

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KREMEN1 GENİNİN ŞİZOFRENİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DUA ÖZSOYLU

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2009970164

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KREMEN1 GENİNİN ŞİZOFRENİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DUA ÖZSOYLU

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Eresen YAZICIOĞLU

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970164

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programı öğrencisi Dua ÖZSOYLU '**KREMENİ**
Geninin Şizofreni İle İlişkisinin Araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 13.03.2013
tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Yrd.Doç.Dr.Çiğdem Eresen YAZICIOĞLU
(DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ve Genetik AD.)

BAŞKAN



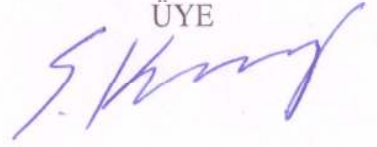
Prof.Dr.Köksal ALPTEKİN

ÜYE



Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ

ÜYE



Doç.Dr.Zeynep SERCAN

YEDEK ÜYE

Prof.Dr.Berna Binnur AKDEDE

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Araştırmanın Tipi	32
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	32
3.3. Araştırmanın Evreni Ve Örnekleme/Çalışma Grupları	32
3.4. Çalışma Materyali	32
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	33
3.6. Veri Toplama Araçları	33
3.7. Araştırma Planı Ve Takvimi	47
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	47
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	49
3.10. Etik Kurul Onayı	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Modern şizofreni kavramının gelişimindeki bazı dönüm noktaları.	7
Tablo 2: Şizofreni için DSM-IV tanı ölçütleri.....	9
Tablo 3: Esas şizofreni belirtileri ve ayrıntıları	11
Tablo 4: Şizofrenide bazı aday genler hakkında bilgiler ve bunların şizofreni ile olan ilişkileri	20
Tablo 5: KREMEN1 geninin transkriptleri ve özellikleri.	28
Tablo 6: KREMEN Protein 1 aminoasit sekansı ve domainleri.	29
Tablo 7: Araştırmamızda kullanılan makine – teçhizat listesi.....	34
Tablo 8: Kullanılan sarf malzemeler ve diğer tüm gereçler.	35
Tablo 9: KREMEN1 geninde çalışılan gen dizisi ve SNP’ ler.	39
Tablo 10: Dizayn edilen ileri ve geri primerler ve genimiz üzerindeki yerleri.	40
Tablo 11: Liyofilize halde gelen primerlerin ana stok ve son kullanım için de ara stok olacak şekilde sulandırılması.	41
Tablo 12: KREMEN1 geninin ilgili bölgesinin PCR optimizasyonu için kurulan reaksiyonun bileşenleri ve konsantrasyonları.	43
Tablo 13: KREMEN1 geninin ilgili bölgesinin PCR optimizasyonu için reaksiyonun gradient termal profili.	43
Tablo 14: KREMEN1 geninin ilgili bölgesi için MgCl ₂ ve “Annealing” sıcaklığının gradient ayrıntıları.	44
Tablo 15: PCR optimizasyonu için kurulan reaksiyondan elde edilen PCR ürünlerinin jele yüklenme sırası.	44
Tablo 16: KREMEN1 geni ilgili bölgesini DNA dizi analizine hazır hale getirmek için tüm örneklerle uygulanan PCR işleminin reaksiyon içeriği.	45
Tablo 17: KREMEN1 geni ilgili bölgesini DNA dizi analizine hazır hale getirmek için tüm örneklerle uygulanan PCR’ ın termal profili.	46

TABLolar DİZİNİ (Devam)

Sayfa No

Tablo 18: Araştırmamızın tarihleri ile birlikte akış grafiğı.	47
Tablo 19: İlgili polimorfizmler açısından hasta ve kontrol grubundaki bireylerin genotipleri.	61
Tablo 20: KREMEN1 geninde rs713526 G>A polimorfizmi açısından hasta, kontrol ve toplam (hasta+kontrol)' a göre genotip dağılımları ve allel frekansları.	62
Tablo 21: Popölasyonların rs713526 G>A polimorfizmi açısından genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliğı değerlendirmesi.	62
Tablo 22: KREMEN1 geninde rs713526 G>A polimorfizmi açısından hasta ve kontrol gruplarının birbiriyle karşılaştırılmasının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.	63
Tablo 23: rs713526 G>A polimorfizmi için sağlıklı kontrol ve şizofreni hasta bireylerde saptadığımız allel frekanslarının dünya çapındaki sağlıklı popölasyonlardakiler ile kıyaslanması.	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Cinsiyete göre şizofreninin başlangıç yaşı	8
Şekil 2: Normal beyinde (a) ve şizofreni hastası beyinde (b) nörogelişimsel model	16
Şekil 3: Çocukluk çağı başlangıçlı şizofrenide sağlıklı kontrollere kıyasla nörogelişimsel süreçte Gri Madde kaybı.....	17
Şekil 4: Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması.....	22
Şekil 5: Genel (A) ve yeni (B) Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması modelleri	24
Şekil 6: Yeni Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması modeli ile Wnt hedef genlerinin ekspresyonları.....	25
Şekil 7: LRP' nin KREMEN Protein 1 aracılıklı bifazik etkisi ile Wnt/ β -katenin sinyalinin regülasyonu.....	30
Şekil 8: DKK ve KREMEN protein 1' in Wnt/ β -katenin sinyal yolağına olan etkileri.....	31
Şekil 9: PCR optimizasyon deneyleri sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	51
Şekil 10: PCR ürünlerinin DNA dizi analizine gönderilmeden önce agaroz jelde yürütülüp görüntülenmesi.	52
Şekil 11: Örnek 81, G>A (heterozigot) değişimi.....	54
Şekil 12: Örnek 6, G>A (heterozigot) değişimi.....	55
Şekil 13: Örnek 19, G>A (heterozigot) değişimi.....	56
Şekil 14: Örnek 102, G>A (heterozigot) değişimi.....	57
Şekil 15: Örnek 141, G>A (heterozigot) değişimi.....	58
Şekil 16: Örnek 124, G>A (heterozigot) değişimi.....	59
Şekil 17: Örnek 114, G>A (heterozigot) değişimi.....	60

KISALTMALAR

SNP	Single nucleotide polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
bp	Base pair (Nükleotid çifti)
PCR.....	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
aa.....	Amino asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı faz kromatografi
TBE-Buffer.....	Tris-Borik asit EDTA tamponu
TE-Buffer.....	Tris-EDTA tamponu
dNTP.....	Deoksiribonukleotid trifosfat
SPECT	Single photon emission computed tomography
PET	Positron emission tomography
OMIM.....	Online Mendelian Inheritance in Man
JSPN	Japon Psikiyatri ve Nöroloji Meclisi
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
ICD-10	Tenth Revision of the International Classification of Diseases
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV
SFG.....	Superior Frontal Girus
LTC.....	Lateral Temporal Korteks
SPL	Superior Parietal Lobüller
DISC1	Disrupted in Schizophrenia 1
NRG1.....	Neuregulin 1
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
sFRPs.....	secreted Frizzled-related proteins
WIF	Wnt İnhibitör Faktörü
KREMEN	Kringle Containing Transmembrane Protein
β cat	β -katenin
TCF/LEF.....	T-cell factor/Lymphoid enhancing factor

TEŞEKKÜR

Öncelikle beni yüksek lisansa kabul eden ve böylece bana kariyerimde çok güzel bir sayfa açan, birikimlerini hiçbir kısıtlama yapmadan sunan ve hoşgörölü yaklaşımı ile huzurlu bir çalışma ortamı sunan, bu süreç içerisinde kişisel ve bilimsel eğitimimin her karesinde desteği ile var olan değerli danışman Hocam; Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU' na teşekkür ederim.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini biran olsun eksik etmeyen çok değerli Hocalarım; sayın Prof. Dr. Meral SAKIZLI ve Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ' a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım ile ilgili görüş ve önerileri ile beni yönlendiren çok değerli Hocam; sayın Prof. Dr. Köksal ALPTEKİN' e teşekkürü borç bilirim.

Beni hayata en iyi şekilde hazırlayan, sağladıkları olanaklar ve verdikleri eğitim ile bu günlere gelmemi sağlayan, benim için hep en iyiyi dileyen, karşılaştığım her türlü zorluktan çıkmamı öğüt ve fikirleriyle sağlayan canımdan çok sevdiğim ANNEM, BABAM ve ABLAM' a sonsuz teşekkürler.

KREMEN1 GENİNİN ŞİZOFRENİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dua ÖZSOYLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Binası, Tıbbi Biyoloji ve
Genetik ABD, 35340, İnciraltı, İZMİR

ÖZET

Amaç ve hipotez: Şizofreni belirtileri genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden ve dünya nüfusunun yaklaşık %1' ini etkileyen kronik, güçten düşürücü psikotik ve ciddi bir bozukluktur. Genetik çalışmalara göre, şizofreni yaklaşık %80 oranında genetik geçişlidir. Ayrıca, şizofreninin nörogelişimsel bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Wnt sinyal mekanizması bu gelişimsel süreci düzenlemede kritik bir rol oynar. Çalışmamızın amacı Wnt sinyal mekanizmasında bifazik (pozitif ve negatif) yanıt oluşturabilen KREMEN1 geninin şizofreni ile ilişkisini araştırmaktır.

Yöntem: Araştırmamızda, 104 şizofreni olgusu ve kendisinde ya da ailesinde psikiyatrik bir hastalığı bulunmayan 51 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 155 birey ile çalışıldı. KREMEN1 geninde, rs713526, rs116100643 ve rs201088346 SNP bölgelerinin araştırılması için genin ilgili bölgesi PCR ile çoğaltılıp DNA dizi analizi yapıldı ve genotipler belirlendi.

Bulgular: Genetik analizler sonucunda, rs713526 G>A polimorfizmi heterozigot olarak şizofreni olgu grubunda %26, sağlıklı kontrol grubunda ise %12 oranında saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,042$). Polimorfizmin homozigot formu ise saptanmamıştır. Ayrıca çalıştığımız olgu ve kontrol gruplarında rs116100643 ve rs201088346 SNP bölgelerinde varyant formlar hiç bulunmamıştır.

Sonuç: Araştırmanın sonuçları; KREMEN1 genindeki rs713526 G>A polimorfizminin, şizofreni riski ile ilişkili olabileceği ve bu hastalığa yatkınlığa katkıda bulunabileceği yönündedir. Ancak, sonuçlarımız şizofreninin bu lokus ile ilişkisini vurgulamakta fikir verici olsa da, daha büyük bir örneklem grubu ile araştırmaya devam edilmelidir.

Anahtar Sözcükler: Şizofreni, Wnt sinyal yolağı, KREMEN1, SNP

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SCHIZOPHRENIA AND KREMEN1 GENE

Dua ÖZSOYLU

Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Dept. of Medical Biology and Genetics
Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Dept. of Medical Biology and Genetics, 35340,
İnciraltı, İzmir/TURKEY

ABSTRACT

Objective and hypothesis: Schizophrenia is a chronic, debilitating psychotic and a serious disorder that affects about 1 percent of the world's population and has symptoms that generally begin in late adolescence or early adulthood and usually continue throughout life. According to genetic studies, schizophrenia has heritability estimates of around 80%. Furthermore, schizophrenia is thought to be the neurodevelopmental disease. The Wnt signaling pathway plays a critical role in regulating this developmental process. The aim of our study was to examine the association of KREMEN1 to generate a biphasic (positive and negative) response in the wnt signaling pathway with schizophrenia.

Method: Our subjects comprised 155 individuals, with 104 patients with schizophrenia and 51 healthy volunteers with no personal or family history of psychiatric illness. The KREMEN1 gene region in question was cloned by PCR and DNA sequence of this region was analyzed in order to investigate the SNPs, rs713526, rs116100643 and rs201088346 in the aforementioned gene, and then, genotypes were determined.

Results: As a result of genetic analysis, heterozygous rs713526 G>A polymorphism was detected %26 and %12 in patients with schizophrenia and healthy controls respectively. There is a statistically significant difference between the two groups ($p=0,042$). Homozygous form of this polymorphism was not detected. In addition, the SNPs, rs116100643 and rs201088346 were not observed in our case and control subjects.

Conclusion: Results suggest that rs713526 G>A polymorphism in the KEMEN1 might be associated with risk of schizophrenia and contribute to susceptibility to disease. Although our results are suggestive of an association with schizophrenia at this locus, present study should be continued with a larger sample group.

Keywords: Schizophrenia, Wnt pathway, KREMEN1, SNP

1. GİRİŞ VE AMAC

Şizofreni [OMIM 181500] belirtileri genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden ve dünya çapında toplumun yaklaşık %0,5-1' ini etkileyen kronik, güçten düşürücü psikotik ve ciddi bir bozukluktur. Araştırmalar şizofreni hastalarının üçte birinin hayatları boyunca bir veya daha çok kez intihar girişiminde bulunduklarını ve şizofreni hastalarının yaklaşık %5-10' unun intihar sonucunda hayatını kaybettiğini ortaya koymuştur. Şizofreni hastalarında bazı metabolik rahatsızlıklardan (dolaşım, solunum, sindirim hastalıkları gibi) dolayı artmış bir mortalite riski bulunduğundan, normal popülasyon ile kıyaslandığında şizofreni hastalarının umulan yaşam süreleri %20 daha kısadır. Şizofreni hastalığı kişilerde psikoz, apati, sosyal yoksunluk ve bilişsel bozukluk gibi ciddi problemlere neden olduğu için bu hastalığı taşıyan kişiler iş, okul, aile ve tüm sosyal yaşantılarında önemli problemler yaşarlar. Psikiyatrik hastalıklar arasında şizofreni en sakatlık verici hastalık olup, ruh sağlığı servislerinde uzun süre yatışlı tedavileri gerektirebilir. Örneğin, hastanelerdeki psikiyatri servislerindeki tüm yatakların yaklaşık %25' ini şizofreni hastaları doldurmakta ve kliniğe başvuruların %50 sini bu hastalar oluşturmaktadır. Bu denli ciddi ve toplumun bütününe hem ekonomik hem de ruhsal yönde olumsuz etkileyen şizofreni hastalığının bir de yüklü bir tedavi masrafı vardır. Örneğin, şizofreni hastalığının Amerika' daki toplam tedavi maliyetleri ülke genelinde yaklaşık 45 milyar Amerikan Doları (1994 yılı için), Büyük Britanya' daki ise yaklaşık 2.6 milyar sterlin olduğu tahmin edilmektedir. Ekonomik ve sosyal maliyeti bir araya geldiğinde, şizofreni dünyanın en sakatlayıcı on hastalığından biri olması nedeniyle bu hastalık üzerine çalışmayı tercih ettik.

Genetik çalışmalarından edinilen bilgilere göre, şizofreni yaklaşık %80 oranında genetik geçişlidir (bu oran kalça eklemi osteoartritinde yaklaşık %60 iken, hipertansiyon hastalığında ise %30-50 arasındadır). Hastalığın ortaya çıkışı ile ilgili genetik çalışmalardan elde edilen veriler şizofrenide erken beyin gelişiminin etkilendiğini göstermektedir. Şizofreni ile ilişkisi olan yapısal genlerin çoğunun nöronal proliferasyon, göç veya sinaps oluşumu ile ilgili nörogelişimsel genler olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden şizofreninin nörogelişimsel bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Bu bozulmuş nörogelişimsel sürece de gen ekspresyonlarındaki değişimler ile sinyal yollarının neden olduğu düşünülmektedir. Aşağıda sayılan nedenlerden ötürü de şizofrenideki nörogelişimsel olan bu bozukluğa Wnt sinyal yolağının neden olduğu düşünülmektedir:

- Wnt sinyal yolağının anahtar bileşenlerinden biri GSK-3 enzimidir ve şizofreni hastalarının post-mortem prefrontal korteksinde GSK-3 β mRNA seviyesi %36, GSK-3 β protein seviyesi %41 ve GSK-3 aktivitesi de %45 oranında düşmektedir.
- Şizofreni hastalarının post-mortem hipokampüsünde Wnt sinyal yolağının önemli bileşenlerinden olan sitoplazmik β ve γ -katenin seviyesi düşmekte ve Wnt-1' in ekspresyonu artmaktadır.
- Şizofrenide antipsikotikler ve psikomimetikler direk Wnt sinyal yolağını etkilerler.

Yukarıda anlatılan nedenlerden ötürü şizofreniyi nörogelişimsel bir hastalık olarak kabul edip Wnt sinyal mekanizması üzerine araştırma yapmayı tercih ettik. Özellikle bu sinyal yolağının elemanlarından olan KREMEN gen ailesi ve proteinleri sinyal mekanizmasını çift yönlü (pozitif ve negatif) kontrol etmesinden dolayı dikkatimizi çekti.

Yukarıda anlatılanlar ile paralel olarak, araştırmamızın amacı KREMEN1 geninin ya da içerdiği varyasyonların şizofreni ile veya şizofreniye yatkınlık ile ilişkisi olup olmadığını araştırmaktır. Bunun için şizofreni hasta grubundaki ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin KREMEN1 genindeki varyasyonlar saptanacak, bir hastalık etkeni veya hastalığa yatkınlık etkeni olarak düşünülen bu varyasyonların şizofreni hastalarından oluşan popülasyonda sağlıklı kontrole göre istatistiki olarak daha yüksek oranda bulunması halinde bu varyasyonların şizofreni ile veya şizofreniye yatkınlık ile ilişkisi olduğuna karar verilecektir.

Araştırmamızın bağımlı değişkeni şizofreni hastalığıdır, bağımsız değişkeni analizini yaptığımız varyasyonlar, kontrol değişkenler ise genotiplerdir.

H1: Nörogelişimsel süreçte çok önemli olan Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının en önemli bileşenlerinden biri olan KREMEN1 geninde bulunan varyasyonlar şizofreni için risk teşkil ederler ve şizofreniye yatkınlıkla ilişkileri vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Şizofreni

Şizofreni [OMIM 181500] belirtileri genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden ve dünya çapında toplumun yaklaşık %0,5-1' ini etkileyen kronik, güçten düşürücü psikotik ve ciddi bir bozukluktur (1). Bu yüzden yalnızca etkilenen bireyler için değil aynı zamanda bütün toplumlar için önemli bir yük oluşturur. Özellikle dikkati, işlem belleğini ve yürütücü işlevleri etkileyen bilişsel bir fonksiyon bozukluğu olmasının yanı sıra; paranoya, halüsinasyonlar ve hezeyanlar gibi *pozitif semptomlar* ile ve istemsizlik, haz yitimi ve düşünce yoksulluğu gibi *negatif semptomlar* ile karakterizedir (2,3).

2.1.1. Tarihi:

Şizofreni: Bizi insan yapan hastalık.

D.F. HORROBIN (4)

Antik çağlardan beri şizofreni ile ilgili bu gün bildiğimiz belirtiler fark edilmiş ve bunlar o dönemin koşullarında kayıt altına alınmıştır. Örneğin, M.Ö ikinci binyıl Mısır Firavunları döneminin papirüslerinde şizofreni ile ilgili olan belirtilere değinilmiş, Eber Papirüsünde yer alan “Kalplerin Kitabı” isimli bölümde günümüzde genellikle şizofreniyi tanımlamada kullanılan “Depresyon”, “Demans” ve “Düşünce Bozukluğu” gibi belirtilere detayları ile değinilmiştir (5,6). Daha sonra, M.Ö 1400’ de Hinduizm’ in kutsal metinlerinden Atharva Veda’ larda şizofreni belirtilerine benzer tasnifler yapılmış, M.Ö 1000’ de Çince metinlerde deliliğin, demansın ve nöbetlerin/seizures belirtileri tanımlanmıştır (5). M.Ö 400’ lerde akıl hastalıklarının bilimsel temeller ile incelenmesi gerektiğini savunan Hipokrat (M.Ö 460-377) “Tıbbın Babası” olarak kabul edilmektedir. Hipokrat özellikle akıl hastalıklarının batıl inançlardan ya da tanrılardan kaynaklanmadığını belirtmiş ve bunları tıbbi bir durum olarak beyin hastalıkları şeklinde kabul etmiştir (5,6). *Mania, Melancholia, Hysteria, Paranoia* ve *Dementia* sözcükleri Hipokrat tarafından literatüre kazandırılmıştır. Özellikle *Paranoia*’ nın o dönemlerdeki tasnifi iki bin yıl sonra “şizofreni” olarak isimlendirilecek hastalığın habercisi olması açısından önemlidir (6). Ancak bahsedilen belirtiler başka tür hastalıklarda da görülebileceğinden, günümüzde şizofreni olarak isimlendirdiğimiz bu kompleks rahatsızlığın belirtileri için bütünleştirici bir yaklaşım uzun yıllar bulunamamıştır.

Modern şizofreni kavramının temelleri 19. yüzyılın ilk bölümünde atılmıştır. Bu dönemde ve daha sonra ruhsal hastalıklar için erken tanı sistemleri ortaya çıkmış ve

şizofreninin de dâhil olduğu çeşitli ruhsal hastalıklar tanımlanmıştır. Yıllardan 1809’ da İngiltere’ de John Haslam (1764-1844) ve Fransa’ da Philippe Pinel (1745-1826) birbirinden bağımsız olarak ilk kez şizofreninin klinik olarak yeterli açıklamasını yapmışlardır. Daha sonra her ikisi de farklı isimler ile tanımladıkları bu bozukluklar üzerine çalışmışlar ve teşhis ettikleri hastaların sayısı hızla artmıştır. Daha sonra, 1852 de Fransa’ da Benedict Morel (1809-1873) ilk kez şizofreniyi “*démence précoce*” terimi ile açıklamıştır. Almanya’ dan Emil Kraepelin (1856-1926) ise 1893’ de *démence précoce* teriminin Latincesi olan “*dementia praecox* (erken bunama)” terimini kullanmış ve halen günümüz şizofreni tanı kriterlerinde kullanıyor olduğumuz hastalık belirtilerini ve karakteristik özelliklerini kapsamlı bir biçimde kategorize etmiştir. Ayrıca hastalıkla ilgili tüm belirtileri de *dementia praecox* adı altında tek bir hastalık olarak nitelendirmiştir. Daha sonra, 1911’ de İsviçre’ den Eugen Bleuler (1857-1939) ilk kez *dementia praecox* yerine “*şizofreni*” terimini kullanmıştır. Yunan kökenli olan bu kelime *Schizo* (yarılma) ve *phrene* (akıl) kelimelerinin bir bütünüdür ve “düşüncenin yarılmaları/parçalanması” anlamında kullanılmaktadır. Ayrıca ilk kez Eugen Bleuler tarafından şizofrenide “pozitif” ya da “negatif” olarak belirtiler tasnif edilmiştir. Bleuler’ in *şizofreni* terimi uluslar arası olarak geçerliliğini korusa da; modern tanı sistemleri Kraepelin’ in çalışmalarına dayanmaktadır (5-7).

