/nmeth.3485
- Eroglu ZM, & Ozpoyraz N. (2010). Bipolar bozuklukta koruyucu tedavi. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar- (Current Approaches in Psychiatry)* 2(2), 206-236.
- Fernandes BS, Gama CS, Cereser KM, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, de Lucena D, Kunz M, Gomes FA, & Kapczinski F. (2011). Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*, 45(8), 995-1004. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.03.002
- Fernandes BS, Gama CS, Kauer-Sant'Anna M, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, & Kapczinski F. (2009). Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression: a potential adjunctive tool for differential diagnosis. *J Psychiatr Res*, 43(15), 1200-1204. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.04.010
- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, Defelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, St CD, Robinson M, Van Beck M, Pereira AC, Kandaswamy R, McQuillin

A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P, Craddock N, & Wellcome Trust Case Control C. (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet*, 40(9), 1056-1058. doi:10.1038/ng.209

Garnham J, Munro A, Slaney C, Macdougall M, Passmore M, Duffy A, O'Donovan C, Teehan A, & Alda M. (2007). Prophylactic treatment response in bipolar disorder: results of a naturalistic observation study. *J Affect Disord*, 104(1-3), 185-190, doi:10.1016/j.jad.2007.03.003

Geddes JR, & Miklowitz DJ. (2013). Treatment of bipolar disorder. *Lancet*, 381(9878), 10.1016/S0140-6736(1013)60857-60850, doi:10.1016/S0140-6736(13)60857-0

Gomez-Palacio-Schjetnan A, & Escobar ML. (2013). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci*, 15, 117-136. doi:10.1007/7854_2012_231

Goodwin GM. (2003). Evidence-Based Guidelines for Treating Bipolar Disorder: Recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 17(2), 149-173. doi:10.1177/0269881103017002003

Grof P. (2010). Sixty years of lithium responders. *Neuropsychobiology*, 62(1), 8-16. doi:10.1159/000314305

Group PGCBDW. (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet*, 43(10), 977-983. doi:10.1038/ng.943

Ha M, & Kim VN. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(8), 509-524. doi:10.1038/nrm3838

Hammond SM. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 3-14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001

Hamzeiy H, Allmer J, & Yousef M. (2014). Computational methods for microRNA target prediction. *Methods Mol Biol*, 1107, 207-221. doi:10.1007/978-1-62703-748-8_12

Heyn J, Hinske LC, Ledderose C, Limbeck E, & Kreth S. (2013). Experimental miRNA Target Validation. In S.-Y. Ying (Ed.), *MicroRNA Protocols* (pp. 83-90). Totowa, NJ: Humana Press.

Hommers LG, Domschke K, & Deckert J. (2015). Heterogeneity and individuality: microRNAs in mental disorders. *J Neural Transm (Vienna)*, 122(1), 79-97. doi:10.1007/s00702-014-1338-4

Hou L, Bergen SE, Akula N, Song J, Hultman CM, Landen M, Adli M, Alda M, Ardan R, Arias B, Aubry JM, Backlund L, Badner JA, Barrett TB, Bauer M, Baune BT, Bellivier F, Benabarre A, Bengesser S, Berrettini WH, Bhattacharjee AK, Biernacka JM, Birner A, Bloss CS, Brichant-Petitjean C, Bui ET, Byerley W, Cervantes P, Chillotti C, Cichon S, Colom F, Coryell W, Craig DW, Cruceanu C, Czerski PM,

Davis T, Dayer A, Degenhardt F, Del Zompo M, DePaulo JR, Edenberg HJ, Etain B, Falkai P, Foroud T, Forstner AJ, Frisen L, Frye MA, Fullerton JM, Gard S, Garnham JS, Gershon ES, Goes FS, Greenwood TA, Grigoriu-Serbanescu M, Hauser J, Heilbronner U, Heilmann-Heimbach S, Herms S, Hipolito M, Hitturlingappa S, Hoffmann P, Hofmann A, Jamain S, Jimenez E, Kahn JP, Kassem L, Kelsoe JR, Kittel-Schneider S, Kliwicky S, Koller DL, Konig B, Lackner N, Laje G, Lang M, Lavebratt C, Lawson WB, Leboyer M, Leckband SG, Liu C, Maaser A, Mahon PB, Maier W, Maj M, Manchia M, Martinsson L, McCarthy MJ, McElroy SL, McInnis MG, McKinney R, Mitchell PB, Mitjans M, Mondimore FM, Monteleone P, Muhleisen TW, Nievergelt CM, Nothen MM, Novak T, Nurnberger JI, Jr., Nwulia EA, Osby U, Pfennig A, Potash JB, Propping P, Reif A, Reininghaus E, Rice J, Rietschel M, Rouleau GA, Rybakowski JK, Schalling M, Scheftner WA, Schofield PR, Schork NJ, Schulze TG, Schumacher J, Schweizer BW, Severino G, Shekhtman T, Shilling PD, Simhandl C, Slaney CM, Smith EN, Squassina A, Stamm T, Stopkova P, Streit F, Strohmaier J, Szelinger S, Tighe SK, Tortorella A, Turecki G, Vieta E, Volkert J, Witt SH, Wright A, Zandi PP, Zhang P, Zollner S, & McMahon FJ. (2016). Genome-wide association study of 40,000 individuals identifies two novel loci associated with bipolar disorder. *Hum Mol Genet*, 25(15), 3383-3394. doi:10.1093/hmg/ddw181

Hu BY, & Zhang SC. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc*, 4(9), 1295-1304. doi:10.1038/nprot.2009.127

Hunsberger JG, Chibane FL, Elkahoul AG, Henderson R, Singh R, Lawson J, Cruceanu C, Nagarajan V, Turecki G, Squassina A, Medeiros CD, Del Zompo M, Rouleau GA, Alda M, & Chuang DM. (2015). Novel integrative genomic tool for interrogating lithium response in bipolar disorder. *Transl Psychiatry*, 5, e504. doi:10.1038/tp.2014.139

Ikeda M, Saito T, Kondo K, & Iwata N. (2018). Genome-wide association studies of bipolar disorder: A systematic review of recent findings and their clinical implications. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72(2), 52-63. doi:10.1111/pcn.12611

Ikeda M, Takahashi A, Kamatani Y, Okahisa Y, Kunugi H, Mori N, Sasaki T, Ohmori T, Okamoto Y, Kawasaki H, Shimodera S, Kato T, Yoneda H, Yoshimura R, Iyo M, Matsuda K, Akiyama M, Ashikawa K, Kashiwase K, Tokunaga K, Kondo K, Saito T, Shimasaki A, Kawase K, Kitajima T, Matsuo K, Itokawa M, Someya T, Inada T, Hashimoto R, Inoue T, Akiyama K, Tanii H, Arai H, Kanba S, Ozaki N, Kusumi I, Yoshikawa T, Kubo M, & Iwata N. (2018). A genome-wide association study identifies two novel susceptibility loci and trans population polygenicity associated with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 23(3), 639-647. doi:10.1038/mp.2016.259