Son yıllarda “akıl yarılmaları” teriminin yarattığı bazı negatif etkilerden ötürü, şizofreni teriminin değiştirilmesi gündeme gelmektedir. Bunu ilk hayata geçiren ülke Japonya’ dır. Japon Psikiyatri ve Nöroloji Meclisi (JSPN) 2002 yılında eski terim olan “*Seishin Bunretsu Byo*” (“*akıl-yarılmaları-hastalığı*”) yerine yeni terim olan “*Togo Shitcho Sho*” (“*bütünleşme bozukluğu*”) ifadesini kullanmaya başladı. Özellikle eski terimin; tamamen iyileşme göstermiş kişide bile düzensiz ve hasta kişiliği çağrıştırmaları, 1970’ lerdeki Japon kitaplarında “Erken Bunama” şeklinde tanımlanmış olması, Japon tarihinde daha önce var olmuş yasalar çerçevesinde hastaların kötü şartlarda tutulması ve dolayısıyla da bu tarihi etkilerden dolayı kişilerin bu eski isimle damgalanıyor olması yeni isim olan “*Togo Shitcho Sho*” (“*bütünleşme bozukluğu*”) teriminin kullanılmasına neden olmuştur (8). Şizofreni tarihi ile ilgili önemli dönüm noktalarına aşağıdaki tabloda (Tablo 1) kısaca değinilmiştir.

Tablo 1: Modern şizofreni kavramının gelişimindeki bazı dönüm noktaları.

John Haslam ve Philippe Pinel	1809	Şizofreninin klinik olarak yeterli açıklamasını yapmışlardır.
Benedict Morel	1852	Şizofreniyi “ <i>démence précoce</i> ” terimi ile açıklamıştır.
Emil Kraepelin	1893	İlk kez “ <i>dementia praecox</i> (erken bunama)” terimini kullanmış ve halen günümüz şizofreni tanı kriterlerinde kullanıyor olduğumuz hastalık belirtilerini ve karakteristik özelliklerini kapsamlı bir biçimde kategorize etmiştir.
Eugen Bleuler	1911	İlk kez <i>dementia praecox</i> yerine “ <i>Şizofreni</i> ” terimini kullanmıştır. Ayrıca şizofrenide “pozitif” ya da “negatif” olarak belirtileri tasnif etmiştir.

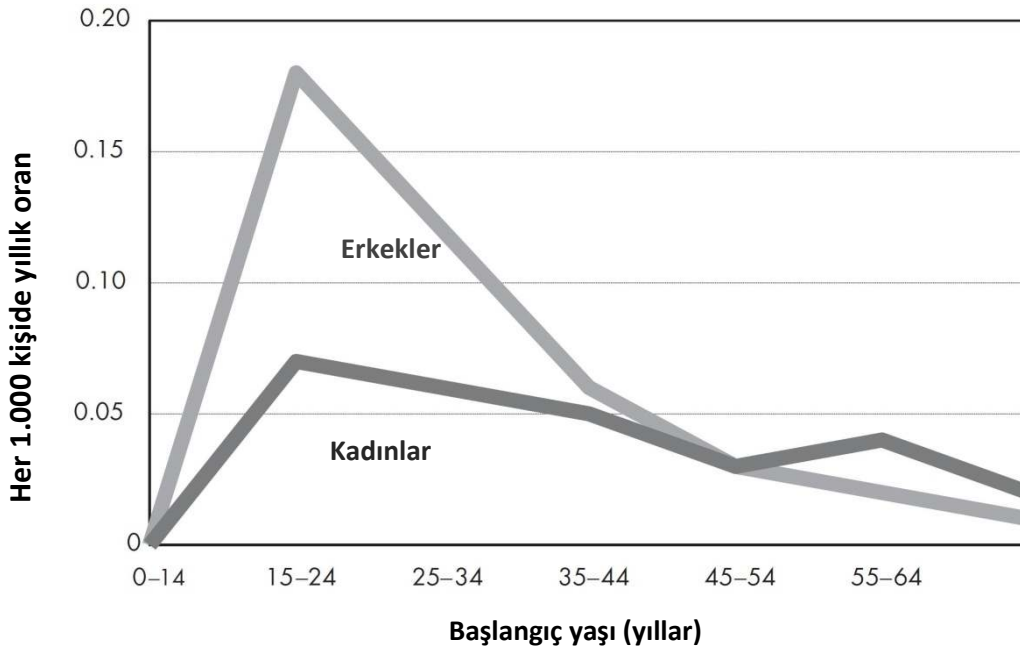
2.1.2. Epidemiyoloji

Şizofreni için tanı kategorileri düşünülmezsin, epidemiyolojik veriler sistemli olarak derlendiğinde, şizofreninin yaşam boyu yaygınlığı %0,30 ila %0,66 arasında ve insidansı da yılda her 100.000 kişiden 10,2 ila 22,0 kişi şeklindedir (9-11). Bu kapsamda bu oranlar tanı tariflerine dayalı olarak bile üç-kat farklılık gösterebilmektedir (12,13). Her ne kadar şizofreni insidansı düşük olsa da, kronikliği nedeniyle yaygınlığı yüksektir ve Dünya çapında yaklaşık 24 milyon insanı etkilemektedir (WHO verisi) (14). Şizofreni yaygınlığı yerli halk ile kıyaslandığında, göçmenlerde 1,8 kat daha fazladır ve dünya çapında kentsel, kırsal ya da daha farklı coğrafik bölgeler arasında yaşam boyu yaygınlığı arasında önemli bir farklılık yoktur (10).

Şizofreninin yaygınlığı üzerine ülkemizde yapılan bir araştırmaya göre, genel toplumda (n:6022, birleştirilmiş veri) şizofreni yaygınlığı 1000 kişide 8,9 olarak saptanmıştır. Bu çalışmaya göre ülkemizdeki şizofreni yaygınlığı diğer ülkelerde bildirilen tahminlerden daha yüksektir (15).

Dünya çapında kapsamlı olarak temsili toplumlar ile yapılan çalışmalar son 50 yıldır şizofreninin insidans oranının dünya çapında stabil olduğunu göstermiştir (16). İlginç biçimde, şizofreni hastaları genel topluma göre daha az çocuk sahibi olmalarına rağmen, şizofreni yaygınlığı zaman içinde önemli bir değişiklik göstermemiştir (17).

Şizofreni yaygınlığı cinsiyetler arasında aynı olmasına rağmen, erkeklerde kadınlara göre başlangıç yaşı daha erkendir (10,18) ve genellikle hastalığın şiddeti erkeklerde kadınlara göre daha yoğundur (19,20). Ayrıca 1970 ile 1982 yılları arasında Danimarka’ da yaş ve cinsiyet bakımından şizofreninin insidansı değerlendirilmiş ve erkeklerde ve kadınlarda en yüksek insidans oranının 15-24 yaşları arasında olduğu gözlenmiştir (11). Bu çalışmadan elde edilmiş veriler ışığında, aşağıda (Şekil 1) başlangıç yaşının erkeklerde daha erken olduğu, yaşam boyu şizofreniye yakalanma riskinin erkeklerde kadınlara göre yaklaşık %30-%40 daha yüksek olduğu da görülmektedir (11,21).



Şekil 1: Cinsiyete göre şizofreninin başlangıç yaşı (Danimarka da 1970 ile 1982 yılları arasında) (The American Psychiatric Publishing Textbook Of Schizophrenia (11)’ dan uyarlanmıştır)

Şizofreninin kötü sonlanım ile ilişkili olan negatif semptomları ve uzun hastalık süreci erkeklerde kadınlara göre daha yüksek insidans oranı ile kendini gösteren kategorilerken (22); duygulanım belirtileri gibi iyi sonlanım ile ilişkili olan kategoriler ise erkeklerde ve kadınlarda benzer oranlarda kendini gösteren kategorilerdir (13,23). Bu veriler, şizofreni ve ilgili tanı özelliklerinin semptomatik ifadesinin kadınlara oranla erkeklerde daha ciddi olduğunu göstermektedir. Kadınlara oranla erkeklerde hastalık başlangıcının daha erken görülmesi bu fikri desteklemektedir (9,13).

2.1.3. Tanı

Modern şizofreni kavramı hastalığın uzun dönemde kötüleşme süreci üzerine odaklanan Kraepelin' in çalışmalarına (5-7,24) ve düzgün düşünmede güçlük, hedefe yönelik davranış kaybı veya çelişkili dürtülerden dolayı kararsızlık ve iç dünyaya çekilme (otizm) gibi temel hastalık belirtileri üzerinde duran Bleuler' in çalışmalarına dayanmaktadır (5-7,25). Günümüzde şizofreni için yaygın olarak kullanılan iki esas tanı sistemi vardır; ICD-10 (26) (*Tenth Revision of the International Classification of Diseases*) ve DSM-IV(27) (*4th Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*). İki sistem arasındaki esas fark DSM-IV de bazı tanısall kısıtlamaların olması (toplumsal veya mesleki işlev bozukluğu bakımından) ve 6 aylık hastalık süreci gereksinimi (ICD-10 tanı sisteminde ise bu 1 ay) olmasıdır (2). İki sistem de güvenilirlerdir (28). Bununla birlikte, çeşitli çalışma gurupları bazı zor tanı konularına çözümler bulabilmek için yeni nesil ICD ve DSM (DSM-V ve ICD-11) sistemleri geliştirmekteler (12). DSM sınıflama sisteminde şizofreni için kullanılan DSM-IV tanı ölçütleri Tablo 2' de gösterilmiştir (27).

Tablo 2: Şizofreni için DSM-IV tanı ölçütleri (27)

A. Karakteristik Semptomlar:

Bir aylık bir dönem boyunca (başarıyla tedavi edilmişse daha kısa bir süre), bu sürenin önemli bir kesiminde aşağıdakilerden ikisinin (ya da daha fazlasının) bulunması:

- (1) hezeyanlar (sanrılar)
- (2) halüsinasyonlar (varsanılar)
- (3) dezorganize konuşma (örn. sık sık çağrışımlarda dağınıklık ya da tutarsızlık)
- (4) ileri derecede dezorganize ya da katatonik davranış
- (5) negatif semptomlar, yani affektif donukluk (tekdüzelik), konuşma fakirliği (alogia) ya da istemsizlik (avolition)

Not: Hezeyanlar bizar (tuhaf) ise ya da halüsinasyonlar kişinin davranış ya da düşünceleri üzerine sürekli yorum yapmakta olan seslerden ya da iki ya da daha fazla sesin birbiriyle/birbirleriyle konuşmasından oluşuyorsa A Tanı Ölçütünden sadece bir semptomun bulunması yeterlidir.

B. Toplumsal/mesleki işlev bozukluğu:

İş, kişilerarası ilişkiler ya da kendine bakım gibi önemli işlevsellik alanlarından bir ya da birden fazlası, bu bozukluğun başlangıcından beri geçen sürenin önemli bir kesiminde, bu bozukluğun başlangıcından önce erişilen düzeyin belirgin olarak altında kalmıştır (başlangıcı

çocukluk ya da ergenlik dönemine uzanıyorsa, kişilerarası ilişkilerde, eğitimle ilgili ya da mesleki başarıda beklenen düzeye erişememiştir).

C. Süre:

Bu bozukluğun süre giden belirtileri en az 6 ay süreyle kalıcı olur. Bu 6 aylık süre, en az bir ay süreyle (başarıyla tedavi edilmişse daha kısa bir süre) A Tanı Ölçütünü karşılayan semptomları kapsamalıdır; prodromal ya da rezidüel semptomların bulunduğu dönemleri kapsayabilir. Bu bozukluğun belirtileri, prodromal ya da rezidüel dönemlerde, sadece negatif semptomlarla ya da A Tanı Ölçütünde sıralanan iki ya da daha fazla semptomun daha hafif biçimleriyle (örn. acayip inanışlar, olağandışı algısal yaşantılar) kendilerini gösterebilir.

D. Şizoaffektif Bozukluğun ve Duygudurum Bozukluğunun dışlanması.

E. Madde kullanımının ve genel tıbbi durumun dışlanması.

F. Yaygın bir gelişimsel bozukluk ile olan ilişkisi:

Otistik bozukluk ya da diğer bir yaygın gelişimsel bozukluk öyküsü varsa bunlara ek olarak en az bir ay süreyle (başarıyla tedavi edilmişse daha kısa bir süre) belirgin sanrı ya da varsanılar da varsa şizofreni ek tanısı konabilir.

Şizofreni Alt Tipleri

295.10 Şizofreni, Dezorganize Tip

295.20 Şizofreni, Katatonik Tip

295.30 Şizofreni, Paranoid Tip

295.60 Şizofreni, Rezidüel Tip

295.90 Şizofreni, Ayrışmamış Tip

2.1.4. Klinik Özellikler/Semptomlar

Şizofreni genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden çok değişken ve kimi zaman oldukça şiddetli belirtilere sahip olan zor bir hastalıktır (1,27). Başlangıçta, çoğu hastanın davranış bozukluğu ve öğrenme güçlüğü öyküsüne sahip olmasının yanı sıra (29), hastalar şizofreni ile ilgili tam bir belirti göstermeden bile kendileri ya da çevreleri ile ilgili bazı tuhaf duygular geliştirmeye başlayabilirler (30). Daha sonra bunu günler ya da bazen yıllar içinde daha ciddi olan prodromal belirtiler izler (31).

Psikotik veya Pozitif Semptomlar, Negatif Semptomlar ve Bilişsel Bozukluk şizofreni belirtilerinin üç temel şekli olarak kabul edilir (1-3,32). Bu üç esas şizofreni belirtisi ile ilgili ayrıntılara Tablo 3' de değinilmiştir.

Tablo 3: Esas şizofreni belirtileri ve ayrıntıları

Esas semptomlar	En sık görülen belirtileri
Psikotik veya Pozitif Semptomlar	Halüsinasyonları (varsanıları) ve hezeyanları (sanrıları) içeren gerçeklikle temas kaybı ya da bizar (tuhaf) davranışlar
Negatif Semptomlar	Duygusal tepkilerde küntleşme, affektif donukluk (tekdüzelik), konuşma fakirliği (alogia) ya da istemsizlik (avolition ya da apati)
Bilişsel Bozukluk	Dikkat ve konsantrasyonda, öğrenme ve hafızada bozukluk ve yürütücü işlevlerde bozulma

Şizofrenide halüsinasyonlar en sık olarak işitsel olmak üzere, görsel ya da koku, tat ve dokunma duyuları ile ilgilidir. En sık meydana gelen hezeyanlar (sanrılar) ise kötülük görme sanrıları, düşüncelerinin okunması ve kontrol edilmesi sanrısı, büyüklük sanrısı ve bedensel sanrılardır (1-3). Negatif semptomlar psikotik semptomlardan daha yaygındır ve zaman içinde daha az dalgalanma gösterirler (32). Aynı zamanda negatif semptomlar sıkı bir şekilde zayıf psikososyal işlevsellikle ilişkilidir (33). Tıpkı negatif belirtilerde olduğu gibi, bilişsel bozukluklar da toplum içinde yaşamayı ve çalışmayı zorlaştıran işlevsel bozukluklara yol açar (34).

2.1.5. Risk Etkenleri

2.1.5.1. Genetik Etkenler

Şizofreni oranları genel popülasyon ile kıyaslandığında hastaların akrabaları arasında oldukça yüksektir. Evlat edinme ve ikiz çalışmaları gibi çalışmalar, bu artan riskin genetik temellerinin de olduğunu göstermiştir. Söz konusu bu çalışmalara göre; etkilenmiş/hastalığı taşıyan bir birinci derece aile üyesinin bulunması ile ilişkili olarak risk on-kat artmaktadır. Ayrıca bu genetik risk her bir etkilenmiş akrabanın sayısına göre iyice artmakla birlikte; her iki ebeveyn de etkilenmiş olduğunda risk yaklaşık %50 oranlarına ulaşır (35). Tek yumurta ikizlerinden biri etkilenmiş olduğunda ise risk diğeri için %60 ila %84' ler gibi yüksek oranlara ulaşmaktadır (36). Bu genetik geçiş basit *Mendelian* tek-gen kalıtım paternlerinden farklıdır. Daha büyük olasılıkla, her biri epigenetik ve çevresel etkenlerden az da olsa etkilenen ve onlar ile uyum içinde hareket eden birden fazla yatkınlık geni vardır. En az sekiz

genin şizofreni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (37,38). Konu ile ilgili ayrıntılı bilgilere “*Şizofreni Genetiği*” kısmında ayrıca değinilecektir.

2.1.5.2. Perinatal ve Erken Çocukluk Dönemi Etkenleri

Araştırmacılar tarafından yapılan bazı çalışmalar, fetal yaşamdaki bazı etkenlerin (hipoksi, maternal enfeksiyon, maternal stres, maternal yetersiz beslenme gibi) şizofreni insidansının küçük bir bölümünden sorumlu olabileceğini göstermiştir (39-42). Araştırmacıların popülasyondaki tüm bireyleri doğumdan itibaren takip ettikleri ve değerlendirdikleri *Doğum Kohortu* ve *Yüksek-Risk Çalışmaları* bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, yetişkin olduklarında şizofreni tanısı koyulacak olan çocuklar, akranları ile kıyaslandığında, çocukluk döneminden itibaren bazı psikotik belirtiler (örn. spesifik olmayan duygusal ve davranışsal bozukluklar ve psikopatolojik değişiklikler, entelektüel ve lisan değişiklikleri ve motor gecikmeler) sergilemektedirler (43-46). Hatta bu gelişimsel belirtilerin arasında şizofrenin tanısı için spesifik olan motor ve bilişsel değişiklikler de olduğu için, bu çağlarda tanısız anlamda farklılaşmalar başlamaktadır (47,48).

2.1.5.3. Çevresel Etkenler

Epidemiyolojik çalışmalar şizofreni oranının bazı çevresel faktörlerden etkilendiğini açık bir şekilde ortaya koymuştur (9,49). Kentselleşme bu çevresel faktörlerden belki de en önemlisidir. Pedersen ve Mortensen tarafından yapılan çalışmalar kentselleşme derecesi ile şizofreni sıklığı arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Danimarka’ daki nüfus kayıtlarının incelenmesi sonucunda; beş farklı kentleşme düzeyinde, büyük şehirlerden küçük şehirlere gittikçe şizofreni sıklığının azaldığı görülmüştür. Ayrıca şizofreninin ortaya çıkmasından önce yüksek derecede kentselliğe maruz kalan çocuklarda (0-15 yaş) ileride şizofreni geliştirme riskinin daha yüksek olduğu görülmüştür (50).

Pedersen ve Mortensen tarafından yapılan bu çalışma beraberinde akıllara şu soruyu getirmişti; şizofreni genç erişkinlik döneminde başlayan bir bozukluk olarak kabul ediliyor ise ve kent etkisine daha erken yaşta maruziyet şizofreni sıklığında bir artışa neden oluyorsa, kent etkisinin henüz şizofreninin ortaya çıkmadığı yaşlarda fenotipik olarak etkisini göstermesi gerekmez miydi? Sorunun cevabını aramaya yönelik yapılan çalışmalar kentselleşmenin gerçekten de şizofreni üzerine premorbid etkisinin yüksek olduğunu ve kentselleşmenin etkisi ile şizofreni belirtilerin daha erken yaşlarda ortaya çıktığını göstermiştir (51).

Bir diğer çevresel etmen de birinci ya da ikinci kuşak göçmen olmak ve bağlı olunan etnik kökendir. Kanıtlar şizofreni riskinin, aynı etnik kökenden göçmenlerin yoğunluğunun

düşük olduğu semtlerde daha yüksek olduğunu göstermektedir (12,52,53). Ayrıca etnik köken kimliği ile olumsuz özdeşim gösteren göçmenlerde şizofreni riski daha yüksektir (54).

Esrar kullanımı da şizofreni gelişimi için önemli faktörlerden biri olarak rapor edilmiştir (55). Özellikle erken yaşlarda esrar kullanımına başlamak psikotik semptomların gelişimi ile yakından ilişkilidir (56). Bu kapsamda, İsveç, Hollanda, Yeni Zelanda ve İsrail de yapılmış prospektif çalışmalar riskin iki ila 25 kata kadar yükselebilecek değerlerde olduğunu göstermiştir (57-59).

2.1.6. Tedavi

Şizofreni hastalığının klinik tablosu ve gidişatı kimi zaman çok farklılıklar gösterebildiği için, semptomların net bir biçimde anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin kişiye özel değerlendirilmesi gerekmektedir (12). Şizofreni de mevcut farmakolojik tedavi özellikle pozitif semptomlarda iyileşme sağlayan antipsikotik ilaçlar ile yapılan tedavi biçimidir (1,12,60,61). Antipsikotikler reseptör afinitelerine ve yan-etki profillerine göre tipik (eski/ilk kuşak) ve atipik (yeni/ikinci kuşak) antipsikotikler şeklinde sınıflandırılırlar (1,12,61). Tipik antipsikotikler güçlü Dopamin D₂ reseptör antagonistleridirler ve hastalığın pozitif semptomları için etkilidirler. Ayrıca 1950'lerde keşfedilen ve ilk kuşak antipsikotiklerden olan ajanlar (haloperidol ve klorpromazin gibi) psikotik semptomların tedavisinde etkili olmalarına rağmen sıklıkla istenmeyen motor yan-etkilere ve ekstrapiramidal semptomlara (EPS) neden olurlar. Atipik antipsikotikler ise kısmi Dopamin D₂ reseptör antagonistleridirler ve bunlar esas olarak güçlü serotonin reseptör antagonistleridirler. Bu yeni kuşak antipsikotiklere risperidon, olanzapin, ziprasidon, aripiprazol, katiapin örnek verilebilir. Tipik antipsikotiklerden farklı olarak atipik antipsikotikler ile yapılan tedavilerde EPS ve motor yan-etkilerin gelişimi daha azdır. Bunlara ek olarak, yeni kuşak antipsikotikler yüksek oranda metabolik yan-etki (kilo artışı, trigliserid ve kolesterol artışı gibi) geliştirmeye daha yatkındırlar. Sonuç olarak antipsikotik ilaçların etki mekanizmaları ile ilgili çözilemeyen çok sayıda konu olmasına rağmen, tüm etkili antipsikotiklerin Dopamin D₂ reseptör antagonistleri oldukları ve bunların da semptomların hafiflemesi için çok önemli oldukları gösterilmiştir (1,12,61).

2.1.7. Şizofreninin Temellerine Dair Güncel Kuramlar

2.1.7.1. Şizofreni ve Dopamin Kuramı

Dopamin merkezi sinir sistemindeki katekolaminlerin büyük bir kısmını oluşturur ve 50 yıl önce Arvid Carlsson tarafından tanımlanmış bir nörotransmitterdir. Carlsson, o zamanlar

yeni geliştirilmiş bir cihaz olan spektrofotofluorimetriyi kullanarak hayvanlar üzerinde yaptığı denemelerinde, *rezerpin* verilmiş ve L-Dopa ile tedavi edilmiş hayvanların beyinlerinde dopamini keşfetmiştir. Ayrıca Carlsson, dopaminin beynin normal bir bileşeni olduğunu söylemiş ve daha çok bazal ganglionlarda yoğunlaştığını belirtmiştir. Aynı yıllarda Paul Greengard ve ark. dopamin reseptörlerinin aktivasyonu sayesinde tetiklenen hücrelerdeki sinyal mekanizmaları hakkındaki ilk bilgileri literatüre kazandırmışlardır. Arvid Carlsson ve Paul Greengard' ın dopamin ile ilgili yaptıkları bu çalışmalar onlara 2000 yılında Nobel Ödülünü kazandırmıştır (62).

Şizofrenide dopamin hipotezi, hastalığın pozitif semptomlarının kaynağının beyinde subkortikal olarak dopamin seviyesindeki aşırı artış olduğunu savunur. Aynı zamanda, şizofreninin negatif ve bilişsel semptomlarının da korteks' deki eksik dopamin seviyesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Şizofreni hastalarında subkortikal dopamin artışı ve kortikal dopamin eksikliğinin aynı anda var olduğu SPECT ve PET gibi nöro-görüntüleme ve biyokimyasal teknikler ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, akut dopamin eksikliği çalışmaları, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında şizofrenide başlangıçtaki aşırı dopaminin D₂ reseptörlerinin sayısını arttırdığını göstermiştir. Bu da şizofrenide D₂ reseptörlerinin aşırı uyarıldığı fikri ile son derece uyumludur. Kortekste ise, kontrolle kıyaslandığında şizofreni hastalarında dopamin tip-1 (D₁) reseptörlerinin aşırı ifadesi söz konusudur. Bu bulgular şizofreni hastalarının beynindeki kortikal/subkortikal dengesizlik için kanıt teşkil etmektedir (63,64).

Moleküler sevide incelendiğinde, şizofrenide bazı önemli nörotransmitter sistemlerinin (prefrontal kortekste ve striatumdaki dopaminerjik nöron sistemi, hippocampusta ve prefrontal kortekste ki glutaminerjik nöron sistemi vb.) etkilendiği de gösterilmiştir (65,66).

Şizofrenide yirmi yıldan fazla süredir yapılan çalışmalar dopamin hipotezi üzerine yoğunlaşmıştı. İlginin bu kadar fazla olmasının asıl nedeni, klinik olarak kullanılmakta olan tüm antipsikotik ilaçların dopamin reseptörü antagonisti olarak çalışmasıydı. Dopaminerjik hipotez yeni antipsikotik ilaçların geliştirilmesinde buluşsal nitelikte olmasına rağmen, şizofreninin etiyolojisini ve doğal seyrini yeteri kadar açıklamakta başarısız oldu. Bu kapsamda, günümüzde bu hastalığın etiyolojisini ve doğal seyrini daha net biçimde açıklayabilen ve dünya çapında araştırmaların ağırlık verildiği kuram *Nörogelişimsel Hipotez* ' dir.

2.1.7.2. Şizofreni ve Nörogelişimsel Kuram

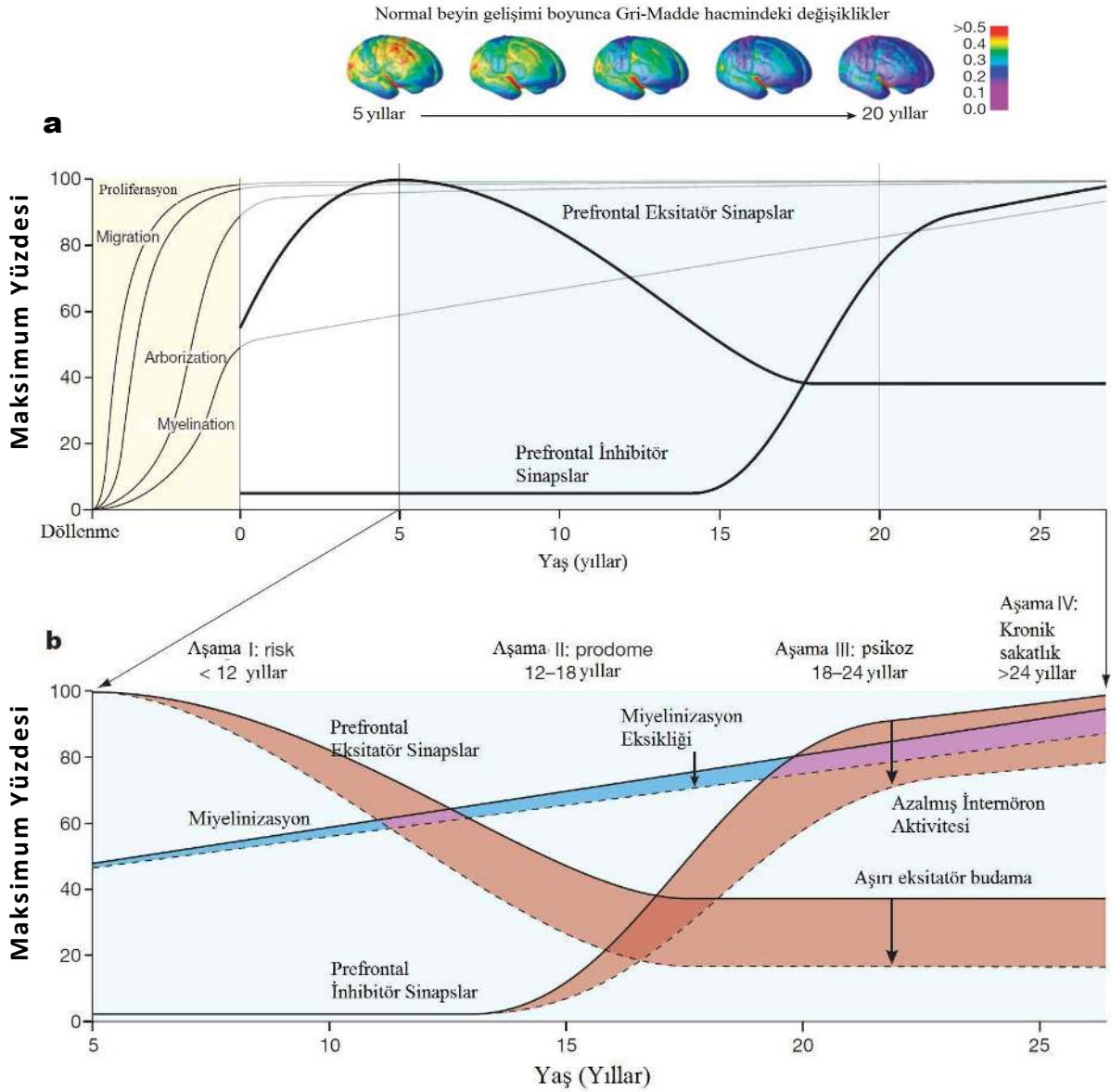
Şizofreni' de "Nörogelişimsel Kuram" aslında yeni gündeme gelen bir fikir değildir ve hastalığın ilk modern kavramına açıklık getiren Bleuler ve Kraepelin' in gözlemlerine kadar dayanır. Bleuler ve Kraepelin şizofreni hastalarının çocukluk çağlarında görülen premorbid belirtilerin yanı sıra sosyal etkileşimde de görülen eksiklikleri vurgulamışlardır (67). Sonraları, Feinberg, Weinberger ve Murray gibi önemli araştırmacılar şizofreninin nörogelişimsel bozukluklar bütünü olduğunu öne sürmelerine rağmen (68-71), nörogelişimsel yaklaşımı daha da kuvvetli kılan kanıtlar ve tanımlamalar ancak günümüzde daha ayrıntılı biçimde ortaya koyulabilmiştir.

Şizofreninin patolojisi için nörogelişimsel model poligenetik ve çevresel risklerin katkısıyla erken dönemde (pre/perinatal) başlayan ve geç döneme (genellikle adolesan) kadar süren gelişimsel beyin anormalliklerinin olduğunu savunur.

Normal kortikal gelişim proliferasyonu, göçü, detaylandırmayı (devre oluşumu) ve miyelinizasyonu içermektedir. Beyin görüntüleme çalışmaları bireylerde prefrontal korteks olgunlaşmasının sonuna kadar olan yirmili yaşların ortalarına kadar sinaptik yoğunluktaki, glikoz metabolizmasındaki, beyaz madde hacmindeki ve gri madde yoğunluğundaki değişiklikleri açık bir şekilde ortaya koymaktadır (72). Klasik anatomik post-mortem çalışmalar hem sinaptik eliminasyonun hem de artan miyelinizasyonun erken yetişkinliğe kadar sürdüğünü kanıtlamıştır. Gençlik dönemi insan post-mortem beyin anatomisi çalışmalarından elde edilen veriler yetersizken, insan olmayan primat beyinleri üzerinde yapılan çalışmalar erken yetişkinlik döneminde asimetric sinaps budanmasını, inhibitör devrelerin proliferasyonunu ve inhibitör girdilerin hedefleri olarak piramidal dendritlerin detaylandırılmasının sürdürüldüğünü göstermektedir (73). Tüm bu gözlemler beyin olgunlaşmasının doğumdan erken yetişkinliğe kadar önce kortekste sonraları ise prefrontal kortekste eksitator-inhibitör dengenin özenle kalibrasyonu ile sağlandığını göstermektedir (Şekil 2a).

Peki nörogelişimsel bir hastalık olarak şizofreniyi bu özellikleriyle nasıl haritalayabiliriz, beyin gelişimi açısından normal bireylere göre bir fark var mı? Şizofreni geliştiren çocuklarda gelişimsel süreç boyunca prefrontal olarak aşırı eksitator sinaptik budanma ve inhibitör sinapslar açısından da nöronlar arası düşmüş aktivite dikkat çekmektedir. Böylece şizofrenide prefrontal kortekste gelişimsel süreç boyunca eksitator-

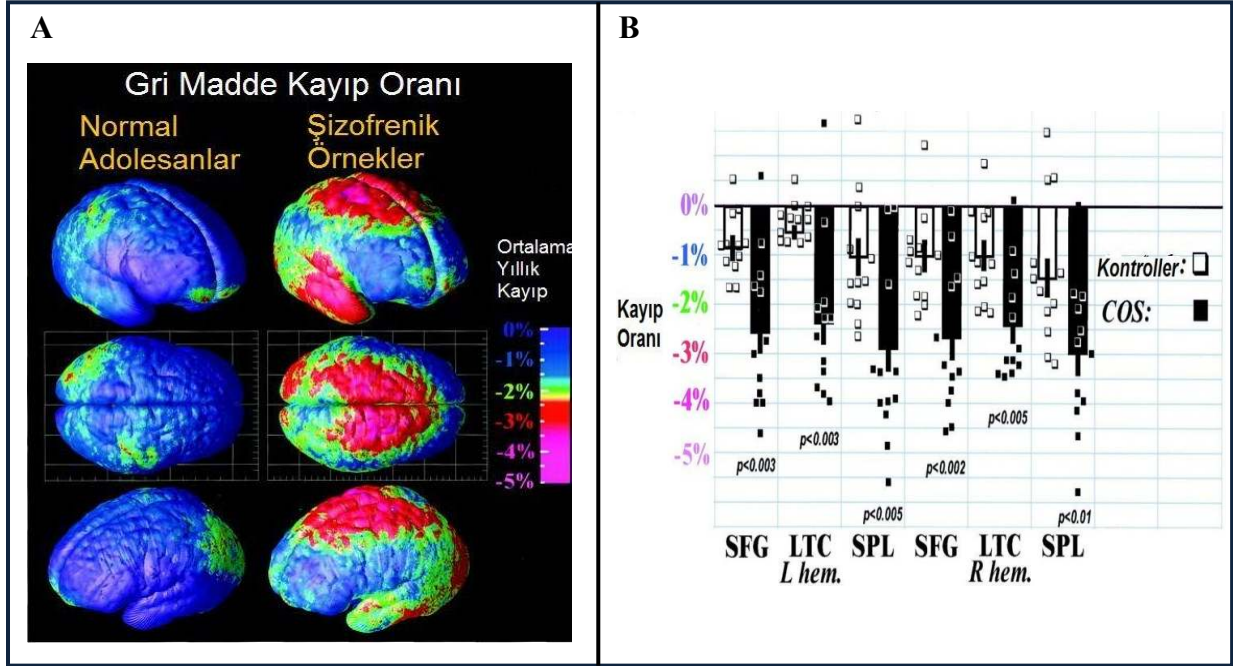
inhibitör denge bozulmuş olur. Ayrıca miyelinizasyonda da azalma dikkati çeken unsurlardandır (73) (Şekil 2b).



Şekil 2: Normal beyinde (a) ve şizofreni hastası beyinde (b) nörogelişimsel model. **a**, normal kortikal gelişimdeki mükemmel prefrontal eksitator ve inhibitör sinaptik dengeyi ifade ederken; **b**, yine gelişimsel süreçte (çocuklarda) şizofreni hastalığından dolayı eksitator-inhibitör dengenin bozulduğunu ve miyelinizasyonda da eksikliğin giderek şiddetlendiğini ifade etmektedir [Thomas R. Insel (73), 2010’ dan uyarlanmıştır].

Araştırmacılar şizofrenide nörogelişimsel sürecin gerçekten de bozulup bozulmadığını anlayabilmek için beyin görüntüleme yöntemleri ile gelişimsel süreci incelemişlerdir. Şizofreni hastalarında nörogelişimsel süreci yakalayıp inceleme yapabilmek için tabii ki çocukluk çağı başlangıçlı şizofreni hastalarını araştırmaya dahil etmek gerekliydi. Bu amaçla

Thompson ve ark. IQ ve demografik verileri birbirine eşleşen 12 sağlıklı gönüllü ve 12 de şizofreni hastası çocuğun nörogelişimsel değişikliklerini Gri Madde kaybı açısından beş yıldan daha fazla süre boyunca değerlendirmişlerdir (74). Sonuçlar oldukça bariz bir şekilde Gri Madde kaybının şizofrenili çocuklarda sağlıklı akranlarına göre çok daha fazla olduğunu göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3: Çocukluk çağı başlangıçlı şizofrenide sağlıklı kontrollere kıyasla nörogelişimsel süreçte Gri Madde kaybı [Thompson ve ark. (74), 2010' dan uyarlanmıştır]. Mavi ile gösterilen renk ile Gri Madde de kayıp olmadığı (%0 ile), pembe renge doğru gidildikçe Gri Madde de kayıp olduğu (%-5 ile) ifade edilmiştir. Superior Frontal Girus (SFG), Lateral Temporal Korteks (LTC), Superior Parietal Lobüller (SPL).

Aynı zamanda, şizofreni hastalarında akuadukt stenozu, araknoid ve septal kistler, korpus kallozum agenezisi ve yokluğu, normal yapısal serebral asimetri gibi erken beyin gelişiminde görülen morfolojik anormallikler daha yüksek oranda görülmektedir (75).

Şizofrenik psikoz genellikle 18-25 yaşları arasında ortaya çıksa da, çok sayıda boylamsal popülasyon temelli araştırma problemlerin çok daha erken yaşlarda ortaya çıktığını kanıtlamıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, Kopenhag da 45 yıllık izlem ile gerçekleştirilmiş doğum kortu araştırmaları bunu desteklemektedir (76). Veriler Dunedin ve diğer pek çok doğum kortu çalışmaları ile de uyumlu biçimdedir. Tüm bu veriler ileride şizofreni olacak çocuklarda IQ' nun erken yaşlarda ve devamlı olarak düştüğünü de göstermiştir (77). Şizofreni habercisi olan bu belirteçlerin fark edilmesi güçtür ve bunlar bu hastalığa spesifik

değillerdir. Ancak, bulguların tutarlılığı ve uyumu psikozun gelişimsel olarak tamamen sağlıklı beyinlerde ortaya çıkmadığı hipotezini desteklemektedir (73).

Akrabalık, ikiz ve evlat edinme çalışmaları ile şizofreninin genetik kökenleri de olan bir hastalık olabileceği düşünülmüş ve daha sonra araştırmacılar genetik biliminin temellerini oluşturan genler üzerine odaklanmışlardır. Hastalığın ortaya çıkışı ile ilgili genetik çalışmalardan elde edilen veriler de şizofrenide erken beyin gelişiminin etkilendiğini göstermektedir. Şizofreni ile ilişkisi olan yapısal genlerin çoğunun nöronal proliferasyon, göç veya sinaps oluşumu ile ilgili nörogelişimsel genler olduğu gösterilmiştir (78).

Araştırmacılar beyin gelişiminin her basamağını şekillendiren ve düzenleyen bu şifrelerdeki bozuklukların şizofreniye neden olabileceğini düşünmüşlerdir. Bunu kanıtlamak için Niwa ve ark. tarafından son derece değerli bir araştırma yapılmıştır (79). Araştırmacılar pre ve perinatal fare beyinlerindeki frontal kortekste DISC1 geninin geçici olarak susturulmasının erken yetişkinlikte ortaya çıkan nörokimyasal ve davranışsal bozukluklara neden olduğunu kanıtlamışlardır. Dahası, Niwa ve ark. NRG1 ve DISC1 gibi aday genlerin hassas allellerinin bazılarında var olan değişikliklerin prefrontal kortekste ve gelişmekte olan kortekste çok ciddi gelişimsel farklılıklar yarattıklarını ortaya koymuşlardır (79).

Gelişimle ilgili son bağlantı ise otizm ve diğer nörogelişimsel hastalıklardan gelmektedir. Şizofreni genetiği ile otizm ve diğer farklı nörogelişimsel hastalıkların genetik yapısı örtüşmektedir (80,81). Fakat bu farklı nörogelişimsel hastalıklarla ilişkili olan benzer genetik değişikliklerin etkilerinin niçin bazen üç yaşlarında (otizm), bazen ise tam olarak 18' li yaşlardan sonra (şizofreni) ortaya çıktığı henüz netleşmemiştir. Büyük ihtimalle nörogelişimsel olan bu hastalıklarda farklılığa neden olan çevresel etkenler, genomik düzenleyiciler ya da hastalığın bütününe katkı sağlayan bilinmeyen genetik elemanlardır.

Daha önce de belirtildiği gibi özellikle prenatal ve perinatal dönemde etkili olan çevresel faktörler bu bireylerde ileride şizofreninin görülme riskini arttırmaktadır. Çevresel faktörlerden özellikle gebelikte yetersiz beslenme (40,82,83), prenatal ve ikinci trimester' da enfeksiyon (42,84), perinatal incinme (39) şizofreni için önemli risk faktörleridir. Bu etkiler çoğu zaman tek başlarına hafiftir ve şizofreni için spesifik değillerdir. Ancak genetik yatkınlık ve bu çevresel faktörler bir araya geldiklerinde, bunlar 20 yıl sonra tüm psikozlarıyla ortaya çıkabilecek şizofreni hastalığının habercisi halini almaktadırlar. Nörogelişimsel bir hastalık olarak kabul edilen otizm den örnek verecek olursak, araştırmacılar tamamen normal genomik sekansa sahip çok sayıda genin çocuklukta çevresel etkenli hipermetilasyonla baskılandığını

bulmuşlardır (85). Öyleyse bu açıdan bakıldığında gen-çevre etkileşimi çok güçlü bir faktördür.

Gecikmiş başlangıç nedeni:

Şizofreni için nörogelişimsel hipotez psikozun genellikle geç ergenlikte ya da erken yetişkinlikte ortaya çıkmasından dolayı başlangıçta araştırmacılar tarafından rağbet görmemiştir. Çok daha erken yaşlarda ortaya çıkan çok sayıda psikoz örnekleri de olmasına rağmen, psikozun genellikle 18-25 yaşları arasında ortaya çıkması akıllara şu soruyu getirmektedir: "şizofreni nörogelişimsel bir perspektife dayalı ise ve gelişimsel değişiklikler prenatal dönemden itibaren başlıyor ise, neden bu gelişimsel basamaklarda meydana gelen bozuklukların sonuçları hemen değil de çok sonraları ortaya çıkıyor?". Şizofrenide erken gelişim döneminde bozulan ya da değişikliğe uğrayan bölgeler aslında geç olgunlaşan nöronal sistemlerdir. Şizofreni hastalığına neden olan esas beyin bölgeleri (prefrontal-temporal bölge vb.) erken gelişim döneminde dormant durumda olduğundan henüz bu bölgelerde meydana gelen değişiklikler o yaşlarda genellikle fenotipte kendini göstermez. Bu erken dönemde bozuklukları sinaptik bağlantılar kompanse edebilir. Ancak ergenlik dönemine doğru sinaptik bölgelerdeki olgunlaşma, yani budanma ile bu bölgeler artık kompanse etme yeteneğini yitirince esas bozulmuş bölgelerin etkisi ortaya çıkar ve hastalık semptomları kendini gösterir. Bu yüzden hastalığı oluşturan bozukluklar ile hastalığın ortaya çıkması arasında gecikme olduğu düşünülmektedir (86).

Bu derece çok bilinmeyen içeren ve tam tedavisi olmayan bu kompleks beyin hastalığının, beynin bütününe etkileyebilecek bir düzende ve kompleks halde olmasını ancak başlangıçta bir şeylerin ters gitmesi veya raydan çıkması sağlıyor olabilir.

2.1.8. Şizofreni Genetiği

Şizofreninin moleküler genetiği üzerine yayınlanan literatürler hızla çoğalırken, bu alanda yapılacak herhangi bir yorum da hızla eskiyecektir. Ancak, şizofreninin etiolojisinde belli genlerin potansiyel etkilerini kanıtlayarak bu ipuçlarını biriktirmek hastalığın bütününe anlamak için en etkin yol gibi gözüküyor. Bu kapsamda, şizofreni için aday genlerin belirlenmesi ve bu hastalık üzerine olası etkilerinin incelenmesi çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bu aday genlerden önemli bir kısmı şizofreni ile olan olası ilişkileri ile Tablo 4' de gösterilmiştir.