Jauhari A, Singh T, Singh P, Parmar D, & Yadav S. (2018). Regulation of miR-34 Family in Neuronal Development. *Mol Neurobiol*, 55(2), 936-945. doi:10.1007/s12035-016-0359-4

- Ji F, Lv X, & Jiao J. (2013). The role of microRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *J Genet Genomics*, 40(2), 61-66. doi:10.1016/j.jgg.2012.12.008
- Jiang Y, & Zhang H. (2011). Propensity score-based nonparametric test revealing genetic variants underlying bipolar disorder. *Genet Epidemiol*, 35(2), 125-132. doi:10.1002/gepi.20558
- Kerner B. (2014). Genetics of bipolar disorder. *Appl Clin Genet*, 7, 33-42. doi:10.2147/TACG.S39297
- Kim AH, Reimers M, Maher B, Williamson V, McMichael O, McClay JL, van den Oord EJ, Riley BP, Kendler KS, & Vladimirov VI. (2010). MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res*, 124(1-3), 183-191. doi:10.1016/j.schres.2010.07.002
- Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, & Ruvkun G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(1), 360-365. doi:10.1073/pnas.2333854100
- Kim KH, Liu J, Sells Galvin RJ, Dage JL, Egeland JA, Smith RC, Merchant KM, & Paul SM. (2015). Transcriptomic Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Patients with Bipolar Disorder from an Old Order Amish Pedigree. *PLoS One*, 10(11), e0142693. doi:10.1371/journal.pone.0142693
- Kleindienst N, Engel R, & Greil W. (2005). Which clinical factors predict response to prophylactic lithium? A systematic review for bipolar disorders. *Bipolar Disord*, 7(5), 404-417. doi:10.1111/j.1399-5618.2005.00244.x
- Kowianski P, Lietzau G, Czuba E, Waskow M, Steliga A, & Morys J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*, 38(3), 579-593. doi:10.1007/s10571-017-0510-4
- Kumar D, Talluri TR, Anand T, & Kues WA. (2015). Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World J Stem Cells*, 7(2), 315-328. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.315
- Kurita M. (2016). Noradrenaline plays a critical role in the switch to a manic episode and treatment of a depressive episode. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 2373-2380. doi:10.2147/NDT.S109835
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, & Burge CB. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), 787-798.
- Li L, Chao J, & Shi Y. (2018). Modeling neurological diseases using iPSC-derived neural cells : iPSC modeling of neurological diseases. *Cell Tissue Res*, 371(1), 143-151. doi:10.1007/s00441-017-2713-x

- Li XJ, Zhang X, Johnson MA, Wang ZB, Lavaute T, & Zhang SC. (2009). Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development*, 136(23), 4055-4063. doi:10.1242/dev.036624
- Li Z, Zhang C, Fan J, Yuan C, Huang J, Chen J, Yi Z, Wang Z, Hong W, Wang Y, Lu W, Guan Y, Wu Z, Su Y, Cao L, Hu Y, Hao Y, Liu M, Yu S, Cui D, Xu L, Song Y, & Fang Y. (2014). Brain-derived neurotrophic factor levels and bipolar disorder in patients in their first depressive episode: 3-year prospective longitudinal study. *Br J Psychiatry*, 205(1), 29-35. doi:10.1192/bjp.bp.113.134064
- Liu H, & Zhang SC. (2011). Specification of neuronal and glial subtypes from human pluripotent stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 68(24), 3995-4008. doi:10.1007/s00018-011-0770-y
- Liu Y, Liu H, Sauvey C, Yao L, Zarnowska ED, & Zhang SC. (2013). Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 8(9), 1670-1679. doi:10.1038/nprot.2013.106
- Livak KJ, & Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Madison JM, Zhou F, Nigam A, Hussain A, Barker DD, Nehme R, van der Ven K, Hsu J, Wolf P, Fleishman M, O'Dushlaine C, Rose S, Chambert K, Lau FH, Ahfeldt T, Rueckert EH, Sheridan SD, Fass DM, Nemesh J, Mullen TE, Daheron L, McCarroll S, Sklar P, Perlis RH, & Haggarty SJ. (2015). Characterization of bipolar disorder patient-specific induced pluripotent stem cells from a family reveals neurodevelopmental and mRNA expression abnormalities. *Mol Psychiatry*, 20(6), 703-717. doi:10.1038/mp.2015.7
- Maffioletti E, Cattaneo A, Rosso G, Maina G, Maj C, Gennarelli M, Tardito D, & Bocchio-Chiavetto L. (2016). Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *J Affect Disord*, 200, 250-258. doi:10.1016/j.jad.2016.04.021
- Mandolini GM, Lazzaretti M, Pigoni A, Delvecchio G, Soares JC, & Brambilla P. (2018). The impact of BDNF Val66Met polymorphism on cognition in Bipolar Disorder: a review. *Journal of Affective Disorders*. doi:10.1016/j.jad.2018.07.054
- Marneros A. (2001). Origin and development of concepts of bipolar mixed states. *J Affect Disord*, 67(1-3), 229-240,
- Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, & Zarkov Z. (2011). Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry*, 68(3), 241-251. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.12

Mertens J, Wang QW, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B, Zheng Y, Diffenderfer KE, Zhang J, Soltani S, Eames T, Schafer ST, Boyer L, Marchetto MC, Nurnberger JI, Calabrese JR, Odegaard KJ, McCarthy MJ, Zandi PP, Alda M, Nievergelt CM, Pharmacogenomics of Bipolar Disorder S, Mi S, Brennand KJ, Kelsoe JR, Gage FH, & Yao J. (2015). Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*, 527(7576), 95-99. doi:10.1038/nature15526

Mertens J, Wang QW, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B, Zheng Y, Diffenderfer KE, Zhang J, Soltani S, Eames T, Schafer ST, Boyer L, Marchetto MC, Nurnberger JI, Calabrese JR, Odegaard KJ, McCarthy MJ, Zandi PP, Alda M, Nievergelt CM, Pharmacogenomics of Bipolar Disorder S, Mi S, Brennand KJ, Kelsoe JR, Gage FH, & Yao J. (2016). Erratum: Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*, 530(7589), 242. doi:10.1038/nature16182

Miller BH, Zeier Z, Xi L, Lanz TA, Deng S, Strathmann J, Willoughby D, Kenny PJ, Elsworth JD, Lawrence MS, Roth RH, Edbauer D, Kleiman RJ, & Wahlestedt C. (2012). MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(8), 3125-3130, doi:10.1073/pnas.1113793109

Miura T, Noma H, Furukawa TA, Mitsuyasu H, Tanaka S, Stockton S, Salanti G, Motomura K, Shimano-Katsuki S, Leucht S, Cipriani A, Geddes JR, & Kanba S. (2014). Comparative efficacy and tolerability of pharmacological treatments in the maintenance treatment of bipolar disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry*, 1(5), 351-359. doi:10.1016/S2215-0366(14)70314-1

Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, & Maj M. (2008). Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord*, 10(1), 95-100, doi:10.1111/j.1399-5618.2008.00459.x

Moreau MP, Bruse SE, David-Rus R, Buyske S, & Brzustowicz LM. (2011). Altered microRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 69(2), 188-193. doi:10.1016/j.biopsych.2010.09.039

Morgado AL, Xavier JM, Dionisio PA, Ribeiro MF, Dias RB, Sebastiao AM, Sola S, & Rodrigues CM. (2015). MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins. *Mol Neurobiol*, 51(3), 1168-1183. doi:10.1007/s12035-014-8794-6

Muhleisen TW, Leber M, Schulze TG, Strohmaier J, Degenhardt F, Treutlein J, Mattheisen M, Forstner AJ, Schumacher J, Breuer R, Meier S, Herms S, Hoffmann P, Lacour A, Witt SH, Reif A, Muller-Myhsok B, Lucae S, Maier W, Schwarz M, Vedder H, Kammerer-Ciernioch J, Pfennig A, Bauer M, Hautzinger M, Moebus S, Priebe L, Czerski PM, Hauser J, Lissowska J, Szeszenia-Dabrowska N, Brennan

P, McKay JD, Wright A, Mitchell PB, Fullerton JM, Schofield PR, Montgomery GW, Medland SE, Gordon SD, Martin NG, Krasnow V, Chuchalin A, Babadjanova G, Pantelejeva G, Abramova LI, Tiganov AS, Polonikov A, Khusnutdinova E, Alda M, Grof P, Rouleau GA, Turecki G, Laprise C, Rivas F, Mayoral F, Kogevinas M, Grigoriu-Serbanescu M, Propping P, Becker T, Rietschel M, Nothen MM, & Cichon S. (2014). Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat Commun*, 5, 3339. doi:10.1038/ncomms4339

Nestler EJ, & Hyman SE. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 13(10), 1161-1169. doi:10.1038/nn.2647

Nivoli AM, Pacchiarotti I, Rosa AR, Popovic D, Murru A, Valenti M, Bonnin CM, Grande I, Sanchez-Moreno J, Vieta E, & Colom F. (2011). Gender differences in a cohort study of 604 bipolar patients: the role of predominant polarity. *J Affect Disord*, 133(3), 443-449. doi:10.1016/j.jad.2011.04.055

O'Carroll D, & Schaefer A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39-54. doi:10.1038/npp.2012.87

Papiol S, Schulze TG, & Alda M. (2018). Genetics of Lithium Response in Bipolar Disorder. *Pharmacopsychiatry*. doi:10.1055/a-0590-4992

Pfaffenseller B, Kapczinski F, Gallitano AL, & Klamt F. (2018). EGR3 Immediate Early Gene and the Brain-Derived Neurotrophic Factor in Bipolar Disorder. *Front Behav Neurosci*, 12, 15. doi:10.3389/fnbeh.2018.00015

Phillips ML, & Swartz HA. (2014). A critical appraisal of neuroimaging studies of bipolar disorder: toward a new conceptualization of underlying neural circuitry and a road map for future research. *Am J Psychiatry*, 171(8), 829-843. doi:10.1176/appi.ajp.2014.13081008

Post RM, Stoddard FJ, Gillin JC, Buchsbaum MS, Runkle DC, Black KE, & Bunney WE, Jr. (1977). Alterations in motor activity, sleep, and biochemistry in a cycling manic-depressive patient. *Arch Gen Psychiatry*, 34(4), 470-477.

Puri MC, & Nagy A. (2012). Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells*, 30(1), 10-14. doi:10.1002/stem.788

Rong H, Liu TB, Yang KJ, Yang HC, Wu DH, Liao CP, Hong F, Yang HZ, Wan F, Ye XY, Xu D, Zhang X, Chao CA, & Shen QJ. (2011). MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *J Psychiatr Res*, 45(1), 92-95. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.04.028

Schneider MR, DelBello MP, McNamara RK, Strakowski SM, & Adler CM. (2012). Neuroprogression in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 14(4), 356-374. doi:10.1111/j.1399-5618.2012.01024.x

Schöler HR. (2007). The Potential of Stem Cells: An Inventory. In D. S. Nikolaus Knoepffler, and Stefan Lorenz Sorgner (Ed.), *Human biotechnology as Social Challenge* (pp. 28). London: Ashgate Publishing, Ltd.

Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, & Greenberg ME. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283-289. doi:10.1038/nature04367

Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR, & Ding S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3(5), 568-574. doi:10.1016/j.stem.2008.10.004

Smalheiser NR, Lugli G, Zhang H, Rizavi H, Cook EH, & Dwivedi Y. (2014). Expression of microRNAs and other small RNAs in prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and depressed subjects. *PLoS One*, 9(1), e86469. doi:10.1371/journal.pone.0086469

Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, & Wulczyn FG. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*, 21(6), 1469-1477. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x

Smoller JW, & Finn CT. (2003). Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 123C(1), 48-58. doi:10.1002/ajmg.c.20013

Sportiche S, Geoffroy PA, Brichant-Petitjean C, Gard S, Khan JP, Azorin JM, Henry C, Leboyer M, Etain B, Scott J, & Bellivier F. (2017). Clinical factors associated with lithium response in bipolar disorders. *Aust N Z J Psychiatry*, 51(5), 524-530. doi:10.1177/0004867416664794

Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, & Hochedlinger K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322(5903), 945-949. doi:10.1126/science.1162494

Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, Mostoslavsky G, & Jaenisch R. (2010). Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(1), 20-24. doi:10.1016/j.stem.2010.06.002

Stahl E, Forstner A, McQuillin A, Ripke S, Ophoff R, Scott L, Cichon S, Andreassen OA, Sklar P, Kelsoe J, & Breen G. (2017). Genomewide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. *bioRxiv*. doi:10.1101/173062

Stern S, Santos R, Marchetto MC, Mendes AP, Rouleau GA, Biesmans S, Wang QW, Yao J, Charnay P, Bang AG, Alda M, & Gage FH. (2017). Neurons derived from patients with bipolar disorder divide into intrinsically different sub-populations of neurons, predicting the patients' responsiveness to lithium. *Mol Psychiatry*. doi:10.1038/mp.2016.260

Strakowski SM, Adler CM, Almeida J, Altshuler LL, Blumberg HP, Chang KD, DelBello MP, Frangou S, McIntosh A, Phillips ML, Sussman JE, & Townsend JD. (2012). The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disord*, 14(4), 313-325. doi:10.1111/j.1399-5618.2012.01022.x

Strazisar M, Cammaerts S, van der Ven K, Forero DA, Lenaerts AS, Nordin A, Almeida-Souza L, Genovese G, Timmerman V, Liekens A, De Rijk P, Adolfsson R, Callaerts P, & Del-Favero J. (2015). MIR137 variants identified in psychiatric patients affect synaptogenesis and neuronal transmission gene sets. *Mol Psychiatry*, 20(4), 472-481. doi:10.1038/mp.2014.53