Tablo 4: Şizofrenide bazı aday genler hakkında bilgiler ve bunların şizofreni ile olan ilişkileri. [Wedenoja (87), 2010’ dan uyarlanmıştır]

Gen	OMIM	Lokus	Fonksiyon	Şizofreni Hastalığında		
				Biyolojik Yakınlık	Genetik İlişki	Değişmiş İfade
<i>MTHFR</i>	607093	1p36.3	Homosistein metabolizması; enzim	+	+++	?
<i>RGS4</i>	602516	1q23.3	G protein sinyali; regülatör	++	+++	-
<i>PLXNA2</i>	601054	1q32.2	MSS gelişimi; semaphorin reseptörü	+++	++	?
<i>DISC1</i>	605210	1q42.1	MSS gelişimi ve nöral plastisite; regülatör	+++	+++	?
<i>IL1B</i>	147720	2q14	İnflamatuvar yanıt; sitokin	++	++	?
<i>GADI</i>	605363	2q31	Glutamat metabolizması; enzim	+++	+++	-
<i>DLX1</i>	600029	2q31.1	MSS gelişimi; transkripsiyon faktörü	++	+	-
<i>ZNF804A</i>	612282	2q32.1	Çinko parmak protein	0	+	?
<i>ERBB4</i>	600543	2q33.3-q34	Neuregulin reseptörü	+++	+++	+
<i>DRD3</i>	126451	3q13.3	Dopamin reseptörü	+++	+++	(+)
<i>GABRB2</i>	600232	5q34	İnhibitör sinaptik aktarım; GABA A reseptör	+++	+++	(+/-)
<i>DRD1</i>	126449	5q34-q35	Dopamin reseptörü	+++	0	?
<i>DTNBP1</i>	607145	6p22.3	Dystrophin-ilişkili protein kompleks	+	+++	-
<i>SEMA3A</i>	603961	7q21.11	MSS gelişimi; inhibitör regülatör	+++	0	+
<i>GRM3</i>	601115	7q21.1-q21.2	Glutamat reseptörü	+++	+++	0
<i>RELN</i>	600514	7q22	MSS gelişimi ve nöral plastisite; uyarıcı regülatör	+++	++	-
<i>PPP3CC</i>	114107	8p21.3	Fosforilasyon; enzim	+++	+	(-)
<i>SLC18A1</i>	193002	8p21.3	Nörotransmitter taşıyıcı	++	++	?
<i>NRG1</i>	142445	8p21-p12	MSS gelişimi; uyarıcı regülatör	+++	+++	(+)
<i>DRD4</i>	126452	11p15.5	Dopamin reseptörü	+++	+++	?
<i>TPH1</i>	191060	11p15.3-p14	Serotonin biyo-sentezi; enzim	+++	+++	(+)
<i>DRD2</i>	126450	11q22-q23	Dopamin reseptörü	+++	+++	(+/-)
<i>OPCML</i>	600632	11q25	İmmünglobulin	0	+	?
<i>GRIN2B</i>	138252	12p12	Glutamat reseptörü	+++	+++	?
<i>DAO</i>	124050	12q24	Glutamat metabolizması; enzim	+++	++	(+)
<i>HTR2A</i>	182135	13q14-q21	Serotonin reseptörü	+++	+++	?
<i>DAOA</i>	607408	13q33.2	DAO aktivatörü	+	+++	?
<i>AKT1</i>	164730	14q32.32-q32.33	MSS gelişimi; nöron hayatta kalma regülatörü	+	+++	-
<i>CHRNA7</i>	118511	15q13.3	Kolinergik reseptör	++	+++	-
<i>RPGRIP1L</i>	610937	16q12.2	Sentrozom fonksiyonu	++	+	?
<i>HP</i>	140100	16q22.1	Hemoglobin bağlama	++	+++	+
<i>TP53</i>	191170	17p13.1	Hücre döngüsü regülasyonu; transkripsiyon faktörü	++	++	?
<i>APOE</i>	107741	19q13.31	Lipoprotein metabolizması; taşıyıcı	+++	+++	+
<i>PRODH</i>	606810	22q11.2	Prolin metabolizması; enzim	+	++	?
<i>DGCR2</i>	600594	22q11.21	Nöronal göç; adeziv reseptör	+++	++	+
<i>COMT</i>	116790	22q11.21	Katekolamin nörotransmitter inaktivasyonu; enzim	+++	+++	(+/-)

Biyolojik yakınlık: 0, yok; +, zayıf; ++, fikir verici; +++, güçlü.

Genetik ilişki: 0, yok; +, tek; ++, birkaç (≤ 3); +++, çoklu (> 3).

Değişmiş ifade: 0, yok; -, azalmış; +, artmış.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; ?, bilinmiyor.

Tablodan da anlaşılabacağı üzere şizofreni ile ilgisi olduğu kanıtlanmış çok sayıda gen nörogelişimsel süreci spesifik olarak etkiler ve düzenler. Allen ve ark. tarafından şizofreni ile ilişkili olabilecek genetik faktörler geniş çaplı bir meta-analiz çalışması ile irdelenmiş, ve bu çalışmadan elde edilen tüm önemli veriler ayrıntıları ile “<http://www.szgene.org/>” adresinde sunulmuştur (88).

2.2. Wnt sinyal yolağı

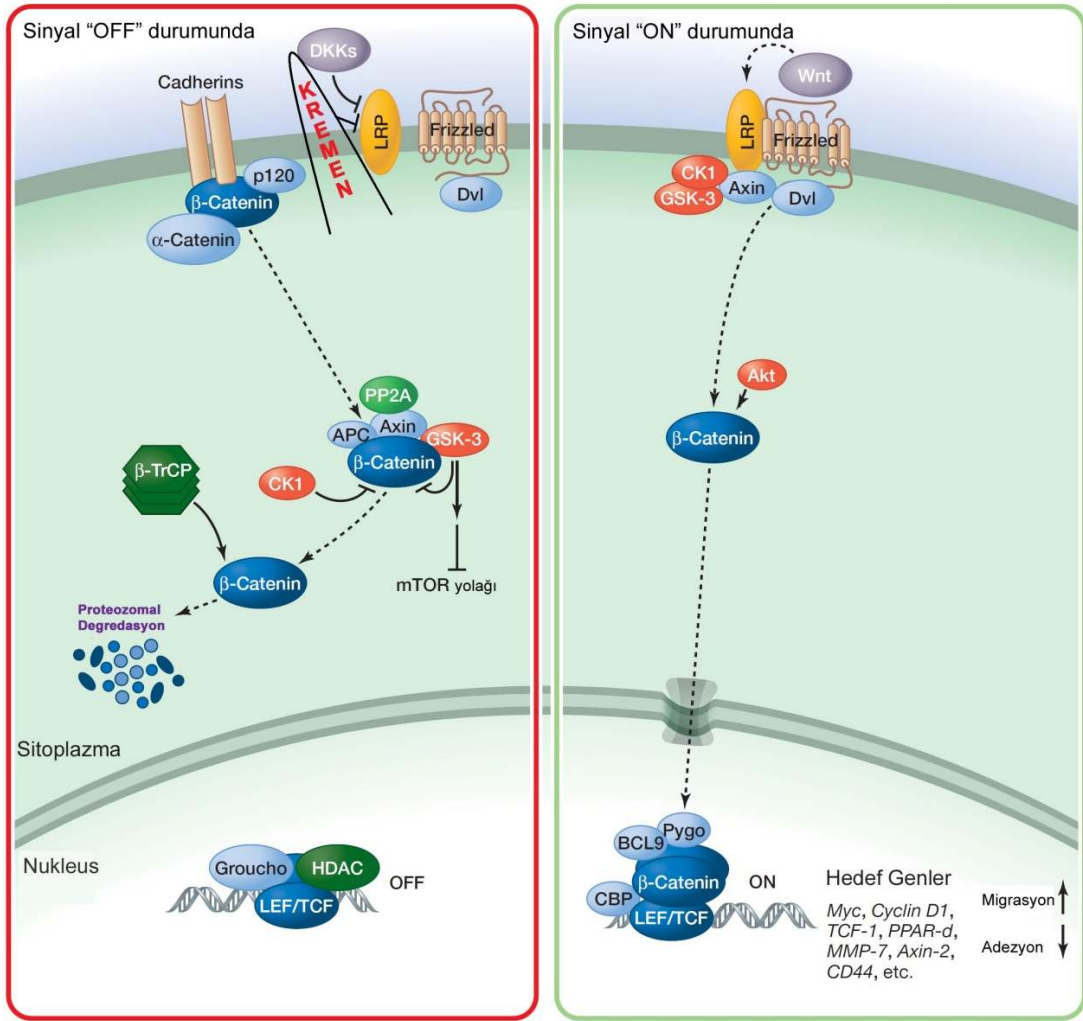
Tüm çok hücreli organizmalarda hücrelerin birbirleri ile iletişim halinde olmasını ve bu iletişim ile birlikte birtakım yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesini düzenleyen sinyal yolları vardır. Bu sinyal yollarından biri de Wnt sinyal yolağıdır ve hücre zarına bağlanarak sinyalin başlamasına esas öncülük eden faktör Wnt proteini olduğu için yolak bu isimle bilinmektedir.

Başlangıçta ismi Int-1 olan Wnt1 geni, ilk kez farenin tümörlü meme dokusundan klonlanmış bir gen olarak 1982 yılında tespit edilmiştir. Daha sonra, Int-1 geninin, *Drosophila* da larva gelişimi sırasında segment polarizasyonunu düzenleyen *Wingless* (*wg*) geni ile homolog olduğu gösterilince bu gen' e iki ismin bir karışımı olan Wnt1 ismi verilmiştir (89).

Wnt sinyal ileti kaskadı tüm hayvanların gelişim ve yetişkinlik hayatı boyunca sayısız biyolojik olayı kontrol eder. Dolayısıyla, anormal Wnt sinyal yolağı da insanlarda görülen çok sayıdaki patolojik tablonun altında yatan esas nedenler arasındadır (89). Şimdilik en az iki farklı Wnt sinyal yolağı mevcuttur. Bunlardan biri “*Canonical*” yani “Klasik” Wnt sinyal yolağı olarak bilinen Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır. Diğeri ise “*Non-canonical*” yani “Klasik olmayan” Wnt sinyal yolağıdır. *Non-canonical* Wnt sinyal yolağı bazı araştırmacılar tarafından “hücre polaritesinin sağlanmasında görev yapan Wnt sinyal yolağı [*Planar cell polarity pathway* (*PCP*)]” ve Wnt/Kalsiyum sinyal yolağı şeklinde iki farklı Wnt sinyal yolağı olarak da değerlendirilmektedir (89-93). Özellikle gelişimsel süreçte çok etkili olan ve hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptozisin düzenlenmesi, kök hücrelerin kendini yenilemesi, hücre-hücre adezyonunun sağlanması gibi birçok ciddi biyolojik süreçte Wnt/ β -katenin sinyal yolağı etkili olduğu için çalışmamıza bu yolak üzerinde durulacaktır (89-93).

2.2.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının İşleyişi

Wnt/ β -katenin yani Canonical Wnt sinyal yolağının işleyişinde çok sayıda faktör aktif olarak yer almaktadır. Aşağıdaki şekilde genel olarak Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının aktif -yani “*ON*”- ve inaktif -yani “*OFF*”- haldeyken nasıl bir işleyiş gösterdiği vurgulanmaktadır (Şekil 4) (93).



Şekil 4: Wnt/β-katenin sinyal mekanizması [Nusse (93), Wnt Signaling, 2012' den değiştirilerek].

Hücre zarında başlayan Wnt/β-katenin sinyal mekanizmasının amacı çekirdekte bulunan transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirerek hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre göçü, migrasyonu ve adezyonu gibi önemli biyolojik süreçlerin gerçekleşmesini sağlamaktır.

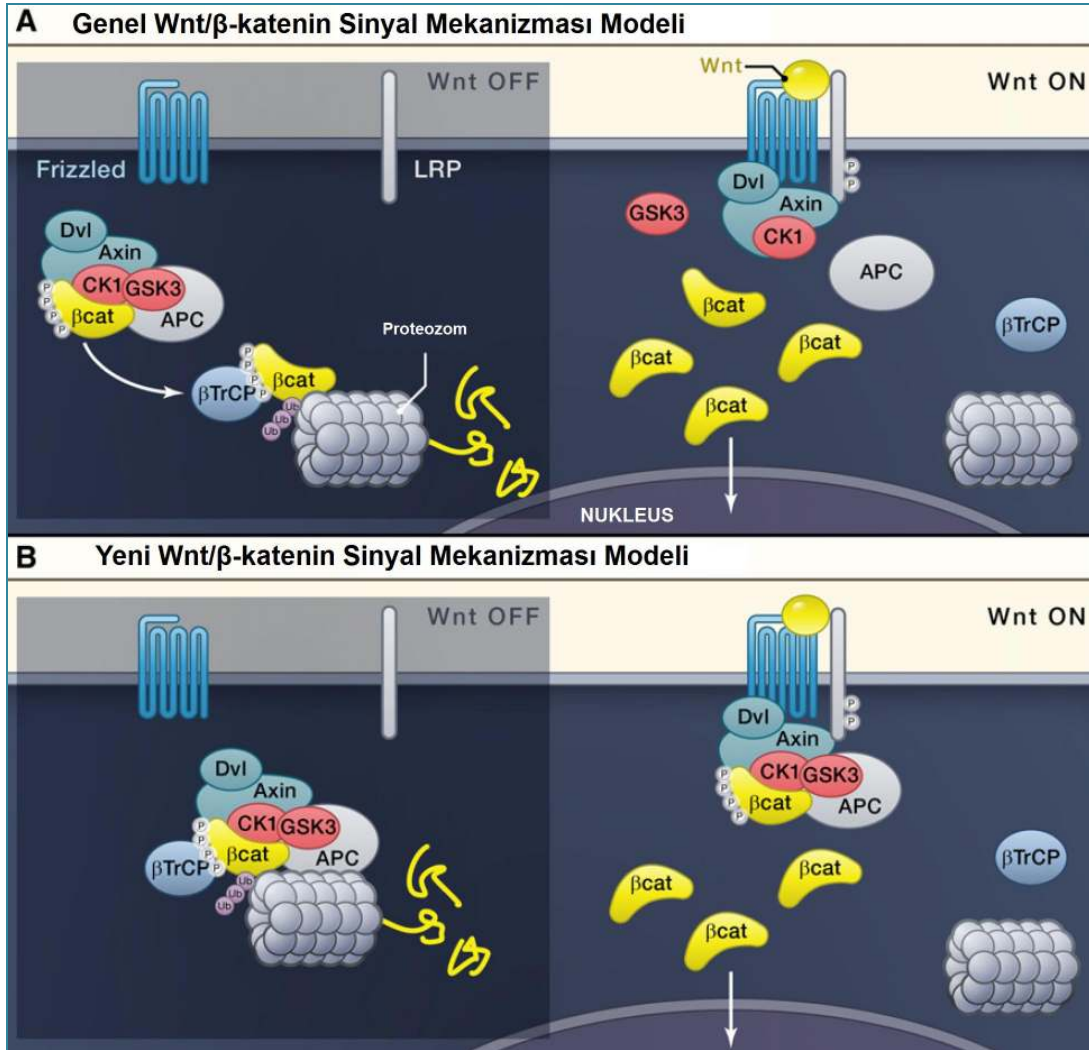
Wnt/β-katenin sinyal mekanizması Wnt proteinin hedef hücrelere ulaşarak burada bulunan reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Ancak henüz bu aşamada bile çok sayıda negatif kontrol ya da regülasyon basamağı vardır. Eğer hücre Wnt proteinine maruz kalmaz ise (Şekil 4, sol), reseptörleri ve β-katenin proteinini içeren esas sinyal komponentleri "OFF" yani inaktif durumda tutulurlar. Bu da sinyalin, ya da β-katenin' in çekirdeğe ulaşmaması ve dolayısıyla transkripsiyonun aktive edilmemesi anlamına gelir. Hücrenin Wnt proteinine maruz kalması ise (Şekil 4, sağ) tüm bu kompleksleri "ON" yani aktif hale getirir.

İnaktif durumda, β -katenin seviyesi protein kinaz GSK-3b ve CK1, APC, ve Axin proteinlerinin onunla etkileşimi sayesinde hızla azalır. Bu azalma, β -katenin' in GSK-3 ve CK1 tarafından ubiquitin yolağındaki β -TrCP tarafından fosforilasyonu ile parçalanmasından kaynaklanmaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının aktif hale gelmesi için ise, negatif regülatörlerden bağımsız şekilde Wnt proteinin hücre zarındaki LRP ve Frizzled proteinleri ile bir araya gelmesi gerekmektedir. LRP, Frizzled ve Wnt üçlüsü bir araya gelince LRP' nin hücre içinde bulunan ucunda konformasyonel bir değişim olur ve bu uç sitozolde serbest bulunan CK1 enzimi ve Dishevelled (Dvl)' in regülasyonu ile fosforillenir. Bu fosforillenme de yıkıcı kompleksi bir arada tutan Axin proteinin şiddetle hücre zarına yönelmesine neden olur. Bu yönlenece GSK-3 de katılarak Dvl, axin ve GSK-3 üçlüsü hücre zarındaki reseptörlerde hızla bir araya gelir. Böylece yıkıcı kompleks hücre zarına bağlı bulunduğundan, artık GSK-3 sitozolde β -katenin' i fosforilleyemez, böylece fosforillenmemiş β -katenin β -TrCP tarafından ubiquitin aracılıklı parçalanamaz ve β -katenin seviyesi hızla artar. Aktif ve sayısı artmış haldeki β -katenin proteinleri transkripsiyon faktörlerini aktif hale geçirmek için hızla çekirdeğe geçerler. Böylece, nihayet Wnt sinyali β -katenin ile çekirdeğe ulaşmış olur ve TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ile etkileşime geçerek onları aktif hale getirir. Çekirdekte Wnt sinyali yok iken Wnt hedef genleri için baskılayıcı görev üstlenen TCF/LEF transkripsiyon faktörleri, artık β -katenin sayesinde bu genleri serbest bırakarak transkripsiyon için bir aktivatör halini alır. Çok sayıda Wnt hedef geni mevcut olmasına rağmen bunların çoğu hücre tipine spesifiktir (89-94).

2.2.2. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının İşleyişi İçin Yeni Bir Model

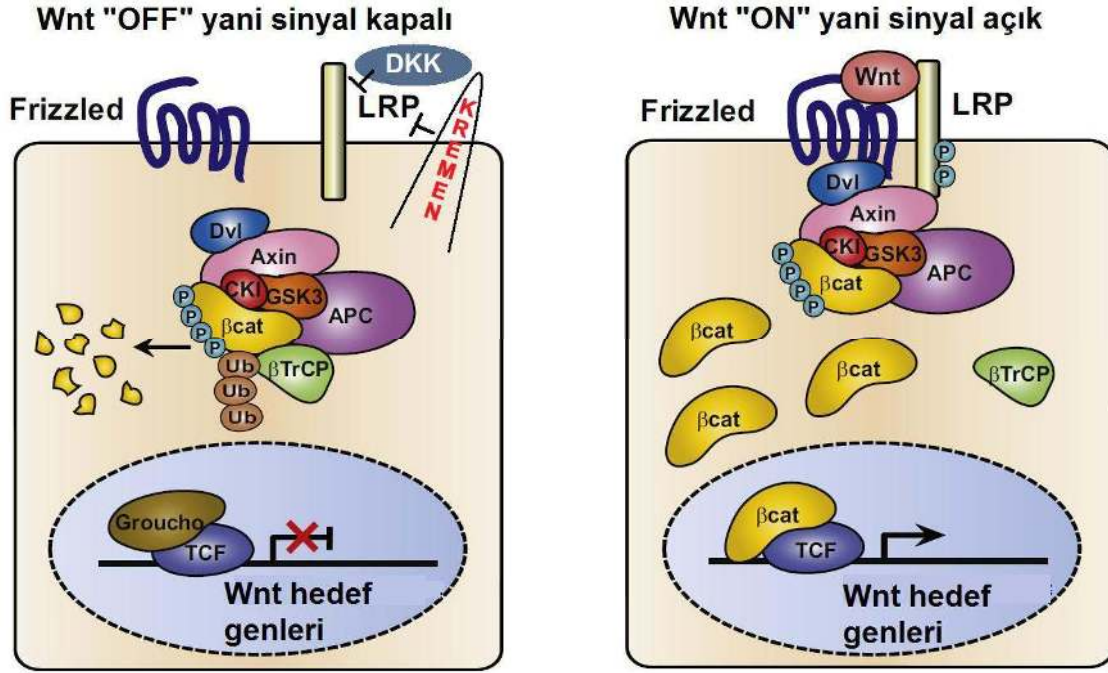
Li ve ark. tarafından Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının işleyişine dair henüz çok yeni bir model ortaya koyulmuştur (94). Bu modelin mevcut modelden bir takım farklılıkları bulunmaktadır. Yeni model endojen yıkım kompleksi komponentleri üzerine yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Önceki modelde, sinyal “OFF” durumundayken, β -katenin yıkıcı komplekse bağlanıp, fosforillenip, sonrada bu kompleksten ayrılarak β -TrCP aracılıklı ubiquitinlenerek proteozomda parçalanırken (Şekil 5A), yeni model yıkıcı komplekse β -TrCP'nin ve proteozomun aynı anda eşlik ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 5B). Yani yeni modelde, sinyal “OFF” durumundayken tek basamakta β -katenin parçalanır. Ayrıca sinyal “ON” durumundayken ise –yani Wnt ile uyarılmışken- önceki model yıkıcı kompleksin (Dvl, Axin, CK1) LRP ve Frizzled' e bağlandığında β -katenin' in bu komplekse dahil olmadığını ve serbest kaldığını söylerken (Şekil 5A), yeni model yıkıcı kompleks proteinlerinin zardaki bu

proteinler ile bir araya geldiğinde β -katenin' in de dahil edildiğini, ayrıca yine GSK aracılıklı fosforilasyonun olduğunu, fakat bu β -kateninli komplekse bu sefer β -TrCP aracılıklı ubiquitinasyonun yapılamadığını ortaya koymuştur (Şekil 5b). Ancak bunun sonucunda yeni sentezlenen β -katenin' in sitozolde birikerek çekirdeğe ulaştığı ortaya koyulmuştur (Şekil 5, A ve B) (89,94).



Şekil 5: Genel (A) ve yeni (B) Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması modelleri. [Hans Clevers (89), 2012' den uyarlanmıştır]

Sonuç olarak aşağıdaki şekilde de ayrıntılarıyla sunulmuş yeni Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının işleyişi ile nukleus' a ulaşan β -katenin' ler sayesinde Wnt hedef genlerinin ekspresyonu sağlanmış olur (Şekil 6).



Şekil 6: Yeni Wnt/β-katenin sinyal mekanizması modeli ile Wnt hedef genlerinin ekspresyonları [Vivian S.W. Li (94), 2012' den değiştirilerek]

2.2.3. Wnt/β-katenin Sinyal Mekanizması ve Şizofreni İlişkisi

Geçtiğimiz bölümlerde ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi şizofreninin nörogelişimsel bir orijini vardır ve bu nörogelişimsel süreci gen ekspresyonundaki değişiklikleriyle Wnt sinyal yolağı düzenler (90-92,95). Wnt sinyal yolağının anahtar bileşenlerinden biri GSK-3 enzimidir (96, 97) ve şizofreni hastalarının post-mortem prefrontal korteksinde GSK-3β mRNA seviyesi %36, GSK-3β protein seviyesi %41 ve GSK-3 aktivitesi de %45 oranında düşmektedir (98-100). Aynı zamanda şizofreni hastalarının post-mortem hipokampusunda Wnt sinyal yolağının önemli bileşenlerinden olan sitoplazmik β ve γ-katenin seviyesi düşmekte (95) ve Wnt-1' in ekspresyonu artmaktadır (101). Son olarak da şizofrenide antipsikotikler ve psikomimetikler direk Wnt sinyal yolağını etkilerler (61,102).