Sun Y, Luo ZM, Guo XM, Su DF, & Liu X. (2015). An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci*, 9, 193. doi:10.3389/fncel.2015.00193

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, & Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi K, & Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Tobe BTD, Crain AM, Winquist AM, Calabrese B, Makihara H, Zhao WN, Lalonde J, Nakamura H, Konopaske G, Sidor M, Pernia CD, Yamashita N, Wada M, Inoue Y, Nakamura F, Sheridan SD, Logan RW, Brandel M, Wu D, Hunsberger J, Dorsett L, Duerr C, Basa RCB, McCarthy MJ, Udeshi ND, Mertins P, Carr SA, Rouleau GA, Mastrangelo L, Li J, Gutierrez GJ, Brill LM, Venizelos N, Chen G, Nye JS, Manji H, Price JH, McClung CA, Akiskal HS, Alda M, Chuang DM, Coyle JT, Liu Y, Teng YD, Ohshima T, Mikoshiba K, Sidman RL, Halpain S, Haggarty SJ, Goshima Y, & Snyder EY. (2017). Probing the lithium-response pathway in hiPSCs implicates the phosphoregulatory set-point for a cytoskeletal modulator in bipolar pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(22), E4462-E4471. doi:10.1073/pnas.1700111114

Tohen M, & Vieta E. (2009). Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord*, 11 Suppl 2, 45-54. doi:10.1111/j.1399-5618.2009.00710.x

Tran TH, & Montano MA. (2017). Chapter 1 - MicroRNAs: Mirrors of Health and Disease. In J. Laurence (Ed.), *Translating MicroRNAs to the Clinic* (pp. 1-15). Boston: Academic Press.

Turan MT, & Lushi Z. (2014). Bipolar Bozuklukta Hormonların Rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Psychiatry Special Topics*, 7(3), 36-41.

Uemura T, Green M, & Warsh JJ. (2016). CACNA1C SNP rs1006737 associates with bipolar I disorder independent of the Bcl-2 SNP rs956572 variant and its associated effect on intracellular calcium homeostasis. *World J Biol Psychiatry*, 17(7), 525-534. doi:10.3109/15622975.2015.1019360

- Vadodaria KC, Stern S, Marchetto MC, & Gage FH. (2018). Serotonin in psychiatry: in vitro disease modeling using patient-derived neurons. *Cell Tissue Res*, 371(1), 161-170, doi:10.1007/s00441-017-2670-4
- Valvezan AJ, & Klein PS. (2012). GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci*, 5, 1. doi:10.3389/fnmol.2012.00001
- Vandeleur C, Rothen S, Gholam-Rezaee M, Castelao E, Vidal S, Favre S, Ferrero F, Halfon O, Fumeaux P, Merikangas KR, Aubry JM, Burstein M, & Preisig M. (2012). Mental disorders in offspring of parents with bipolar and major depressive disorders. *Bipolar Disord*, 14(6), 641-653. doi:10.1111/j.1399-5618.2012.01048.x
- Viswanath B, Jose SP, Squassina A, Thirthalli J, Purushottam M, Mukherjee O, Vladimirov V, Patrinos GP, Del Zompo M, & Jain S. (2015). Cellular models to study bipolar disorder: A systematic review. *J Affect Disord*, 184, 36-50, doi:10.1016/j.jad.2015.05.037
- Walker RM, Rybka J, Anderson SM, Torrance HS, Boxall R, Sussmann JE, Porteous DJ, McIntosh AM, & Evans KL. (2015). Preliminary investigation of miRNA expression in individuals at high familial risk of bipolar disorder. *J Psychiatr Res*, 62, 48-55. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.01.006
- Wang JL, Shamah SM, Sun AX, Waldman ID, Haggarty SJ, & Perlis RH. (2014). Label-free, live optical imaging of reprogrammed bipolar disorder patient-derived cells reveals a functional correlate of lithium responsiveness. *Transl Psychiatry*, 4, e428. doi:10.1038/tp.2014.72
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, & Rossi DJ. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5), 618-630, doi:10.1016/j.stem.2010.08.012
- Warren L, Ni Y, Wang J, & Guo X. (2012). Feeder-Free Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells with Messenger RNA. *Scientific Reports*, 2, 657. doi:10.1038/srep00657.
- Watson S, Gallagher P, Ritchie JC, Ferrier IN, & Young AH. (2004). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry*, 184, 496-502.
- Wobus AM. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*, 22(3), 149-164.
- Xu Q, Guo L, Moore H, Waclaw RR, Campbell K, & Anderson SA. (2010). Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron*, 65(3), 328-340, doi:10.1016/j.neuron.2010.01.004
- Yan Y, Shin S, Jha BS, Liu Q, Sheng J, Li F, Zhan M, Davis J, Bharti K, Zeng X, Rao M, Malik N, & Vemuri MC. (2013). Efficient and Rapid Derivation of Primitive Neural Stem Cells and Generation

of Brain Subtype Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(11), 862-870, doi:10.5966/sctm.2013-0080

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, & Thomson JA. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928), 797-801. doi:10.1126/science.1172482

Zhao C, Sun G, Li S, Lang MF, Yang S, Li W, & Shi Y. (2010). MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 1876-1881. doi:10.1073/pnas.0908750107

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, & Ding S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4(5), 381-384. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005

Zhou R, Yuan P, Wang Y, Hunsberger JG, Elkahoul A, Wei Y, Damschroder-Williams P, Du J, Chen G, & Manji HK. (2009). Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1395-1405. doi:10.1038/npp.2008.131

Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, Bao X, Tse HF, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Pei D, & Esteban MA. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*, 7(12), 2080-2089. doi:10.1038/nprot.2012.115

Zhu Y, Kalbfleisch T, Brennan MD, & Li Y. (2009). A MicroRNA gene is hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. *Schizophr Res*, 109(1-3), 86-89. doi:10.1016/j.schres.2009.01.022

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı



Partners Human Research Committee
399 Revolution Drive, Suite 710
Somerville, MA 02145
Tel: (857) 282-1900
Fax: (857) 282-5693

Continuing Review: Notification of IRB Approval/Activation Protocol #: 2009P000238/PHS

Date: January 18, 2017

To: Roy Howard Perlis, MD
MGH
Psychiatry

From: Partners Human Research Committee
399 Revolution Drive, Suite 710
Somerville, MA 02145

Title of Protocol: The Use of Human Skin Cells and Blood Derived Cells in the Creation of Cellular Models of Neuropsychiatric Disorders

Version/Number: Version 2.0

Version Date: 1/10/2017

IRB Continuing Review #: 8

IRB Review Type: Full

IRB Approval Date: 12/29/2016

Approval Activation Date: 1/18/2017

IRB Expiration Date: 1/24/2018

This project has been reviewed by PHS IRB . During the review of this project, the IRB specifically considered (i) the risks and anticipated benefits, if any, to subjects; (ii) the selection of subjects; (iii) the procedures for obtaining and documenting informed consent; (iv) the safety of subjects; and (v) the privacy of subjects and confidentiality of the data.