Sonuç olarak, yukarıda anlatıldığı gibi şizofreni ile Wnt/β-katenin sinyal mekanizması arasında bir ilişki vardır. Bu yüzden son yıllarda şizofreni ile ilgili yapılan araştırmalarda Wnt/β-katenin sinyal mekanizması üzerinde daha çok durulmaktadır. Diğer taraftan, doğal Wnt sinyali negatif regülatörleri de direk bu mekanizmayı etkileyip düzenledikleri için oldukça önemlidirler.

2.2.4. Doğal Wnt Sinyali Negatif Regülatörleri

Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivasyonunun kontrol altına alınması hayati önem taşımaktadır. Sinyal yolağının kontrollü biçimde inhibe edilmesi bazı özel antagonist

proteinler tarafından sağlanmaktadır. Bu proteinler kimi zaman Wnt reseptörlerine, kimi zaman direk Wnt proteinine, kimi zaman da diğer Wnt sinyal inhibitörleri ne bağlanarak onlar ile kombine çalışıp sinyalin negatif regülasyonunu sağlarlar (89). Örneğin bunlar arasından sFRPs (secreted Frizzled-related proteins) ve WIF (Wnt İnhibitör Faktörü) direk Wnt proteinlerine bağlanarak onların reseptörleri (LRP, Frizzled gibi) ile etkileşime geçmelerini engellerler (103). Böylece sinyal başlayamaz. Ayrıca DKK (Dickkopf) ve WISE/SOST ailesi proteinleri de önemli diğer Wnt sinyal inhibitörü proteinlerdendir. Bunlar ise LRP5/6' ya bağlanarak Wnt sinyalinin başlamasını engelleyen antagonistlerdendir (89). Son zamanlarda yapılan bazı genetik ve biyokimyasal çalışmalar bu antagonistlerin Frizzled-LRP birleşmesini engellediğinden sinyal iletiminin oluşmadığını ortaya koymaktadır (104). Ayrıca membrana bağlı bir glikoprotein olan APCDD1 ise hem Wnt' e hem de LRP ye bağlanarak Wnt sinyalini engelleyebilir (89). Kimi antagonistler de diğerleri ile birlikte Wnt sinyalini inhibe ederler. Buna önemli bir örnek KREMEN (kringle containing transmembrane protein)' dir. KREMEN proteini aslında LRP' nin hücre zarına konumlanmasını sağlayan, yani Wnt sinyalini pozitif yönde regüle etmeye çalışan önemli bir proteindir. Ancak KREMEN, DKK ya bağlanıp da KREMEN+DKK+LRP üçlüsü oluşursa bu proteinlerin hücre içerisine alınması (internalizasyon) sağlar ve artık Wnt' in bağlanabileceği reseptörler hücre zarında kalmadığından Wnt sinyali negatif regüle edilmiş olur. Yani KREMEN Wnt sinyalini hem negatif hem de pozitif regüle edebilen süper önemli bir proteindir (91,105-108). KREMEN Protein 1' in Wnt sinyali üzerine olan etki mekanizmasına ilerleyen kısımlarda ayrıca değinilecektir.

Yukarıda sayılan önemli antagonistler üzerinde oluşabilecek mutasyonlar ya da genetik değişiklikler bazı önemli gelişimsel bozukluklara yol açmaktadır (89). Biz çalışmalarımızda özellikle yukarıda bahsettiğimiz ve daha sonra da ayrıntılı anlatılacak olan nedenlerden ötürü oldukça önemli olan KREMEN proteini üzerine odaklandık.

2.2.4.1 KREMEN1 Geni

KREMEN geni ile ilgili ilk araştırma 2001 yılında Nakamura ve ark. tarafından yapılmıştır (109). Araştırmacılar bu genin kodladığı proteinin karakteristik yapısını çözmek için aminoasit dizilerini farklı proteinlerinki ile *alignment* (aynı hizaya getirmek) ettiklerinde KREMEN proteinin bir “kringle” domain' i -proteinlerdeki kringle domain' nin üç boyutlu yapısal şekli bir İskandinav böreği olan *Kringle* ye benzediği için bu ismi almış- içerdiğini keşfetmişlerdir. Ayrıca doku ve hücrelerin gelişimsel süreçte bu proteini ne yoğunlukta ifade

ettiklerini anlamak için de ekspresyon çalışmaları yapmışlar, özellikle KREMEN ekspresyonun embriyonik gelişim aşamasında ve nöron farklılaşması ve olgunlaşması sırasında aşırı arttığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte embriyonik gelişim sürecinde KREMEN’ in temporal ve uzaysal ekspresyon paternlerini de incelediklerinde, embriyo da özellikle yüz ile ilgili kısımlarda (göz ve burun bölgesinde) aşırı ekspresyon işareti dikkat çekmiştir. Nakamura ve ark. yukarıda sayılan özelliklerden dolayı bu gen’ e ve kodladığı proteine KREMEN (**K**ringe-coding gene **m**arking the **e**ye and the **n**ose) ismini vermişlerdir (109). Günümüzde genin geçerli ismi *Kringle Containing Transmembrane Protein* olup, sembolü KREMEN, sinonimi ise KRM’ dir (110,111).

KREMEN gen ailesinin şimdilik bilinen iki üyesi vardır; KREMEN1 ve KREMEN2 [sırasıyla HGNC ID (111) : 17550 ve 18797, sırasıyla NCBI Gene ID(112) : 83999 ve 79412, sırasıyla Ensembl Gene ID (113): ENSG00000183762 ve ENSG00000131650]. Ayrıca araştırmacılar vertebratlar dışında *Amphioxus (Branchiostoma belcheri)* gibi canlılarda KREMEN4 ve KREMEN benzeri genlerin varlığını ortaya koymalarına rağmen, bu konuda henüz yeteri kadar veri yoktur (114). İnsanda KREMEN1 22q12.1 de [sekans: kromozom 22; NC_000022.10 (29469066..29564321)] lokalize olmuşken, KREMEN2 16p13.3 de [sekans: kromozom 16, NC_000016.9 (3014217..3018384)] lokalizedir (110). Biz çalışmamızda özellikle KREMEN1 geni ile çalışmayı tercih ettik. Çünkü şizofreni için yapılmış olan bir genetik bağlantı analizi çalışmasında KREMEN1 genini de içeren 22q12-q13.1 bölgesinin bu hastalığa yatkınlık için önemli olduğu vurgulanmıştır (115). Ayrıca fare embriyosu gelişimsel sürecinde iki KREMEN geninin ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada, KREMEN2 ye göre KREMEN1 geninin beyin ve nöron gelişimi ile ilgili aşamalarda daha ön planda olduğu gösterilmiştir (116). Son olarak da, Japon popülasyonunda yapılmış bir genetik ilişki çalışmasında KREMEN1 genindeki ‘rs713526’ (117) varyasyonunun şizofreni riskini modüle edebileceği rapor edilmiştir (118).

KREMEN1 geninin şimdilik bilinen yedi adet transkript’ i vardır. Bunlardan dördü protein kodlar, biri muhtemelen bir anlamsız yani “nonsense” mutasyon ilişkili olarak stop kodonu ile transkripsiyonu kısa kalmış, diğeri açık okuma çerçevesi yani “open reading frame (ORF)” içermeyip dolayısıyla kodlanmayarak transkript’ i yönlendiren, sonuncusu da intronik sekans içeren kodlanmayan transkript’ dir (Tablo 5) (113).

Tablo 5: KREMEN1 geninin transkriptleri ve özellikleri.

İsim	Transkript ID	Ekzon	Uzunluk (bp)	Protein ID	Uzunluk (aa)	Biyotip
KREMEN1-002	ENST00000327813	10	2719	ENSP00000331242	492	Protein kodlar
KREMEN1-003	ENST00000400335	9	6138	ENSP00000383189	458	Protein kodlar
KREMEN1-004	ENST00000407188	9	1422	ENSP00000385431	473	Protein kodlar
KREMEN1-201	ENST00000400338	9	6182	ENSP00000383192	475	Protein kodlar
KREMEN1-005	ENST00000453585	4	516	ENSP00000388228	82	Nonsense ilişkili çöküş
KREMEN1-007	ENST00000479755	2	503	Protein ürünü yok	-	Transkript' i yönlendirir
KREMEN1-006	ENST00000474001	3	572	Protein ürünü yok	-	Kodlanmayan transkript

2.2.4.2. KREMEN Protein 1

Yukarıdaki tabloda da değinildiği gibi KREMEN1 geninin farklı transkriptlerinin birbirinden farklı aminoasit dizilimleri ve uzunluklarına sahip protein ürünleri tanımlanmıştır. Hatta bu proteinlerin çeşitli izoformları da mevcuttur. İnsanlarda KREMEN1 geninin en iyi tanımlanmış ve yaygın görülen protein ürünü olan KREMEN Protein 1 diğer isimleriyle “*Kringle domain-containing transmembrane protein 1*” ya da *kringle containing transmembrane protein 1*” 473 AA lik sekans uzunluğuna sahiptir (UniProt/Swiss-Prot: Q96MU8) (119). KREMEN Protein 1’ in üç adet izoformu iyi tanımlanmıştır (UniProt/Swiss-Prot: Q96MU8-1, Q96MU8-2 ve Q96MU8-3). Bunlardan özellikle İzofom 1 “*Canonical*” yani “Klasik” olandır ve diğerlerinin sekansları bundan küçük farklılıklara sahiptir. KREMEN Protein 1 üç adet domain içerir. Proteinin isminden de anlaşılacağı gibi en önemli özelliği bir Kringle domain’ i içermesidir. Diğer domainler WSC ve CUB domainleridir (119). Bu üç domain proteinin diğer proteinlere bağlanmasında çok önemliyken, özellikle kringle domaininin membran fosfolipitleri ve proteoglikanlar gibi mediyatörlere bağlanmada çok önemli rol üstlendiği düşünülmektedir (116). Aşağıda KREMEN Protein 1’ in aminoasit sekansı ve domainleri gösterilmiştir (Tablo 6) (119).

Tablo 6: KREMEN Protein 1 aminoasit sekansı ve domainleri.

10	20	30	40	50	60
MAPPAARLAL	LSAAALTLAA	RPAPSPGLGP	ECFTANGADY	RGTQNWTALQ	GGKPCLFWNE
70	80	90	100	110	120
TFQHPYNTLK	YPNGEGGLGE	HNYCRNPDGD	VSPWCYVAEH	EDGVYWKYCE	IPACQMPGNI
130	140	150	160	170	180
GCKYKDHGNEP	PLTGTSKTSN	KLTIQTCISF	CRSQRFKFAG	MESGYACFCG	NNPDYWKYGE
190	200	210	220	230	240
AASTECSNVC	FGDHTQPCGG	DGRIILFDTL	VGACGGNYSA	MSSVVYSPDF	PDTYATGRVC
250	260	270	280	290	300
YWTIRVPGAS	HIHFSFPLFD	IRDSADMVEL	LDGYTHRVL	RFHGRSRPPL	SFNVSLDFVI
310	320	330	340	350	360
LYFFSDRINQ	AQGFAVLYQA	VKEELPQERP	AVNQTVAEVI	TEQANLSVSA	ARSSKVLYVI
370	380	390	400	410	420
TTSPSHPPQT	VPGSNSWAPP	MGAGSHRVEG	WTVYGLATLL	ILTVTAIVAK	ILLHVTFKSH
430	440	450	460	470	
RVPASGDLRD	CHQPGTSGEI	WSIFYKPSTS	ISIFKKKLKG	QSQQDDRNPL	VSD

Domain	Pozisyon	Uzunluk	Grafiksel Görünüş
Kringle	31 - 114	84 aa	
WSC	116 - 210	95 aa	
CUB	214 - 321	108 aa	

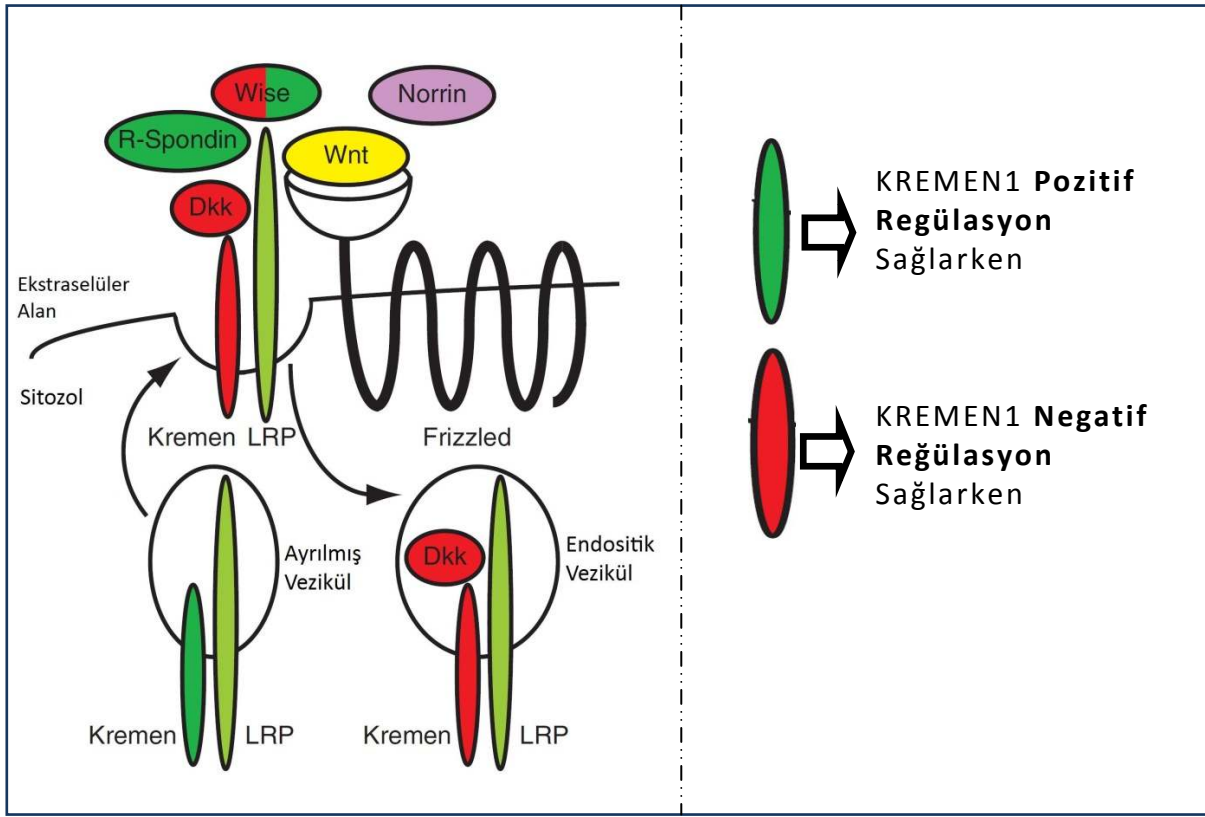
>sp|Q96MU8|KREM1_HUMAN Kremen protein 1 OS=Homo sapiens GN=KREMEN1

2.2.5. KREMEN Protein 1' in Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağındaki İşleyişi

Önceleri KREMEN ailesi proteinlerin yalnızca Wnt sinyalini negatif regüle ettikleri düşünülmekteydi. Ancak en son yapılan araştırmalar KREMEN proteinlerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerine çok yönlü etkilerini gözler önüne sermiştir.

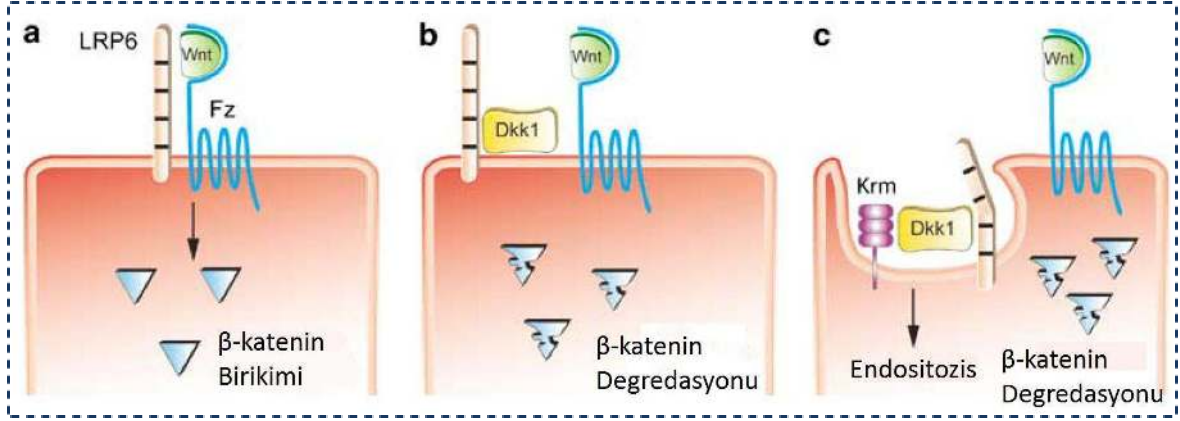
Son yapılan araştırmalar, KREMEN Protein 1' in LRP' nin hücre zarında konumlanmasını sağladığını, yani bu özelliği ile Wnt sinyalini pozitif yönde de regüle edebildiğini ortaya koymuştur (105). Ancak KREMEN Protein 1 reseptörü, DKK ve LRP ile üçlü bir kompleks oluşturacak olursa bu kompleks internalizasyon ile hücre içerisine alınarak burada LRP' nin degradasyonu sağlanır. Bu durum da sinyalin tamamen engellenmesinin yanı sıra, ileride DKK ortamda olmasa bile zarda sinyalin oluşamamasına neden olur (çünkü artık zarda sinyalin ana elemanlarından olan LRP olmadığından). DKK proteini de LRP ye bağlanarak sinyali tek başına durdurabilir ancak DKK konsantrasyonu azaldığında LRP reseptörleri açık kalacağından Wnt sinyali ilerlemeye devam eder. Burada bir ilginç konu da tek başına DKK' nın LRP degradasyonuna engel olmasıdır. Yani DKK' nın tek başına LRP ye bağlanması sinyali negatif regüle eder ancak aynı zamanda LRP' nin degradasyonunu da engelleyip, onun

stabil halde kalmasına neden olur. Yani KREMEN Protein 1 ortamda olmaz ise sinyal sadece bir süreliğine durdurulmuş olur, DKK konsantrasyonu azaldığında ya da DKK, LRP reseptöründen uzaklaşır uzaklaşmaz sinyal son sürat işlemeye devam eder. İşte, sinyalin geri dönüşümsüz olarak LRP degradasyonu ile durdurulması için KREMEN Protein 1 aracılıklı internalizasyon şarttır (91, 105-108). Aşağıdaki şekilde KREMEN Protein 1' in Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerine olan bu iyi yönlü etkisi gösterilmektedir. Buradaki en önemli konu, DKK ve KREMEN birlikteliğinin yalnızca sinyali durdurmakla kalmayıp endositoz ile LRP yi hücre içine aldıkları için sinyalin geri dönüşümsüz olarak engellenmesidir (Şekil 7) (91).



Şekil 7: LRP' nin KREMEN Protein 1 aracılıklı bifazik etkisi ile Wnt/ β -katenin sinyalinin regülasyonu. [Renée van Amerongen (91), 2010' dan uyarlanmıştır]. LRP' nin KREMEN Protein 1 sayesinde zarfa konumlanması (*pozitif regülasyon*) ve DKK var ise yine KREMEN Protein 1 ile LRP' nin internalizasyonu (*negatif regülasyon*).

Aşağıdaki şekilde de DKK ve KREMEN protein 1' in Wnt/ β -katenin sinyal yolağının işleyişi üzerine etkileri direk olarak vurgulanmıştır (Şekil 8) (106).



Şekil 8: DKK ve KREMEN protein 1' in Wnt/β-katenin sinyal yolağına olan etkileri. [C. Niehrs (106), 2006' dan değiştirilerek] **a**, normal durumda sinyal “ON” yani aktif durumdayken; **b**, yalnızca DKK ile sinyalin negatif regülasyonu; **c**, KREMEN ve DKK ile LRP' nin degradasyonu ile sinyalin geri dönüşümsüz olarak negatif regülasyonu.

Özet olarak Wnt/β-katenin sinyalini bir köprüden (LRP gibi) geçecekmiş gibi düşünürsek, DKK bu köprüye açılan kapıyı kapatmış bir asker iken, KREMEN Protein 1 ancak bu askerlerin varlığında köprüyü tamamen yıkabilecek diğer farklı askerlerdendir (ancak normalde DKK yok iken köprü yapımına yardımcı olan askerlerden). Yani KREMEN Protein 1 bifazik (iki fazlı) olarak çalışabilmektedir ve bu yüzden çok önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yaptığımız araştırma deneysel niteliktedir. Örneklem bakımından kontrollü randomize bir çalışma yapılmış olup, disiplinler arası bir araştırma olarak da değerlendirilebilir. Araştırmamız tek merkezli yürütülmüştür.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmamızın DNA dizi analizi ve PCR için primer (oligonükleotid) sentezi hizmet alımı şeklinde bir firmada yapılmıştır. Diğer tüm çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 07.04.2011 ila 07.06.2012 tarihleri arasında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Yaptığımız araştırmanın hasta grubunu Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Psikiyatri polikliniği ve psikiyatri servisine başvuran DSM-IV (27) tanı kriterlerine göre şizofreni tanısı konmuş toplam 104 hasta oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise kendisinde veya ailesinde herhangi bir nöropsikiyatrik hastalığı olmayan, daha önce psikiyatri tedavisi görmemiş ve halen herhangi ruhsal bir hastalığı olmayan 51 kişiden oluşmuş "sağlıklı bireyler" oluşturmaktadır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Hasta grubundakilerin DSM-IV(27) tanı kriterlerini karşılaması
- Yazılı bilgilendirilmiş olur verebilme
- 18-55 yaş arası
- Okur-yazar olmak

Dışlama kriterleri:

- Çalışmaya dahil edilme kriterlerini taşımamak
- Kontrol grubundaki kişilerde herhangi psikiyatrik hastalık geçmişi olması
- Olgu grubundaki bireylerin son 6 ay içinde EKT uygulaması almış olması
- Kontrol ve olgu grubundaki kişilerde nörolojik hastalık bulunması

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan materyali hasta ve kontrol grubundaki kişilerin antekübital veninden EDTA'lı tüplere alınmış 2 ml'lik periferik kan örneği oluşturmuştur. Kanlar Dokuz

Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalında alınmış ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda -20 °C de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Çalışmamızda 104 adet hasta kan örneği ve 51 adet de kontrol grubu kişilerden alınmış kan örneği kullanılmıştır. Çalışmamızda örnekleri kayıt altına alırken onlara sırasıyla rakamlar verdik yani numaralandırdık. Örneğin çalışmamıza ilk dahil ettiğimiz örneğe “1”, ikinci dahil ettiğimiz örneğe de “2” şeklinde isimler verip her bir örneğin verilerini (örn. hasta ya da kontrol örneği olup olmadığı, örneklere ait kişilerin demografik verileri vb.) bir Excel dosyasına girerek topladık. Ayrıca bu örneklere ait bulgularımızı da aynı dosyaya ekledik. Karışıklık yaşanmaması için örnek kaç numara ise aynı şekilde izole ettiğimiz genomik DNA' sına ve sekansa gönderdiğimiz PCR ürününe de hep aynı ismi verdik.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmamızın bağımlı değişkeni şizofreni hastalığıdır, bağımsız değişkeni analizini yaptığımız varyasyonlar, kontrol değişkenler ise genotiplerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar

Aşağıda araştırmamız sırasında kullanılmış olan makine ve teçhizatların ayrıntılı listesi bulunmaktadır (Tablo 7).