Please note that if an IRB member had a conflict of interest with regard to the review of this project, consistent with IRB policies and procedures, the member was required to leave the room during the discussion and vote on this project except to provide information requested by the IRB.

Please note: Your consent form has been updated to reflect the IRB's new telephone number. When you plan to submit an amendment with changes to the consent form, download the consent form from the attachments page to ensure you have the up-to-date version with the correct telephone number.

The following protocol documents have been approved and supporting documents noted by the IRB:

Protocol summary (v. 01/10/2017)

Detailed protocol (v. 01/10/2017)

Tissue repository summary (v. 04/21/2016)

Consent form

Advertisements (4)

Flyer

Recruitment letters (10)

Telephone scripts (3)
Instruments/questionnaires (29)
DV Biologics Spanish consent form
DV Biologics English consent form
Siena consent form
Translated consent form
Boston Children's Hospital consent form
Informed consent survey
Care of Skin Biopsy Site Handout
Check request form
Minor deviation log

As Principal Investigator, you are responsible for ensuring that this project is conducted in compliance with all applicable federal, state and local laws and regulations, institutional policies, and requirements of the IRB, which include, but are not limited to, the following:

1. Submission of any and all proposed changes to this project (e.g., protocol, recruitment materials, consent form, status of the study, etc.) to the IRB for review and approval prior to initiation of the change(s), except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to the subject(s). Changes made to eliminate apparent immediate hazards to subjects must be reported to the IRB as an unanticipated problem.
2. Submission of continuing review submissions for re-approval of the project prior to expiration of IRB approval and a final continuing review submission when the project has been completed.
3. Submission of any and all unanticipated problems, including adverse event(s) in accordance with the IRB's policy on reporting unanticipated problems including adverse events.
4. Obtaining informed consent from subjects or their legally authorized representative prior to initiation of research procedures when and as required by the IRB and, when applicable, documenting informed consent using the current IRB approved consent form(s) with the IRB-approval stamp in the document footer.
5. Informing all investigators and study staff listed on the project of changes and unanticipated problems, including adverse events, involving risks to subjects or others.
6. When investigator financial disclosure forms are required, updating your financial interests in Insight and for informing all site responsible investigators, co-investigators and any other members of the study staff identified by you as being responsible for the design, conduct, or reporting of this research study of their obligation to update their financial interest disclosures in Insight if (a) they have acquired new financial interests related to the study and/or (b) any of their previously reported financial interests related to the study have changed.

The IRB has the authority to terminate projects that are not in compliance with these requirements.

Questions related to this project may be directed to Ednice Monteiro, EEMONTEIRO@PARTNERS.ORG, 857-282-1916.

CC: Leslie A. Snapper, MGH - Center for Genomic Medicine, Research Coordinator/Manager
Kamber Loren Hart, MGH - Center for Genomic Medicine, Research Coordinator/Manager

8.2. Hasta Onam Formu

Partners HealthCare System Research Consent Form

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

Protocol Title: The Use of Human Skin and Blood Derived Cells in the Creation of Cellular Models of Neuropsychiatric Disorders

Principal Investigator: Roy Perlis, MD, MSc

Site Principal Investigator: Stephen J. Haggarty, PhD

Description of Subject Population: Adults that may have previously been seen in the Emergency Room or hospitalized and have had at least one diagnosis relating to neuropsychiatric or cognitive symptoms; adults with bipolar disorder, major depression, Velocardiofacial syndrome or a related neurodevelopmental disorder, and volunteers without any of these disorders.

Collection of Samples and Health Information for Research

About this consent form

Please read this form carefully. It tells you important information about the collection and storage of tissue samples for research. A member of our research team will also talk to you about taking part in this research study. People who agree to take part in research studies are called "subjects." This term will be used throughout this consent form.

Partners HealthCare System is made up of Partners hospitals, health care providers, and researchers. In the rest of this consent form, we refer to the Partners system simply as "Partners."

If you have any questions about the research or about this form, please ask us. Taking part in this research study is up to you. If you decide to take part in this research study, you must sign this form to give your permission. We will give you a signed copy of this form to keep.

What is this research about?

There are many types of mental illness. We hope that our research will help us find what causes depression, bipolar disorder, and other mental illness. We hope that a better understanding of the causes of these and other diseases, including Velocardiofacial syndrome (VCFS) and related neurodevelopmental disorders, will lead to better treatments.

Partners HealthCare System Research Consent Form

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

We also want to understand the genetics of how such disorders may be passed on in families. Genetics is the study of the way physical traits and characteristics get passed down from one generation to the next. It includes the study of genes. Genes are the parts of each living cell that contain the instructions that tell our bodies how to grow and work. Genes determine characteristics such as hair and eye color. Genes are inherited (that is, passed from parent to child). DNA is the material that makes up your genes. Genes may also mean that you are likely or unlikely to have certain illnesses.

In our research, we will compare the genes of subjects with Velocardiofacial syndrome and related neurodevelopmental disorders, subjects with neuropsychiatric disorders, including bipolar disorder and depression, and subjects without any of these disorders.

What is the purpose of this research tissue bank?

Research tissue banks collect and store many types of samples, such as blood, urine or other bodily material. The purpose of this research tissue bank is to collect, process, and store samples until researchers need them to do research.

Tissue samples in this bank will be used mainly for research on neuropsychiatric disorders. To do this study, we will collect skin, urine and blood samples. We hope that by comparing samples from healthy volunteers to adults with Velocardiofacial syndrome or related neurodevelopmental disorders and to samples from volunteers with a mental illness that may have necessitated hospitalization or a trip to the Emergency Room, we will come to a better understanding of the causes of these and other diseases which will lead to better treatments.

The National Institutes of Health (NIH) is paying to have your samples processed and stored in this tissue bank.

Our research tissue bank is located at Massachusetts General Hospital. There is no set limit to the number of individuals who provide samples to this bank. The more samples and health information that we can collect, the more useful the tissue bank will be for research.

Tissue banks have rules about which researchers can get samples and what kind of research they can do using the samples. Researchers can use samples and information from this bank to study medical questions related to mood disorders and other unrelated diseases. For example, they may study what causes and what helps prevent, treat, or cure a disease, and how it may be passed on in families.

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

In the future, we will also do other research that may not be related to these medical conditions, but may lead to better treatments for these and other diseases.

We are asking you to take part in this study because you may have previously been seen in the Emergency Room or hospitalized and have had at least one diagnosis relating to neuropsychiatric or cognitive symptoms, or because you have Velocardiofacial syndrome or a related neurodevelopmental disorder, or because you do not have one of these disorders.

We hope to enroll 810 subjects at Massachusetts General Hospital.

What will I have to do to give samples to the tissue bank?

This study involves one study visit, with the option to split over two visits within one week of each other, which will last approximately three to four hours.

We are asking you to allow us to take small samples of your skin, urine and blood for our research, and to store your samples in a research tissue bank. If you agree, we will prepare the samples and place them in the bank. We will use some of your blood cells to create a living tissue sample (called a "cell line") that can be grown in the laboratory. This allows researchers to have a continuing supply of your cells in the future, without asking for more samples from you.

We also plan to use the cells taken from your skin, urine and blood to create a type of cell known as a pluripotent cell. This type of cell can be used to grow different types of tissue, including fat, muscle and nerve cells. However, this type of cell will not be used for cloning or to create another living being.

Blood Sample

We will collect a blood sample by placing a needle into a vein in your arm and drawing 32 ml (approximately 6.5 teaspoons) of blood. The procedure is the same one that is used to collect blood for routine laboratory tests. It will take about 2 minutes to collect a sample of your blood.

Urine Sample

We will collect a urine sample from a small group of patients. We will use the cells from your urine to develop new techniques for creating pluripotent cells.

Skin Biopsy

We will do a "punch" biopsy when you come to the clinic (If you are already in the hospital and it is more convenient for you, we can do this biopsy before you leave the hospital). First, we will clean your skin on your arm or your hip with alcohol. Then we will apply EMLA cream, a local anesthetic (numbing medication), before using a small needle to inject Lidocaine (also a local

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

**Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010**

Subject Identification

anesthetic) into your skin to numb the area. Some people think the Lidocaine shot feels like a bee sting, but you should feel very little since the EMLA cream will already have taken effect. The Lidocaine shot makes your skin numb right away.

Using a special tool designed for this purpose, we will take a small piece of skin, about the size of the tip of a ballpoint pen. You may have a small scar from the biopsy. This biopsy procedure will take up to 10 minutes.

After the punch biopsy, we will give you information about how to care for the area where the biopsy was done. The chance of getting an infection is very small, but we will tell you what to watch for, and how to reach us if you think you need to. Please tell the study doctor if you are taking any of the following: warfarin (Coumadin), dabigatran (Pradaxa), clopidogrel (Plavix), aspirin (every day), or another medication that may affect how your blood clots. Individuals who are taking aspirin and have an increased risk for cardiovascular or cerebrovascular events (such as history of cerebrovascular disease, cardiac surgery, unstable angina, coronary stenting, etc.) are not eligible to participate in the study. Individuals who are taking aspirin and are not at increased risk for cardiovascular or cerebrovascular events, have self-elected to take aspirin, or are taking aspirin for pain relief will be asked to refrain from taking aspirin 7-10 days before the visit in order to decrease risk of bleeding post-biopsy.

We may ask you to return for an additional optional biopsy.

Medical Information

We will collect information from you and from your medical record. The information will include a brief medical history, information about which medications you are taking, and questions about your mental health. This will take about one hour.

For adults with a neuropsychiatric diagnosis: This information will also include when you were first diagnosed with your mental illness. The study doctor will also ask you about symptoms you might be having or have had in the past. We will also collect information about which medications have been used to treat your illness, whether they had side effects, and whether they were helpful for you.

We will ask you to fill out some questionnaires (forms). If there are questions that make you feel uncomfortable, you may skip them.

For adults with a neuropsychiatric diagnosis:

- One demographic questionnaire
- Two questionnaires about your current and past physical health, including questions about alcohol or drug abuse or dependence.
- Three questionnaires about past experiences, like being in the hospital and whether anyone else in your family has had mental illness or other health conditions.

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

**Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010**

Subject Identification

- Three questionnaires about ways your doctor may have treated your disorder in the past, whether they were helpful, and whether you had any treatment side effects.
 - Five questionnaires about your personality
 - Six questionnaires about your mood and how you have been feeling over the past week or month
 - One questionnaire about past and current substance use
- Questionnaire time: about 70 minutes

For adults with VCFS or related neurodevelopmental disorders:

- One demographic questionnaire
- Questionnaire time: about 5 minutes

For adults without these disorders:

- One demographic questionnaire
 - Six questionnaires about your personality
 - Three questionnaires about past experiences, like being in the hospital and whether anyone else in your family has had mental illness or other health conditions.
- Questionnaire time: about 30 minutes

For all subjects we will also ask you to take a short series of tests to measure things like memory and attention. These tests will be administered on a computer tablet. We will explain all instructions before you start, and we can also repeat the instructions as much as you would like. Testing time will take about 1 hour. An additional IQ test will take about another 15 minutes while another test that measures impulsivity will take about 20 minutes.

We would also like your permission for the tissue bank staff to contact you at any point in the future. This could be at a medical visit or by phone to get updated information about your medical condition or health status.

If we have trouble getting the cells from your skin or blood to grow, we may re-contact you at any point in the future and ask if you are willing to provide another skin or blood sample.

If we think you need help

The questionnaires and interviews may suggest you might be thinking about suicide or harming yourself in other ways. If so, the study doctor will help you get care so you can stay safe. You may have to see another doctor for care that is not part of this study.

How are my samples stored?

Partners HealthCare System Research Consent Form

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

Staff at the tissue bank will assign a number to your samples and health information. This number will connect your sample and health information stored in a computer database. A database is a collection of related information. The computer database is protected with a password. Only staff at the research tissue bank will know the password.

Which researchers can use my samples and what information about me can they have?

In the future, someone might want to do research on a different, unrelated topic. Bank staff would only allow this if your samples were stripped of all information linking the samples to you. It would not be possible for this unrelated research to be linked back to you by anyone. Bank Staff would de-identify all numbers and codes connecting the sample to you before giving the sample to a researcher for unrelated research.

Occasionally, we will make samples available to researchers at other academic institutions that are not a part of Partners. Often these are other scientists affiliated with Harvard University, who are working with researchers at MGH and Brigham and Women's Hospital (BWH). However, we will not give researchers at other academic institutions your name or other information that could likely identify you.

Occasionally, we may share your samples, without your name or other information that could identify you, with for-profit companies. These companies may be working with MGH, BWH or other Partners researchers on a specific research project. Researchers at for-profit companies will never have your name or other information that could likely identify you.

For what type of research will my samples be used?

We will use your samples and information to answer many kinds of research questions. The long-term goals of the research are to better understand, prevent, diagnose, and treat various mental illnesses. This research may also inform our understanding of Velocardiofacial syndrome and related neurodevelopmental disorders including the mood symptoms that some people have. It is not possible to list every research project. Also, we cannot predict all of the research questions that will be important over the next years. As we learn more, there are new research questions and new types of research related to different mental illnesses that may be done.

We may also perform a whole genome analysis on your DNA sample. Usually researchers study just a few areas of your genetic code that are linked to a disease or condition. In whole genome studies, all or most of your genes are analyzed and used by researchers to study links to many diseases or conditions.