Tablo 7: Araştırmamızda kullanılan makine – teçhizat listesi

Adı/Modeli	Araştırmada Kullanım Amacı
Thermal Cyler/Techne, TC-3000G	Hedef DNA bölgesinin amplifikasyonu için
Soğutmalı Santrifüj/Eppendorf, Centrifuge 5417R	DNA izolasyonu için
Mikro Santrifüj/Eppendorf, MiniSpin	DNA izolasyonu için
Biyogüvenlik Kabineti/Holtan, HBB 2448	Primerlerin sulandırılmasında steril ortam sağlamak için
Mikrodalga Fırın/Arçelik	Agaroz jel hazırlamak için
Su Banyosu/Grant, LTD6G	DNA izolasyonu için
Buz Dolabı (-20 °C - +4 °C)/Arçelik	Numune ve kimyasalların saklanması için
Jel Elektroforez Sistemi/Thermo, EasyCast B1	Agaroz jel elektroforezi için
Elektroforez Güç Kaynağı/Thermo, EC 300 XL	Agaroz jel elektroforezi için
Elektronik Hassas Terazisi/Precisa, 205 A SCS	Agaroz ve kimyasalların hassas tartımı için
Distile Su Cihazı/Nüve, NS 108	Tamponlarda kullanılacak distile suyu elde etmek için
Mikro-pipet Seti/Eppendorf	Küçük hacimdeki solüsyonlar ile çalışırken
Jel Görüntüleme Sistemi/Vilber, Lourmat	Jeldeki DNA moleküllerini görüntülemek için
UV Transluminatör/Hoefer, UV-25	Jeldeki DNA moleküllerini görebilmek için
Hız Ayarlı Vortex/Labnet	DNA izolasyonu ve PCR işlemlerinde kullanmak için
Spektrofotometre/Pharmacia, Biotech	Genomik DNA'nın miktar, saflığını hesaplamak için
Otoklav/Hirayama, HV-85	Pipet vb. malzemelerin sterilizasyonu için
Etüv/Sanyo, Gallenkamp	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Aşağıda araştırmamız sırasında kullanılmış olan sarf malzemelerin ve diğer gereçlerin ayrıntılı listesi bulunmaktadır (Tablo 8).

Tablo 8: Kullanılan sarf malzemeler ve diğer tüm gereçler.

Maddenin Adı	Özellği	Markası	Kat. Num.
DNA izolasyonu, PCR ve Restriksiyon Enzim Kesimi için kullanılan kimyasallar			
Kandan DNA izolasyon kiti (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood)	Kitin içerdği solüsyonlar: Red Blood Cell Lysis Buffer, White Blood Cell Lysis Buffer, Protein Precipitation Solution	ROCHE	11667327-001
TE Buffer	1X kons., PH 8.0, 500 ml	AppliChem	A0386,0500
Saf Etanol	% 99.8, 2.5 L	AppliChem	L,A3678,2400
Taq DNA Polimeraz, 5U/μl, 500 U	Kendi 10 mM MgCl ₂ Buffer' ı ve MgCl ₂ içermeyen 10X PCR Buffer' ı var	ABM™ (Applied Biological Materials Inc.)	G008-1
dNTP Mix	Toplam 10 mM	Bioline	BIO-39044
Bir adet primer (oligonükleotid) çifti: KREMEN1 Forward ve KREMEN1 Reverse	Hizmet Alımı Şeklinde Sentezlettirilmiştir	Metabion	Sipariş ID'si: 110413- 033
Ultra Saf Su	RNase ve DNase- Free, 100 ml, Steril	Biological Industries	01-866-1B
Jel Elektrofrez için kullanılan kimyasallar			
Agaroz	Low EEO	AppliChem	A2114, 0100
TBE-Buffer	10X kons., 1 L	AppliChem	A3945, 1000
Ethidium bromide solüsyonu	10 mg/mL-H ₂ O,10 ml	SİGMA	E1510
Loading Dye solüsyonu	6X kons.	Fermentas	R0611
50 bp DNA Marker	100 uygulama	Fermentas	SM0371
100 bp DNA Marker	100 uygulama	Fermentas	SM0241
100 bp Sharp DNA Marker	50 μg/500μL	RBC	181736
Kullanılan diğer tek kullanımlık sarf malzemeler			
12 ml lik TC-TÜP	DNase/RNase Yok, Pirojenik Değil, Steril	GREİNER	164160
15 ml lik PP-TEST TÜPÜ	DNase/RNase Yok, Pirojenik Değil, Steril	GREİNER	188271
50 ml lik PP-TEST TÜPÜ	Pirojenik Değil, Steril	GREİNER	5340125
EDTA' ılı Tüp	Hemogram Tüpü	Vacurette	454223
1.5 ml lik Eppendorf	Steril	GREİNER	623201
PCR Tüpü, 0.2 ml	Düz Kapaklı, Steril, DNase/RNase Yok	NEPTUNE	3423.S
1000 μL lik Filtreli Pipet	Steril, DNase/RNase Yok	GREİNER	740288
200 μL lik Filtreli Pipet	Steril, DNase/RNase Yok	GREİNER	739288
100 μL lik Filtreli Pipet	Steril, DNase/RNase Yok	GREİNER	772288
10 μL lik Filtreli Pipet	Steril, DNase/RNase Yok	GREİNER	771288
10 ml lik Serolojik Pipet	Polisitren, Steril, Pirojenik Değil	FALCON	357551
Kurutma Kâğıdı	400X400 mm	MUNKTELL	2475400400
Pudrasız Lateks Muayene Eldiveni	Steril Değil	VARİMED	011099007130
Parafilm	4 IN. X 125 FT	PARAFİLM	PM-996
Otoklav Bandı	Kırmızı Çizgili	SUSSEX	Yok

3.6.3. Araştırmamız Kapsamında Hizmet Alımı

Araştırmamızda PCR ile hedef DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan Primer çiftleri tarafımızdan dizayn edilip hizmet alımı şeklinde bir firmaya (Metabion, Martinsried/Deutschland) sentezlettirildi. Ayrıca PCR ile amplifiye ettiğimiz hedef DNA bölgemizin DNA dizi analizi de hizmet alımı şeklinde bir firmadan (Macrogen, Inc.) sağlanmıştır.

3.6.4. Uygulanan Yöntemler

3.6.4.1. Kan Örneklerinin Analizlere Hazırlanması

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin kan örnekleri -20 °C’ de saklandığından, çalışmaya başlamadan önce kanlar iyice çözüldü ve birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilerek analize hazır hale getirildi.

3.6.4.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Kandan DNA izolasyonu ticari bir kit (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche, Germany) kullanarak, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapıldı (120). Araştırmamızda gerek maliyeti düşürmek için, gerekse bize daha az miktarda genomik DNA yeterli olacağı için, izolasyon kitinin protokolünden ayrılmadan 0,5 ml kandan genomik DNA’ nın izolasyonu yapılacak şekilde uygulamada küçük modifikasyonlar yaparak kendi laboratuvar koşullarımıza göre maksimum performansı elde ettik. Aşağıda bu kit ile uygulanan tam kandan genomik DNA izolasyon protokolü basamaklarıyla anlatılmıştır:

1. DNA izolasyonu yapılacak her bir kan örneğı için steril 1,5 ml’ lik eppendorflara 1,1 ml Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi,
2. Her bir tüpe 400 µl kan örneğı eklendi, kapağı kapatılıp nazikçe ters-düz edildi,
3. Tüpler 10 dakika boyunca sallanan platformda (Vorteks cihazının aparatı sayesinde) tutuldu,
4. Daha sonra tüpler 875 x g de 10 dakika santrifüj edildi,
5. Temiz ve kırmızı renkteki süpernatantın 600 µl’ si atılıp, yerine yine 600 µl Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi,
6. Tüpler tekrar sallanan platformda 10 dakika boyunca tutuldu,
7. Daha sonra tüpler tekrar 875 x g de 10 dakika santrifüj edildi,
8. Süpernatantın büyük çoğunluğu atıldı,

Not: 9. basamakta pelletin iyice homojenize olup karışabilmesi için bu basamakta tüpün dibinde bir kısım süpernatant bırakılıyor.

9. Kalıntı süpernatantın içinde ve tüpün dibinde gözüken beyaz pellet iyice vortekslendi, pelletin iyice karıştığından emin olundu,
 10. 250 µl White Cell Lysis Buffer eklendi, kapağı kapatılıp iyice vortekslendi,
 11. 37 °C de 30 dakika tutuldu (su banyosunda), bu işlem boyunca her 10 dakikada bir kuvvetlice vortekslendi,
 12. 150 µl Protein Precipitation Solution eklendi, 25 saniye boyunca kuvvetlice vortekslendi, kahverengi protein çökeltisi görünür oldu,
 13. Örnekler 10 dakika boyunca 12.000 x g de santrifüj edildi,
 14. DNA içeren süpernatant kısmı yine steril 1,5 ml' lik eppendorfa aktarıldı (yaklaşık 500 µl),
 15. 14. basamakta elde edilen süpernatantın iki katı kadar ethanol (+15 °C ila +25 °C arasında sıcaklıkta) bu süpernatantın üstüne eklendi (yani 1 ml ethanol süpernatantın üzerine eklendi),
 16. DNA iplikleri solüsyon içerisinde gözle iyice görünür hale gelinceye kadar tüpler nazıkçe ters-düz edildi,
 17. Örnekler 875 x g de 10 dakika santrifüj edildi,
 18. Süpernatant atıldı,
 19. 250 µl %70' lik soğuk ethanol eklendi,
 20. Dikkatlice elle ters-düz edilerek pellet yıkandı,
 21. 875 x g de 5 dakika santrifüj edildi,
 22. Süpernatant atıldı,
 23. Ethanol kalıntısı kalmayana kadar DNA pelleti kurutuldu,
- Not: Bu aşamada pelletin çok fazla kurutulmamasına dikkat edildi,
24. DNA pelleti 100 µl TE Buffer ile resüspanse edildi,
 25. Nazıkçe Vorteks yapıldı,
 26. Resüspansiyon için örnekler 30 dakika 65 °C de su banyosunda bekletildi, bu aşamada örnekler 10 dakikada bir periyodik olarak nazıkçe vortekslendi,
 27. Elde edilen stok genomik DNA -20 °C de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.6.4.3. Genomik DNA' nın Saflığının ve Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen genomik DNA' ların konsantrasyon ve saflıkları Spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansitenin okunması DNA miktarını, 260/280 nm dalga boyundaki okumalar ise DNA' nın saflığını verir. Spektrofotometrede 260 nm' de okunan 1

Optik Dansite (OD) solüsyonda 50 µg/ml DNA konsantrasyonunda çift iplikli DNA molekülü olduğunu söylemektedir(121). Buradan hareketle, genomik DNA 1/100 seyreltilmiş ve konsantrasyonunun belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır(121).

DNA konsantrasyonu (µg/ml) = (OD)₂₆₀ x 100 (sulandırma katsayısı) x 50 µg/ml (çift zincirli DNA'lar için OD değeri)

Spektrofotometredeki 260/280 nm optik dansite oranı 1,8 ila 2,0 arasında olan örnekler uygun seyreltmeler yapılarak kullanılmak üzere stoklanmışlardır.

3.6.4.4. Genomik DNA' nın Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen ve konsantrasyonları anlaşılan genomik DNA örneklerinin hem intakt olup olmadıklarını hem de seyreltmelerin doğruluğunu test etmek için stoktan 1/5 oranında seyreltilen bu örnekler % 0,8' lik agaroz jelde (TBE ile hazırlanmış) yürütüldüler. Bunun için şu basamaklar takip edildi (121,122):

- Hassas terazi de 0,4 gram agaroz tartılarak 200 ml' lik temiz bir erlenin içerisine alındı, üzerine de son hacim 50 ml olacak şekilde 0,5xTBE tamponu eklendi ve mikrodalga fırın yardımıyla çözülen agaroz kalıntı kalmayacak şekilde kısa periyotlar ile çalkalanarak homojen hale getirildi.
- Sıcak haldeki erlenin dış kısmı akan çeşme suyuna temas ettirilecek şekilde el yakmayacak hale gelene kadar (yaklaşık 50-55 °C ye) soğutuldu. Daha sonra hemen içine 2 µl kadar etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edilip karıştırıldı.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağına (elektroforez tankındaki) döküldü, var ise kabarcıklardan bir mikro pipet ucu ile kurtulundu ve kuyucukların oluşturulması için de taraklar (orta büyüklüklü) yerleştirilip oda sıcaklığında jelin donması bekledi.
- Jel donduktan sonra taraklar yavaşça çıkartılıp tank içerisindeki 0,5xTBE tamponunun jelin yüzeyini 2-3 mm geçecek seviyede olması sağlandı. Seyreltilmiş (stoktan 1/5 oranında) genomik DNA' nın 5 µl' si ile 1 µl Loading Dye (6X' lik) iyice karıştırıldı ve kuyucuklara sırasıyla yüklendi.
- Jele yüklenen bu genomik DNA' lar 90V da 45 dakika yürütüldüler. Daha sonra jel görüntüleme sisteminde görüntü alındı.

3.6.4.5. KREMEN1 Gen Dizisinin Veri tabanlarından Tespiti

İnsan KREMEN1 geninde araştırdığımız SNP' leri (rs713526, rs116100643 ve rs201088346) içeren gen dizisine ulaşabilmek için internet temelli veri tabanları [NCBI (112) ve Ensembl (113)] kullanıldı. Ayrıca bu gen dizisi uyguladığımız PCR reaksiyonu için

primerlerimizi dizayn etmek için de kullanıldı. Aşağıda bu veri tabanından elde edilmiş ve yukarıda bahsedilen bölgeyi kapsayan gen dizisi ve çalıştığımız SNP' ler bulunmaktadır (Tablo 9) (112,113).

Tablo 9: KREMEN1 geninde çalışılan gen dizisi ve SNP' ler.

Ensembl Gene ID: ENSG00000183762

>chromosome:GRCh37:22:29468466:29564921:1 (KREMEN1 geninin tamamı)

```

.....TTATTATCCCAGGTGGAACCTGACCTTGCTCTCAGAGCAACCAGTTCTTCCTC 29543285
29543286 TCCACCCCTTCTTGCCCCACACTTTCCTTCTTAGGAAGGAAAGAAGCTAATAGAAGCTC 29543345
29543346 CACGTATGAGCTGCCCCTCTGCGCCAGGCACTCTGCTGGCAGACACTGTGCATATCCTA 29543405
29543406 CAACTCTTCCTATGGGTACCACTTTCCTTCTTGGCAGATGAGACAGCTCAGGCATGGA 29543465
29543466 GAGGCTGCGGGGACAGTAGCTGGGAGCACAGCCCTGGAGTCAGCCCTCCAGGATTCAGT 29543525
29543526 TTCCTCCATTCACTTCTGTGAGGCCAGTGAGGGTAAACAGGGAGCCTTTGAAGGGTTT 29543585
29543586 CAGCGGAGGAGTGACATCAGATTCCAGTTTAGAAAGCATTCCTCCTTGCATCTGGGAAA 29543645
29543646 ACAGATCTGAGCGGGGTAAGACCGAGGGCAAGGAAACCAGTCGGGAGACTCTA .....

```

Varyasyon/SNP ID' si	Kromozom* Üzerindeki Konumu	İki Anlamlılık Kodu (ambiguity code)	Anlam Değişikliği
rs713526	29543415	R	G/A
rs116100643	29543417	Y	C/T
rs201088346	29543473	K	T/G

*>chromosome:GRCh37:22: esas alınarak o kromozomun DNA dizisi üzerinde kaçınıcı nükleotid olduğu.

Yukarıdaki gibi gözüken gen dizisi bu veri tabanlarından ayrıca FASTA formatında da elde edildi.

3.6.4.6. Oligonükleotidler (Primerler)' in Tasarlanması

İnsan KREMEN1 geninde araştırdığımız SNP' leri (rs713526, rs116100643 ve rs201088346) içeren gen dizisinin PCR reaksiyonu ile amplifiye edip analizini yapmak için hedef bölgeye özgü primerler (İleri “*Forward*” ve Geri “*Reverse*” şeklinde) dizayn edildi. Primerlerin dizaynı için internet temelli bir program (Primer3, versiyon 0.4.0) kullanıldı (123). Program ile primer dizaynı yapmak için girdi olarak FASTA formatındaki DNA dizimizi kullandık. Primer dizaynı yaparken şunlara dikkat edildi:

- Primerlerin sınırlayacağı DNA dizisinin gereksiz yere uzun olmaması,
- Spesifiklik için primer uzunluğunun 18-27 nükleotitlik olması,
- Tm değerinin 57 °C ila 63 °C arasında olmasına, ileri ve geri primerlerde bunların birbirine yakın değerlerde olması,
- GC kontentinin %50-55 civarında olmasına, ileri ve geri primerlerde bunların birbirine yakın değerlerde olması,
- 5' ve 3' uçların stabilitesi,

- Kendi içinde dimer ya da hairpin oluşturmaması,
- Primerin eşleşeceği DNA dizisi üzerinde daha önce tanımlanmış bir varyasyonun olmaması.

Programın (Primer3) (123) sunduğu primerler arasından yukarıdaki kriterlere en uygun olanlar seçildi. Daha sonra uygun olduğunu düşündüğümüz bu primerlerin genom üzerinde istediğimiz bölgeden başka bir bölgeye oturup oturmadığını anlamak için yine internet tabanlı olup tüm genomu tarayabilen bir program (Primer-BLAST) kullanıldı (124). Programa bu primerler 5'-3' yönünde ileri ve geri primerler olarak girilip, arama seçimleri insan genomunda yapılarak olası eşleşmeler ortaya çıkartıldı. Sonuç olarak, bizim bölgemize eksiksiz olarak oturduğu görülüp, genom üzerinde başka hiçbir yer ile eşleşmeyen primerler seçildi (Tablo 10).

Tablo 10: Dizayn edilen ileri ve geri primerler ve genimiz üzerindeki yerleri.

Ensembl Gene ID: ENSG00000183762

>chromosome:GRCh37:22:29468466:29564921:1 (KREMEN1 geninin tamamı)

```

.....TTATTATCCCAGGTGGAAGTACCTTGCCTCTCAGAGCAACCAGTTCTTCCTC 29543285
29543286 TCCACCCCTTCTTGCCCCACACTTTCCTTCTTAGGAAGGAAAGAAGCTAATAGAAGCTC 29543345
          .....
29543346 CACGTATGAGCTGCCCACTCTCGCCAGGCACTCTGCTGGCAGACACTGTGCATATCCTA 29543405
29543406 CAACTCTTCTCTATGGGTACCACTTTCCCTCTTTGGCAGATGAGACAGCTCAGGCATGGA 29543465
29543466 GAGGCTGKGGGGACAGTAGCTGGGAGCACAGCCCTGGAGTCAGCCCTCCAGGATTCAGT 29543525
29543526 TTCTCCATTTCATTCTCTGTGAGGCCAGTGAGGGTAAAACAGGGAGCCTTTGAAGGGTTT 29543585
          .....
29543586 CAGCGGAGGAGTGACATCAGATTCCCAGTTTAGAAAGCATTCCTCCTTGCATCTGGGAAA 29543645
29543646 ACAGATCTGAGCGGGGTAAGACCGAGGGCAAGGAAACCAGTCGGGAGACTCTA .....

```

Primerler	Uzunluk	Tm	% GC	Primer dizisi
İleri Primer	20 nt	59,90	55	5' – ACGTATGAGCTGCCCACTCT – 3'
Geri Primer	20 nt	60,11	55	5' – TTTACCCTCACTGGCCTCAC – 3'

Yukarıdaki gibi olmasına karar verilen ileri ve geri primerler hizmet alımı şeklinde bir firmadan (Metabion, Martinsried/Deutschland) sentezletirildi.

Tablo 10' dan da anlaşılacağı gibi, KREMEN1 geni için dizayn edilen bu primerlerin düzgün şekilde çalışması ile 217 bp lik PCR ampliconu oluşmaktadır.

3.6.4.7. Oligonükleotidler (Primerler)' in Hazırlanması

Sentezlenmesini istediğimiz primer dizileri HPLC yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra liyofilize halde elimize ulaştı. Firma liyofilize olarak gelen oligonükleotidlerin kaç nmol olduğunu bildirmişti. Bizde firmanın da önerdiği doğrultuda primierleri kullanıma hazırlamak

için, ultra saf, steril ve DNase ve RNase-free su kullanarak, biyogüvenlik kabineti altında steril şartlarda çalışarak 100 pmol/μl' lük ana stoklar şeklinde primerlerimizi sulandırdık. Hazırlanan 100 pmol/μl' lük stoklar PCR reaksiyonu için kullanılacağı zaman yine yukarıda sayılan şartlar altında 10 pmol/μl olacak şekilde ara stok olarak seyreltildi (Tablo 11).

Tablo 11: Liyofilize halde gelen primerlerin ana stok ve son kullanım için de ara stok olacak şekilde sulandırılması.

Primerler	Liyofilize Haldeki Miktar	Eklenen Saf Su	Ana Stok Kons.	PCR reak. için Ara Stok Kons.
İleri Primer	81.9 nmol	819 μl	100 pmol/μl	10 pmol/μl
Geri Primer	93.3 nmol	933 μl	100 pmol/μl	10 pmol/μl

Primerler sürekli -20°C de buzdolabında saklandı ve kullanılacağı zaman oda koşullarında çözülmesi beklendi. Ancak stok primerler kullanılması gerektiğinde, aseptik şartlarda çalışılmasına çok dikkat edildi.