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

In order to allow researchers to share test results, the National Institutes of Health (NIH) and other central repositories have developed special data (information) banks that analyze data and collect the results of whole genome studies. These banks may also analyze and store DNA samples, as well. These central banks will store your genetic information and samples and give them to other researchers to do more studies. We do not think that there will be further risks to your privacy and confidentiality by sharing your samples and whole genome information with these banks. However, we cannot predict how genetic information will be used in the future. The samples and data will be sent with only your code number attached. Your name or other directly identifiable information will not be given to central banks. There are many safeguards in place to protect your information and samples while they are stored in repositories and used for research.

Research using your samples and whole genome information is important for the study of virtually all diseases and conditions. Therefore, the sample/data banks will provide study data for researchers working on any disease.

How long will my samples and information be kept?

There is no scheduled date on which your samples and information in the bank will be destroyed. Your sample will be used to create a living tissue sample, which may be stored and used for research indefinitely.

Can I stop allowing my samples and information to be stored and used for research?

Yes. You have a right to withdraw your permission. If you do, your samples and your information will be destroyed. However, it will not be possible to destroy samples that have been given to other researchers. If you decide to withdraw your permission, you should contact the tissue bank's staff in writing. Please contact Roy Perlis, MD at 185 Cambridge Street, 6th Floor, Boston, MA 02114.

Will I get results of research done using my samples?

No. The research we are doing is only a stepping stone in understanding mood disorders. Therefore, information from this research will not be returned to you or your doctor. Tests done for research using your samples will not be useful in directing your medical treatment. This information will not be placed in your medical records.

What are the risks to me?

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

**Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010**

Subject Identification

The main risk of allowing us to store and use your samples and certain limited health information for research is a potential loss of privacy. We will protect your privacy by labeling your samples and information only with a code, and keeping the key to the code in a password protected database.

Genetic information that results from this study does not have medical or treatment importance at this time. However, there is a risk that information about taking part in a genetic study may influence insurance companies and/or employers regarding your health. To further safeguard your privacy, genetic information obtained in this study will not be placed in your medical record.

Taking part in a genetic study may also have a negative impact on family or other relationships. If you do not share information about taking part in this study, you will reduce this risk.

Risk of having a Skin Biopsy (Skin Sample)

If Lidocaine is used during a skin biopsy, there may be discomfort when the local anesthetic is injected with the needle. The procedure carries a small risk of infection, which can be treated with antibiotics. Other risks of the biopsy could be an allergic reaction to the local anesthetic. Symptoms of an allergic reaction are: rash, difficulty breathing, lightheadedness, nausea, and vomiting. If you have an allergic reaction, we will treat it right away.

Biopsy wounds usually heal with a small scar, but sometimes a raised scar or lump may result. There is also a small chance that this biopsy may result in a wound that does not heal, or that heals very slowly over time. Possible rare side effects include bleeding, nerve damage, and darkening or lightening of the skin in that area.

Please tell the study doctor or study staff right away if you have any of these side effects. Please tell them if you have any other health problems during the study.

Risk of Blood Draw

Drawing blood may cause some discomfort and cause you to develop a bruise. Very rarely, the vein from which we take the blood may become inflamed or infected, which can be treated. Please tell the study doctor or study staff right away if you have pain, redness or swelling at the place where the blood was drawn.

Risks of Providing Medical Information

Some people find answering some questions from a study doctor, or on a questionnaire, upsetting. Answering some questions may make you feel uncomfortable. If you find questions too upsetting to answer, you may skip them. Please tell the study doctor or study staff if you find questions upsetting.

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

If I take part in this research tissue bank, how will you protect my privacy?

During this research, identifiable information about your health will be collected with your samples and from your medical records or other updates and will be stored, used, and shared with researchers as explained above. In the rest of this section, we refer to this information simply as “health information.”

Certificate of Confidentiality for Health Information and Other Identifying Information from the Research

In this research study, we have obtained a Certificate of Confidentiality from the Department of Health and Human Services (DHHS). By granting the Certificate, DHHS is not approving the research itself, but is helping us strengthen the privacy protections for your health information and other identifying information from the research. With the Certificate, we cannot be forced (for example by court order or subpoena) to disclose your health information or other identifying information from the research in any Federal, State or local civil, criminal, administrative, legislative, or other proceedings. (Note that information that is not from the research, such as existing hospital or office health records, is protected by general privacy law but does not receive the Certificate’s stronger protection. The Certificate also does not prevent you or a member of your family from voluntarily releasing any information about yourself or your involvement in this research study.)

Why Health Information and Other Identifying Information from the Research Might Be Used or Shared, and By/With Whom

Even with these privacy protections, your health information and other identifying information from the research may still be used within Partners by the researchers and the staff involved in this research study, by the Partners ethics board that oversees the research, and by other staff within Partners who need the information to do their jobs (such as for treatment, payment (billing), or health care operations such as overseeing the quality of care or research). Your information may also be shared by these groups with others outside of Partners for certain purposes as follows.

We may share your information with:

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

- The sponsor(s) of the research study, and people or groups it hires to help perform this research study
- A group that oversees the data (study information) and safety of this research
- People or groups that we hire to do certain work for us related to the research, such as data storage companies, our insurers, or our lawyers
- Federal and state agencies (such as DHHS and agencies within DHHS like the Food and Drug Administration, the National Institutes of Health, and the Office for Human Research Protections), with other U.S. or foreign government bodies, and with organizations that provide independent accreditation and oversight of hospitals and research. For example, disclosure may be necessary upon request of DHHS for an audit, program evaluation, or investigation. Disclosure may also be necessary if required by the federal Food, Drug, and Cosmetic Act or its regulations.
- A public health or public safety authority, or with specific individuals who may be at risk of harm, if we learn information that could mean harm to you or others. When state mandatory reporting statutes would require us to disclose information, including about child or elder abuse, we will voluntarily disclose that information.

In order to minimize disclosures for treatment, payment, or health care operations purposes, information from this research study will not be placed in your medical record.

Some people or groups outside Partners who get your health information or other identifying information from the research might not have to follow the same privacy rules that we follow. We share your information only when we must, and we ask anyone who receives it from us to protect your privacy. However, once your information is shared outside Partners, we cannot promise that it will remain private.

Because research is an ongoing process, we cannot give you an exact date when we will either destroy or stop using or sharing your health information. The protections of the Certificate of Confidentiality and other Partners privacy protections will continue to apply to your health information and other identifying information from the research for as long as our researchers keep the information.

What are the benefits to me?

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

You will not directly benefit from research conducted on your samples stored in the research tissue bank. We hope that research using the samples and information will help us understand, prevent, treat, or cure the illnesses and conditions studied.

What are the costs to me to take part in the research tissue bank?

Study funds will pay for the skin sample and for storing your blood and skin samples in the research tissue bank.