3.6.4.8. PCR Reaksiyonunun Hazırlanışı

Öncelikle PCR reaksiyonu hazırlanırken gerekli tüm komponentlerin buzdolabından çıkartılarak oda koşullarında çözülmesi beklendi. Ancak sadece Taq DNA polimerazın içinde zaten donmasını engelleyici ajan olduğundan ve oda koşullarında enzimin kalitesi bozulabileceğinden o en son dolaptan çıkarıldı ve kullanılır kullanılmaz dolaba ilk o koyuldu. PCR reaksiyonunun optimizasyonu için olan denemede 15 μl hacminde, hasta ve kontrol örneklerinin artık DNA dizi analizine gönderilmek için yapılan işlemlerde ise 50 μl hacminde PCR reaksiyonları kuruldu. Spektrofotometrede konsantrasyonları ölçülen hasta ve kontrol örneklerine ait kalıp DNA' lar PCR reaksiyonuna hazır hale getirilmek için ara stok olarak 20 ng/μl konsantrasyonlarına seyreltildiler. Tüm PCR reaksiyonları için 200 μl' lik DNase ve RNase free steril PCR tüpleri kullanıldı. PCR reaksiyonunun hazırlanışı esnasında kullanılan tüm malzemeler soğuk blok üzerinde tutuldu. Ayrıca küçük hacimler ile çalışılması zor olduğundan, reaksiyonlar için sadece kalıp DNA yı içermeyen karışımlar (Mix) hazırlandı. Karışıma en son Taq DNA polimeraz enzimi eklendi. Hem olası kontaminasyon riskini en aza indirmek için, hem de karışım üzerine eklendiğinde iyi karışabilmesi için, kalıp DNA en baştan reaksiyonun gerçekleşeceği PCR tüplerine dağıtıldı. Karışım hazırlandıktan sonra yavaş yavaş pipetaj yapılarak iyice homojen bir hale gelmesi sağlandı. Daha sonra bu karışım kalıp DNA' ların bulunduğu PCR tüplerinin üzerine tek tek eklendi ve tekrar yavaşça pipetaj yapıldı. Böylece reaksiyon için gerekli tüm bileşenleri içeren karışım hazır hale gelmiş oldu.

Ayrıca her bir PCR reaksiyon grubu için kesinlikle iç kontrol olarak kalıp DNA yerine su kullanıldı ve böylece deneyin doğruluğu kontrol edildi.

3.6.4.9. PCR İçin Reaksiyon Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri

Genel olarak PCR reaksiyonunda kullanılacak komponentlerin konsantrasyonları ve PCR koşulları için Taq DNA polimeraz üreticisi firmanın (Applied Biological Materials Inc.) önerilerinden(125) de faydalanarak, esas olarak ise primerlerimize, laboratuvar koşullarımıza ve geleneksel yöntemlerimize göre uyarlamalar yapılarak PCR reaksiyonları planlanmıştır. Ancak, söz konusu primerler ilk defa tarafımızdan dizayn edildiği için ve dolayısıyla primerlerin çalıştığı optimum PCR reaksiyonu için bir veri olmadığından PCR koşullarının optimize edilmesi gerekti. Bu yüzden optimizasyon için iki koşul üzerinde değişiklikler denendi. Bu kapsamda gerek PCR’ daki sıcaklık koşulunun, gerekse Magnezyum (Mg^{2+}) koşulunun basamaklanarak ve farklı kombinasyonlarda tek bir cihaz ile tek seferde yapılabilmesine olanak kılan Gradient PCR yöntemini kullandık. Gradient PCR özelliği olan cihazlar tek işlemde PCR reaksiyonunun “Annealing” yani primerlerin “bağlanma” aşamasında farklı tüplere farklı sıcaklıklar (kademeli olarak) sağlayabilmektedir. Bu kapsamda farklı Mg^{2+} konsantrasyonlarında hazırlanmış PCR karışımlarını içeren tüpler bu “Thermal Cycler” cihazına (Techne, TC-3000G) yerleştirildi ve cihazın özelliğinden kaynaklı olarak yukarıda bahsedildiği gibi farklı sıcaklık kombinasyonları da tek seferde denenmiş oldu. Aşağıdaki tablolarda sırasıyla yapılan PCR optimizasyon reaksiyonu için bileşenlerin konsantrasyonları, sıcaklık koşulları ve Mg^{2+} ile “Annealing” sıcaklık koşulunun basamaklanmasına değinilmiştir (Tablo 12-14).

Tablo 12: KREMEN1 geninin ilgili bölgesinin PCR optimizasyonu için kurulan reaksiyonun bileşenleri ve konsantrasyonları.

Komponentler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	15 µl' lik reaksiyon hacmi için çekilen miktar
Ultra Saf Su	-	-	15 µl' ye tamamlanır*
İleri Primer	10 pmol/µl	0,4 pmol/µl	0,60 µl
Geri Primer	10 pmol/µl	0,4 pmol/µl	0,60 µl
Taq Polimeraz Tamponu	10X	1X	1,50 µl
dNTP Mix	10 mM	0,2 mM	0,30 µl
MgCl ₂ Tamponu [†]	25 mM	1,0 mM	0,60 µl
		1,5 mM	0,90 µl
		2,0 mM	1,20 µl
Taq Polimeraz Enzimi	5 U/µl	0,05 U/µl	0,15 µl
Kalıp DNA	20 ng/µl	2ng/µl	1,50 µl
Toplam			15,00 µl

*Bu su değeri tabloda görüldüğü gibi gradienti yapılan MgCl₂ hacmine göre değişeceği için o şekilde yazılmıştır.

[†] Yukarıda görüldüğü gibi MgCl₂ üç farklı konsantrasyonda denenmiştir.

Tablo 13: KREMEN1 geninin ilgili bölgesinin PCR optimizasyonu için reaksiyonun gradient termal profili.

Ön Özellikler			
Thermal Cycler’ ın kapak ısıtması		Açık	
Thermal Cycler’ ın kapak sıcaklığı		105 °C	
Kapak ısınırken örnekleri soğutma		Açık	
Termal Profil ve Döngü Sayısı			
Basamak	Sıcaklık		Süre
İlk Denatürasyon	94 °C		3 dakika
Aşağıdaki üç basamağın 32 Döngüsü			
Denatürasyon	94 °C		30 saniye
Annealing*	55 °C	57,7 °C	59,4 °C
Uzama	72 °C		30 saniye
Son Uzama	72 °C		10 dakika

*Yukarıda görüldüğü gibi “Annealing” sıcaklığı üç farklı şekilde denenmiştir.

Tablo 14: KREMEN1 geninin ilgili bölgesi için MgCl₂ ve “Annealing” sıcaklığının gradient ayrıntıları.

Thermal Gradient		55 °C	57,7 °C	59,4 °C
MgCl ₂ gradient	1,0 mM	A	D	G
	1,5 mM	B	E	H
	2,0 mM	C	F	I

Tabloda büyük harfler ile belirtilmiş ifadeler birbirinden farklı koşullarda kurulan PCR reaksiyonlarını ifade etmektedir. Örneğin: B numaralı reaksiyon tüpü karışımında 1,5 mM MgCl₂ olduğunu ve PCR da “annealing” sıcaklığının da 55 °C de seçildiğini ifade etmektedir.

3.6.4.10. PCR Optimizasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatılan koşulların birbirleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen KREMEN1 geni PCR ürünleri agaroz jel elektrofrezinde değerlendirilmiştir. Bu kapsamda daha önce genomik DNA’ nın agaroz jel elektrofrez yöntemi ayrıntılı olarak anlattığımızdan burada sadece farklılıklarına değineceğiz. KREMEN1 geninin PCR ürününün büyüklüğü 217 bp olduğu için, %2’ lik agaroz jelle yüklenip yürütülmüşlerdir. Bunun için 2 µl Loading Dye (6X) ile 10 µl PCR ürünü pipetaj yapılarak iyice karıştırılmış, ve yavaşça yine pipet ile kuyucuklara yüklenmişlerdir. Ayrıca jelin iki tarafına 100 bp’ lik DNA ağırlık belirteci “marker” lar [ilki RBC marka, ikincisi Fermentas marka olup ekte (Bkz. EK 2) üretici firmanın broşürü ile ayrıntılar sunulmuştur] yüklenmiştir. Son kuyucuğa da reaksiyonun doğruluğunu kontrol etmek için negatif kontrolümüz eklenmiştir. Örnekler jelle şu sıra ile yüklendiler (Tablo 15).

Tablo 15: PCR optimizasyonu için kurulan reaksiyondan elde edilen PCR ürünlerinin jelle yüklenme sırası.

100 bp Marker (RBC)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	100 bp Marker (Fermentas)	Neg. Kontrol
---------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---------------------------	--------------

Not: “A, B, C,...” şeklinde ifade edilen örneklerin ayrıntılarına Tablo 14’ de değinilmiştir.

Jelle yüklenen PCR ürünleri ve DNA ağırlık belirteçleri (Marker’ lar) aynı anda 130V da 65 dakika boyunca yürütüldüler. Daha sonra yürütülen PCR ürünleri transilüminatörle UV ışığı altında DNA’ ya bağlanan Etidyum Bromür’ ün ışıma yapması sayesinde nitel olarak

incelendi. Özellikle “G” ile ifade edilen koşullardan elde edilen PCR ürününün jelde yürütülüp incelenmesi sonucunda, bu koşulda marker’ lar ile kıyaslandığında aradığımız ürünümüzün gerçekten de 217 bp de olduğunu, spesifik olmayan başka bantların bulunmadığını gördük ve bant kalınlığının dizi analizi için uygun olduğuna karar verdik. Bu kapsamlı optimizasyon deneyi sayesinde KREMEN1 geninin ilgili varyasyonları içeren bu gen bölgesini en uygun şekilde amplifiye eden koşul netleşmiş ve aşağıda da belirtildiği gibi artık bu koşul üzerinden devam edilmiştir.

3.6.4.11. DNA Dizi Analizi İçin Tüm Örneklerin PCR İşlemleri

Optimizasyon denemeleri sonucunda KREMEN1 geninin incelemek istediğimiz varyasyonları içeren gen bölgesini uygun biçimde amplifiye edebilecek PCR koşulları netleşmiştir. Bu yüzden aşağıdaki tablo da gösterilmiş koşullar tüm hasta ve kontrol grubumuzdaki örnekler üzerine uygulanmak kaydı ile PCR reaksiyonları kurulmuştur. Özellikle DNA dizi analizi için en az 40 µl PCR ürünü gerektiği için, bu aşamadan sonra tüm örneklerin KREMEN1 geni PCR ürünleri optimize edilmiş koşullarda 15 µl değil de 50 µl’ lik PCR reaksiyonları kuruldu (Tablo 16, 17). Reaksiyonlar kurulurken özellikle artık çok sayıda örnek ile çalışıldığından bir kros kontaminasyon yaşanmamasına çok dikkat edildi.

Tablo 16: KREMEN1 geni ilgili bölgesini DNA dizi analizine hazır hale getirmek için tüm örnekler üzerine uygulanan PCR işleminin reaksiyon içeriği.

Komponentler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	50 µl’ lik reaksiyon hacmi için çekilen miktar
Ultra Saf Su	saf	saf	32,5 µl
İleri Primer	10 pmol/µl	0,4 pmol/µl	2,0 µl
Geri Primer	10 pmol/µl	0,4 pmol/µl	2,0 µl
Taq Polimeraz Tamponu	10X	1X	5,0 µl
dNTP Mix	10 mM	0,2 mM	1,0 µl
MgCl ₂ Tamponu	25 mM	1,0 mM	2,0 µl
Taq Polimeraz Enzimi	5 U/µl	0,05 U/µl	0,5 µl
Kalıp DNA	20 ng/µl	2ng/µl	5,0 µl
Toplam			50,00 µl

Tablo 17: KREMEN1 geni ilgili bölgesini DNA dizi analizine hazır hale getirmek için tüm örneklere uygulanan PCR’ ın termal profili.

Ön Özellikler		
Thermal Cycler’ ın kapak ısıtması	Açık	
Thermal Cycler’ ın kapak sıcaklığı	105 °C	
Kapak ısınırken örnekleri soğutma	Açık	
Termal Profil ve Döngü Sayısı		
Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	94 °C	3 dakika
Aşağıdaki üç basamağın 32 Döngüsü		
Denatürasyon	94 °C	30 saniye
Annealing	59,4 °C	30 saniye
Uzama	72 °C	30 saniye
Son Uzama	72 °C	10 dakika

Yukarıda anlatılan şartlar altında tüm örneklerin PCR işlemleri yapılmıştır. Çok sayıda örnek ile çalışıldığından kolaylık olmasını sağlamak için ve hata payını en aza indirmek için kalıp DNA’ yı içermeyen PCR karışımları hazırlandı ve daha önce de anlatıldığı gibi bu PCR karışımından gerektiği miktarda (45 µl) alınarak kalıp DNA’ yı (5 µl) içeren PCR tüplerinin üzerlerine dağıtılmıştır. Ayrıca her bir PCR reaksiyon grubu için kesinlikle iç kontrol olarak kalıp DNA yerine su kullanıldı ve böylece deneylerin doğruluğu kontrol edildi.

3.6.4.12. PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizine Gönderilmeden Önce Agaroz Jel Elektroforezinde Son Bir Kontrolü

Tüm örneklerde yapılan PCR işlemlerinde herhangi bir sorun olup olmadığını ya da ürünlerin DNA dizi analizi için elverişli olup olmadığını anlayabilmek için, elde edilen 50 µl’ lik PCR ürünlerinden 5 µl’ si %2’ lik agaroz jel de 130V da 35-70 dakika yürütülmüşlerdir. Her bir PCR reaksiyon grubu için negatif kontrol ve marker’ lar muhakkak jele yüklenmiştir. Geride kalan 45 µl’ lik PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderilmek üzere hemen dolaba kaldırılmışlardır. Daha sonra yürütülen PCR ürünleri transilüminatörle UV ışığı altında DNA’ ya bağlanan Etidyum Bromür’ ün ışıma yapması sayesinde nitel olarak incelendi.

3.6.4.13. PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizine Gönderilmesi

Agaroz jel elektroforezinde görüntülediğinde marker’ lar ile kıyaslanıp doğru bölgede (217 bp civarı) bulunan, herhangi bir spesifik olmayan bant içermeyen ve analiz için yeterli

konsantrasyonda olduğu saptanan PCR ürünleri DNA dizi analizi için uygun bulunmuştur. Uygun bulunan tüm örnekler hizmet alımı şeklinde bir firmadan (Macrogen) tek yönlü (ileri yönde) dizi analizi yaptırılmıştır. Firmanın önerdiği doğrultuda her bir örnekten 45 µl olacak şekilde PCR ürünü gönderildi. Otomatize sekans cihazının istediğimiz bölgeyi tarayabilmesi için de ileri ve geri primerlerimiz de aynı anda gönderildi. Ayrıca gönderilen PCR ürününün hangi örneğe ait olduğunu tüplerin üzerine ve firmanın Excel formatında sağladığı tablolara ayrıntılı olarak yazıldı. Tüm örneklerin kapakları parafilmlenerek üzerine delikler açılmış köpüklere sıkıca tutturularak DNA dizi analizine gönderildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmamızın hazırlık aşaması da dahil olmak üzere tamamlanması 14 ay gibi bir zaman dilimini kaplamıştır. Tüm bu çalışmamız ile ilgili akış grafiği tarihleri de içerecek şekilde aşağıdaki gibidir (Tablo 18).

Tablo 18: Araştırmamızın tarihleri ile birlikte akış grafiği.

Yapılan İş Paketi	Aylar						
	0-2	4	6	8	10	12	14
Literatür Takibi							
Hazırlık ve Gidişat Kurgulama							
Genomik DNA İzolasyonu							
PCR ve DNA Dizi Analizi							
Tüm Verilerin Analizi							
Tüm Verilerin Çözümlemesi							
Tez Yazımı							

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. PCR Optimizasyon Verilerinin Değerlendirilmesi

KREMEN1 geninin ilgili bölgesi için kurulan PCR optimizasyon deneyleri ile elde edilen PCR ürününün agaroz jelde yürütülüp incelenmesi sonucunda, bu koşulda marker' lar ile kıyaslandığında aradığımız ürünümüzün beklendiği gibi 217 bp de olduğunu, spesifik olmayan başka bantların bulunmadığını gördük ve bant kalınlığının dizi analizi için uygun olduğuna karar verdik. Bu kapsamlı optimizasyon deneyi sayesinde KREMEN1 geninin ilgili SNP lerini içeren bu gen bölgesini en uygun şekilde amplifiye eden koşul netleşmiş oldu.

3.8.2. DNA Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi

Tüm örneklerin PCR işlemleri sonrasında elde edilen ürünlerin ileri yönde dizilemesi otomatize sekans cihazı (Model: 3730XL, Alet İsmi: MacroGen3730XL10-17118-003, MacroGen) kullanılarak gerçekleştirildi. Firma DNA dizi analizi sonuçlarını .ab1, .pdf, .phd.1 ve .txt dosya formatları şeklinde tarafımıza göndermiştir. Bu dosya formatlarındaki verilerden yararlanarak KREMEN1 geni ilgili bölgesi üzerinde bulunan nükleotid değişimlerini saptadık. Bu aşamada özellikle bilgisayar temelli olan "Chromas Pro 1.5" ve "Mutation Surveyor V3.30" programlarından faydalandık. Özellikle dizi analizinden .ab1 formatında gelen sekans verisi bu iki programa girilerek değerlendirildi. Özellikle "Chromas Pro 1.5" programı ile sekansın ön bir taraması ve analizi yapıldıktan sonra daha ayrıntılı analiz "Mutation Surveyor V3.30" programı ile yapıldı. Bu program sekans verilerindeki pik alanlarının değişimlerine göre nükleotid değişimlerini ortaya çıkartmaktadır. Özellikle bu program ile .ab1 formatında girilen KREMEN1 genine ait sekans ile "NCBI" veri tabanında bulunan sekans dizisi karşılaştırılmış ve nükleotid değişimleri net ve doğru biçimde ortaya koyulabilmiştir. Programda pik değişimleri 0,3 ila 0,5 olması durumunda varyasyon vardır yorumu yapılmıştır.

3.8.3. İstatistiksel Analizler

Öncelikle daha önce bahsettiğimiz gibi tüm hasta ve kontrol grubundaki örneklerin bilgileri ve bunlara ait elde ettiğimiz bulgular bir Excel dosyasında toplandı. Verilerin analizleri sırasında bu dosyadan faydalandık. Yine polimorfizmler açısından genotip dağılımları ve allel frekansları da bu dosya sayesinde basitçe hesaplandı. Ayrıca polimorfizmler açısından genotip dağılımlarının popülasyonlarda Hardy-Weinberg eşitliğini/oranını/dengesini sağlayıp sağlamadığı da Excel dosyasına girilen verilerin Ki-kare analizi ile yapıldı. Analiz sonucunda $p > 0,05$ olması durumunda "popülasyonlarda Hardy-Weinberg dengesi vardır" yorumu yapıldı.

Polimorfizmler bir hastalık etkeni olarak düşünüldüğünde, şizofreni hasta ve sağlıklı kontrol bireylerde görülme oranı farklılığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ise bilgisayar temelli bir program (Statcalc, EpiInfo Version 6) aracılığı ile yapıldı. Programda verilerin (hasta ve kontrol gruplarındaki genotip sayılarının) değerlendirilmesi sonucunda P değerinin %95 güven aralığında 0,05' den küçük çıkması (yani $p < 0,05$) iki grup arasındaki bu farklılığın istatistiki olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda örneklem grubunu oluşturan kontrol ve olgu grubundaki örnek sayılarının daha da fazla olması istatistiksel anlamda daha güvenilir verilerin elde edilebilmesine olanak sağlayabilirdi. Araştırmanın sınırlılığı kontrol grubu sayısının olgu grubuna göre daha az olmasıdır. Güvenilirliğin arttırılması için kontrol grubundaki örnek sayısının arttırılması gerekmektedir.

3.10. Etik Kurul Onayı

“KREMEN1 Geninin Şizofreni İle İlişkisinin Araştırılması” isimli araştırmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 07.04.2011 tarih ve 130-GOA protokol numaralı dosya ile incelenmiş, 2011/11-13 numaralı karar ile etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Ayrıca etik kurul onayının bir kopyası ekte bulunmaktadır (Bkz. EK 1).

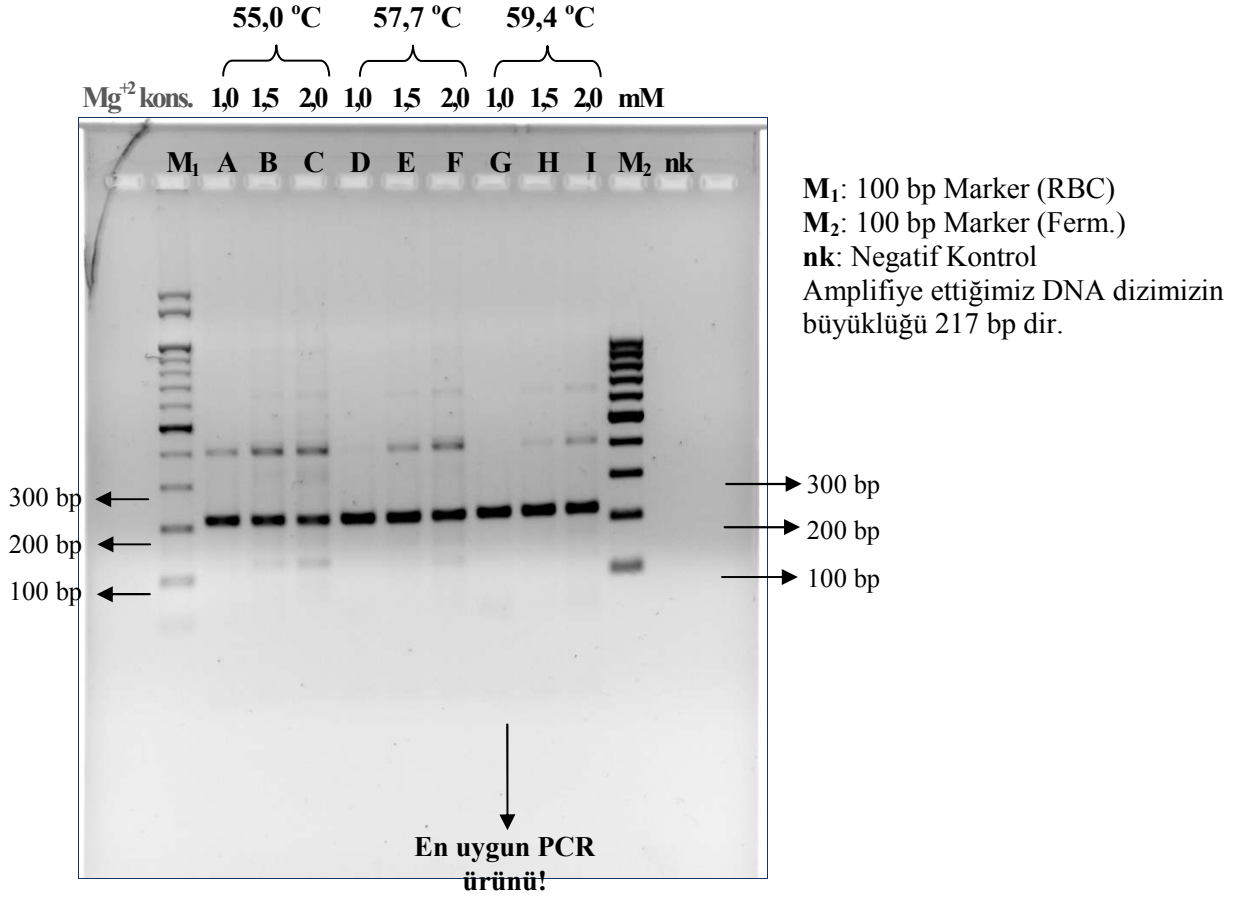
4. BULGULAR

4.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonuna Ait Bulgular

Kandan genomik DNA izolasyonu amacıyla ticari bir kit kullanarak ve kitin yönergelerinde koşullarımıza göre bir takım değişiklikler yaparak uyguladığımız yöntem ile başarılı biçimde örneklemimizi oluşturan örneklerin genomik DNA' larını 100 µl stok olacak şekilde elde ettik. Elde edilen genomik DNA' ların 1/5 oranında seyreltilip agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile intakt oldukları ortaya çıkanlar veya yeterli konsantrasyonda olmadıkları saptanan örnekler tekrar DNA izolasyon prosedürüne tabi tutuldular. Genomik DNA' ların spektrofotometre de saflıklarının ve miktarlarının ölçülmesiyle uygun olduğuna karar verilen tüm örnekler 2ng/µl' lik ara stoklar halinde seyreltildiler. Sonuç olarak tüm örneklemimizi oluşturan örneklerin uygun miktarda, saflıkta ve konsantrasyonlarda genomik DNA' ları elde edilmiş oldu.