There is no cost to you to have your samples in the bank or for the research using your samples. Costs for any ongoing or routine medical care you would receive apart from this study will be billed to you or to your insurance company in the usual way. You will be responsible for any deductibles or co-payments required by your insurer.

Will I be paid for my samples?

Yes, we will pay you \$150 for taking part in this study. If you decide to split the study over two visits, you will be paid \$75 upon completion of each visit. We may contact you to provide a second skin biopsy in which case we will pay you an additional \$100. We may also contact you for a second blood sample in which case we will pay you an additional \$50. Reimbursement for reasonable parking and travel expenses is available if you provide appropriate receipts.

We may use your samples and information to develop a new product or medical test to be sold. The hospital and researchers may benefit, if this happens. There are no plans to pay you if your samples are used for this purpose.

Can I still get medical care within Partners if I don't take part in this research tissue bank or if I stop taking part?

Yes. Participation in this study is voluntary, and your decision won't change the medical care you get within Partners now or in the future. There will be no penalty, and you won't lose any benefits you receive now, or have a right to receive.

Taking part in the bank is up to you. You can decide not to allow your samples and information to be placed in the bank.

What happens if I am injured as a result of taking part in this research study?

Partners HealthCare System Research Consent Form

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

We will offer you the care needed to treat any injury that directly results from taking part in this research study. We reserve the right to bill your insurance company or other third parties, if appropriate, for the care you get for the injury. We will try to have these costs paid for, but you may be responsible for some of them. For example, if the care is billed to your insurer, you will be responsible for payment of any deductibles and co-payments required by your insurer.

Injuries sometimes happen in research even when no one is at fault. There are no plans to pay you or give you other compensation for an injury, should one occur. However, you are not giving up any of your legal rights by signing this form.

If you think you have been injured or have experienced a medical problem as a result of taking part in this research study, tell the person in charge of this study as soon as possible. The researcher's name and phone number are listed in the next section of this consent form.

Whom do I call to answer questions about the research tissue bank?

You may ask more questions about the tissue bank at any time. The tissue bank staff are available to answer your questions or concerns.

The person in charge of interviewing patients for the study and supervising skin and blood collection is Roy Perlis, MD. You can call him at (617) 726-7426 Monday through Friday from 9 a.m. – 5 p.m. You can page Dr. Perlis at any time, 24 hours a day, 7 days a week, through the MGH page operator, 617-726-2241. You can also call the Research Coordinator at (617) 643-3105 Monday-Friday 9a.m.-5p.m. with questions about this research study.

Whom do I call if I have concerns about my rights as a research subject?

If you want to speak with someone **not** directly involved in the tissue bank project, please contact the ethics board office (Partners Human Research Committee). You can call them at 857-282-1900.

You can talk to them about:

- Your rights as a research subject
- Your concerns about the research tissue bank
- A complaint about the research

Also, if you feel pressured to take part in the research tissue bank, or to continue with it, they want to know and can help.

**Partners HealthCare System
Research Consent Form**

Research Tissue Bank with Certificate of Confidentiality
Version Date: April 2010

Subject Identification

**Informed Consent and Authorization for Collection of Samples and
Health Information for Research**

Statement of Study Doctor or Person Obtaining Consent

- I have explained the research to the study subject.
- I have answered all questions about this research study to the best of my ability.

Study Doctor or Person Obtaining Consent

Date/Time

PERMISSION TO CONTACT YOU AGAIN

The study doctors may wish to contact you again in the future about related research studies.
Indicate below if we may contact you in the future:

Please place your initials on the line next to your choice

____ YES, it's OK to contact me.
Initial

____ NO, don't contact me again.
Initial

PERMISSION TO OBTAIN RECORDS FROM OTHER RESEARCH STUDY

If you were recruited through another research study (either with us or one of our collaborators),
we may wish to obtain some of your diagnostic information and/or medical history from those
records. Indicate below if we may obtain records from prior research studies in which you
participated:

Please place your initials on the line next to your choice

____ YES, it's OK to obtain this information.
Initial

____ NO, don't obtain this information.
Initial

Statement of Person Giving Informed Consent and Authorization

- I have read this consent form.

Subject Identification

Subject Identification

- Signature of Subject:**

Subject

Date/Time

Consent Form Version: 10.21.2016

8.3. Özgeçmiş

TC Kimlik No / Pasaport No:	37798647742
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi:	DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler AD. İnciraltı, 35340 İzmir/Türkiye
Telefon:	541-2032412
e-posta:	begumalural@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Doktora	Devam ediyor
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	SİNİRBİLİM	Yüksek Lisans	2012
Türkiye	İstanbul Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Harvard Medical School	ABD	Boston	Chemical Neurobiology Lab (Haggarty Lab)	Araştırma Görevlisi	2016-2017

UZMANLIK ALANLARI

Sinirbilimler, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Nörobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre, İndüklenmiş Nöronlar, Nöropsikiyatrik Hastalıklar

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Lalonde J, Reis SA, Holland CS, Wesseling H, Sauld J, **Alural B**, Zhao WN, Haggarty SJ. Chemogenomic Analysis Reveals Key Role for Lysine Acetylation in Regulating Arc Stability. Nat Commun. 2017 Nov 21;8(1):1659. doi: 10.1038/s41467-017-01750-7.

Alural B, Genc S, Haggarty SJ. Diagnostic and therapeutic potential of microRNAs in neuropsychiatric disorders: Past, present, and future. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2017 Feb 6;73:87-103. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.03.010.

Alural B, Ozerdem A, Genc K, Genc S. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by Nrf2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. Front. Cell. Neurosci. 2015 May 9:209. doi: 10.3389/fncel.2015.00209.

Alural B, Duran GA, Tufekci KU, Allmer J, Onkal Z, Tunali D, Genc K, Genc S. EPO Mediates Neurotrophic, Neuroprotective, Anti-Oxidant, and Anti-Apoptotic Effects via Downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y Neuron-Like Cells. Front Immunol. 2014 Sep 30;5:475. doi: 10.3389/fimmu.2014.00475.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Alural B, Ayyildiz ZO, Tufekci KU, Genc S, Genc K. Erythropoietin Promotes Glioblastoma via miR-451 Suppression. Vitam Horm. 2017;105:249-271. Epub 2017 Apr 19. doi: 10.1016/bs.vh.2017.03.002.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Alural B, Genç S. Antioxidant effect of Lithium is regulated by microRNA-34a in SH-SY5Y cells. The FEBS Journal. 282():219, JUL 2015

8.4. Tezden Yapılan Yayınlar

1. Alural B, Genc S, Haggarty SJ. Diagnostic and therapeutic potential of microRNAs in neuropsychiatric disorders: Past, present, and future. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Feb 6;73:87-103. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.03.010.
2. Alural B, Ozerdem A, Genc K, Genc S. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by Nrf2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. *Front. Cell. Neurosci*. 2015 May 9:209. doi: 10.3389/fncel.2015.00209.