4.2. PCR Optimizasyon Deneylerine İlişkin Bulgular

KREMEN1 geninin ilgili varyasyonları içeren gen bölgesinin PCR ile en uygun şekilde amplifiye edilebilmesine olanak sağlayan koşulları PCR optimizasyon deneyleri ile araştırdık. İlk etapta PCR optimizasyonu için iki koşul (Magnezyum konsantrasyonu ve annealing sıcaklığı) ile çeşitlendirmeler yapıldı. Özellikle PCR işlemlerini gradient şeklinde tek seferde tüm koşulları kombine ederek uygulayabilmek büyük kolaylık sağladı. Aşağıdaki jel resminden de anlaşılacağı gibi henüz ilk denemede 217 bp' lik hedef gen bölgesi PCR da amplifiye edilebildi. Özellikle termal koşullardan olan annealing sıcaklığının 59,4 °C olmasına ek olarak reaksiyon koşullarından olan Magnezyum' un da 1,00 mM konsantrasyonunda kullanılmasının hedef bölgenin amplifikasyonu için en uygun koşullar olduğu anlaşıldı (Şekil 9).



Jel %2' lik agaroz jel
Şekil 9: PCR optimizasyon deneyleri sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi KREMEN1 geninin istediğimiz bölgenin en uygun biçimde amplifikasyonunu sağlayan koşul “G” koşuludur. Marker’ lar ile ilgili ayrıntılı bilgi ekte sunulmuştur.

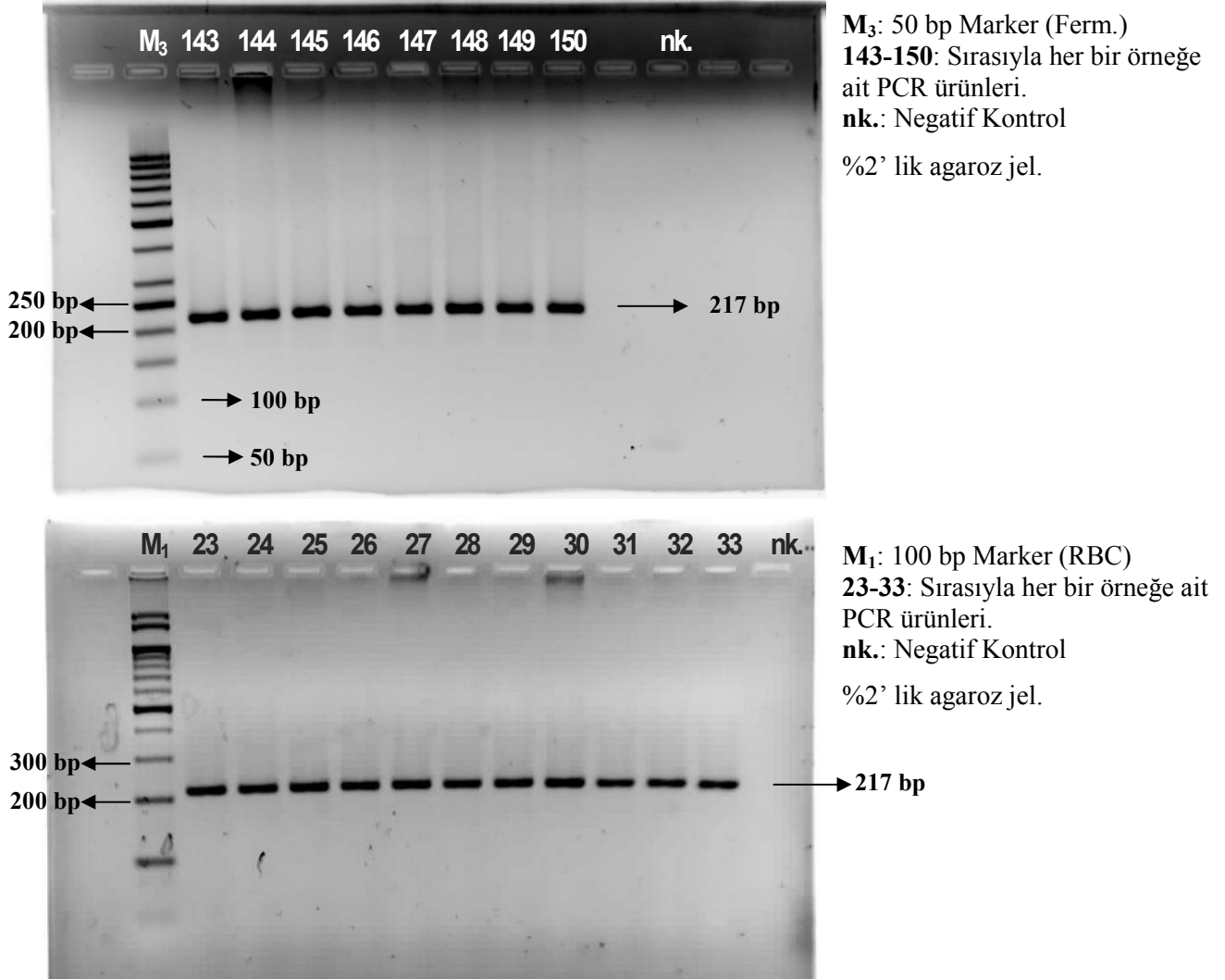
Yukarıda da görüldüğü gibi, özellikle “G” ile ifade edilen koşullardan (59,4 °C ve 1,0 mM MgCl₂ kons.) elde edilen PCR ürününün jelde yürütülüp incelenmesi sonucunda, bu koşulda marker’ lar ile kıyaslandığında aradığımız ürünün beklendiği gibi 217 bp de olduğu ve spesifik olmayan başka bantların bulunmadığı görüldü. Ayrıca bant kalınlığının dizi analizi için uygun olduğuna karar verildi.

Bu bulgular eşliğinde KREMEN1 geninin istediğimiz bölgesini amplifiye edip dizi analizine göndermek için optimize edilen bu koşullardan faydalanarak (Tablo 16 ve Tablo 17) her bir örneğimize 50 µl olacak şekilde PCR reaksiyonları kuruldu.

Sonuç olarak optimizasyon için gradient PCR cihazı ile yapılan tek işlemde en iyi sonuca ulaşıldı.

4.3. Tüm Örneklerin PCR İşlemlerine Dair Bulgular

Optimizasyon denemeleri sonucunda KREMEN1 geninin incelemek istediğimiz varyasyonları içeren gen bölgesini uygun biçimde amplifiye edebilecek PCR koşulları ile tüm hasta ve kontrol grubumuzdaki örneklerin PCR reaksiyonları kurulmuştur. Elde edilen PCR ürününden 5 µl sinin agaroz jelde yürütülmesi sonucunda istediğimiz DNA dizisini temsil eden bantlarımızın hep aynı standartta, jelde bulunması gereken yerde (217 bp), herhangi bir kontaminasyon olmaksızın ve sekansa gönderilebilecek yoğunlukta olduğu bulundu. Sonuç olarak herhangi bir örnekte problem ile karşılaşılmamış, yani hiçbir PCR reaksiyonunun tekrar kurulmasına gerek kalmamıştır. Aşağıda bu PCR işlemlerinden elde edilen reaksiyon ürününün 5 µl sinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilmiş örnek iki farklı jel görüntüsü bulgu olarak sunulmuştur (Şekil 10).



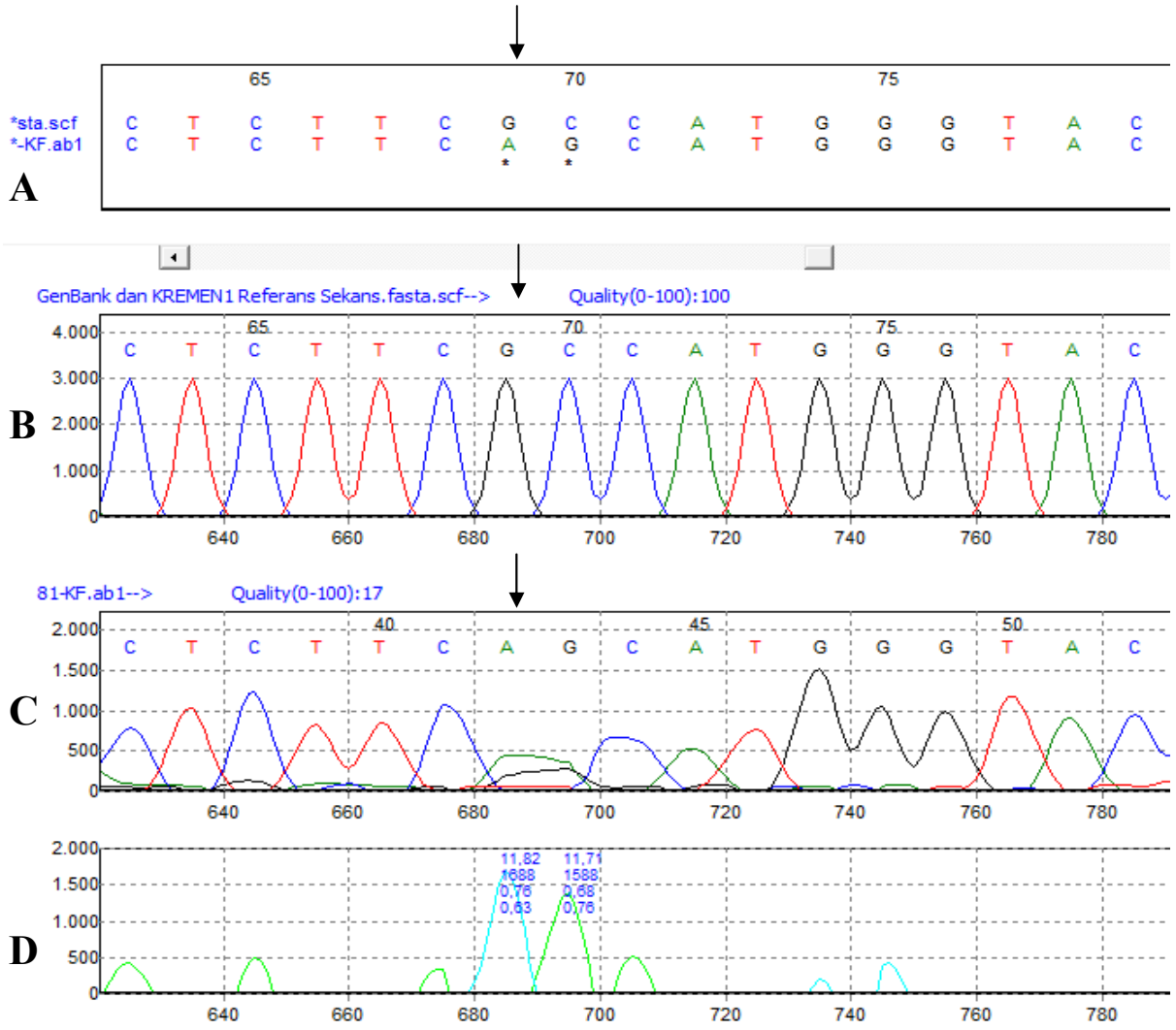
Şekil 10: PCR ürünlerinin DNA dizi analizine gönderilmeden önce agaroz jelde yürütülüp görüntülenmesi.

Marker' lar ile ilgili ayrıntılı bilgi (konsantrasyonları, jelde yürüdüklerinde hangi bandın hangi uzunlukta olduğu vb.) ekte sunulmuştur.

Yukarıda görüldüğü gibi, jel görüntüsüne göre uygun olduğuna karar verilen PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderilmiştir.

4.4. DNA Dizi Analizi Verilerine Ait Bulgular

Tüm örneklerin PCR işlemleri sonrasında elde edilen ürünlerin ileri yönde dizilemesi otomatize sekans cihazı (Model: 3730XL, Alet İsmi: MacroGen3730XL10-17118-003, MacroGen) kullanılarak gerçekleştirildi. Firmadan gelen DNA dizi analizine ait bulgular her bir hasta için tek tek .ab1, .pdf, .phd.1 ve .txt dosya formatları şeklinde tarafımıza gönderildi. Özellikle bu dosya formatlarından .ab1 ve .pdf ile gelenlerde DNA dizilerinin tek tek pikler ile gösterilip ifade edilmesi bize heterozigot ya da homozigot değişiklikleri vurgulaması açısından önemliydi. Bu dosya formatlarındaki verilerden yararlanarak KREMEN1 geni ilgili bölgesi üzerinde bulunan nükleotid değişimlerini “Mutation Surveyor V3.30” programıyla saptadık. Aşağıda gösterildiği gibi, dizi analizi bulgularına ait pik görüntüleri üzerinde bulunan bu varyasyonlara yer verilmiştir (Şekil 11-17). Tüm varyasyon görüntüleri çok yer kaplayacağından sadece ancak bazıları dahil edilebilmiştir.



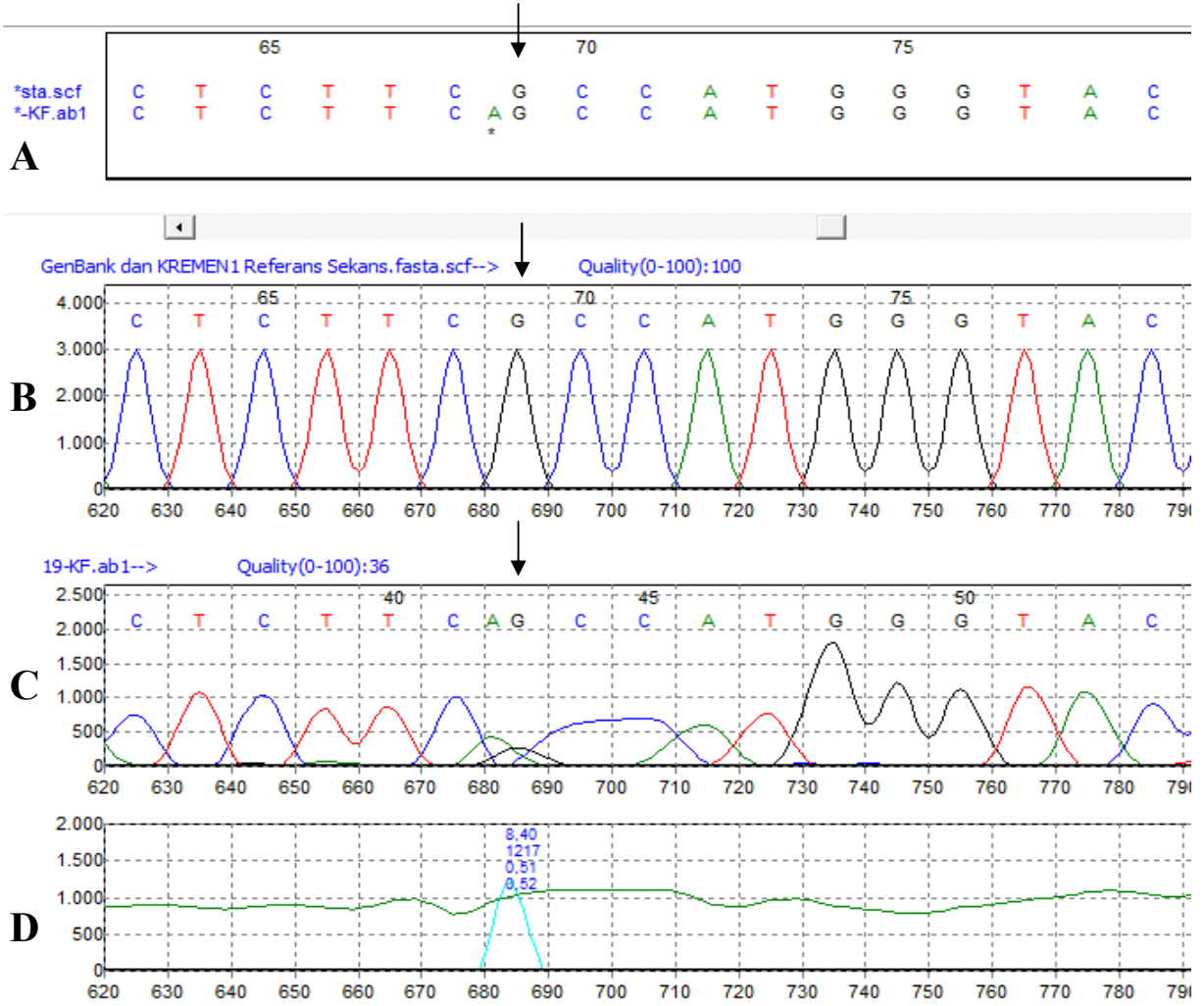
Şekil 11: Örnek 81, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 81. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overloop* değerleri de verilmiştir. Drop 0,63, overloop 0,76



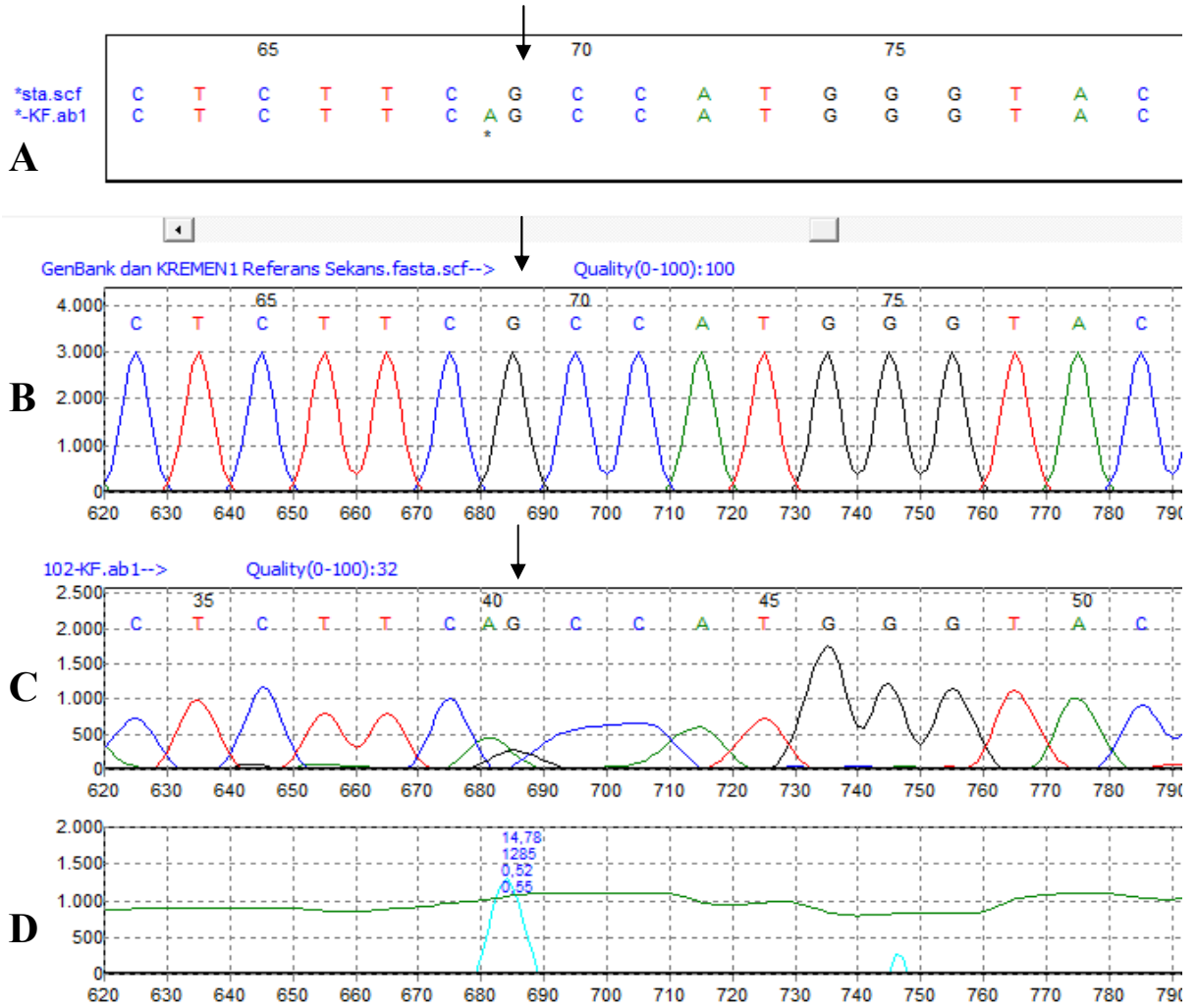
Şekil 13: Örnek 19, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 19. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overlap* değerleri de verilmiştir. Drop 0,52 overlap 0,51



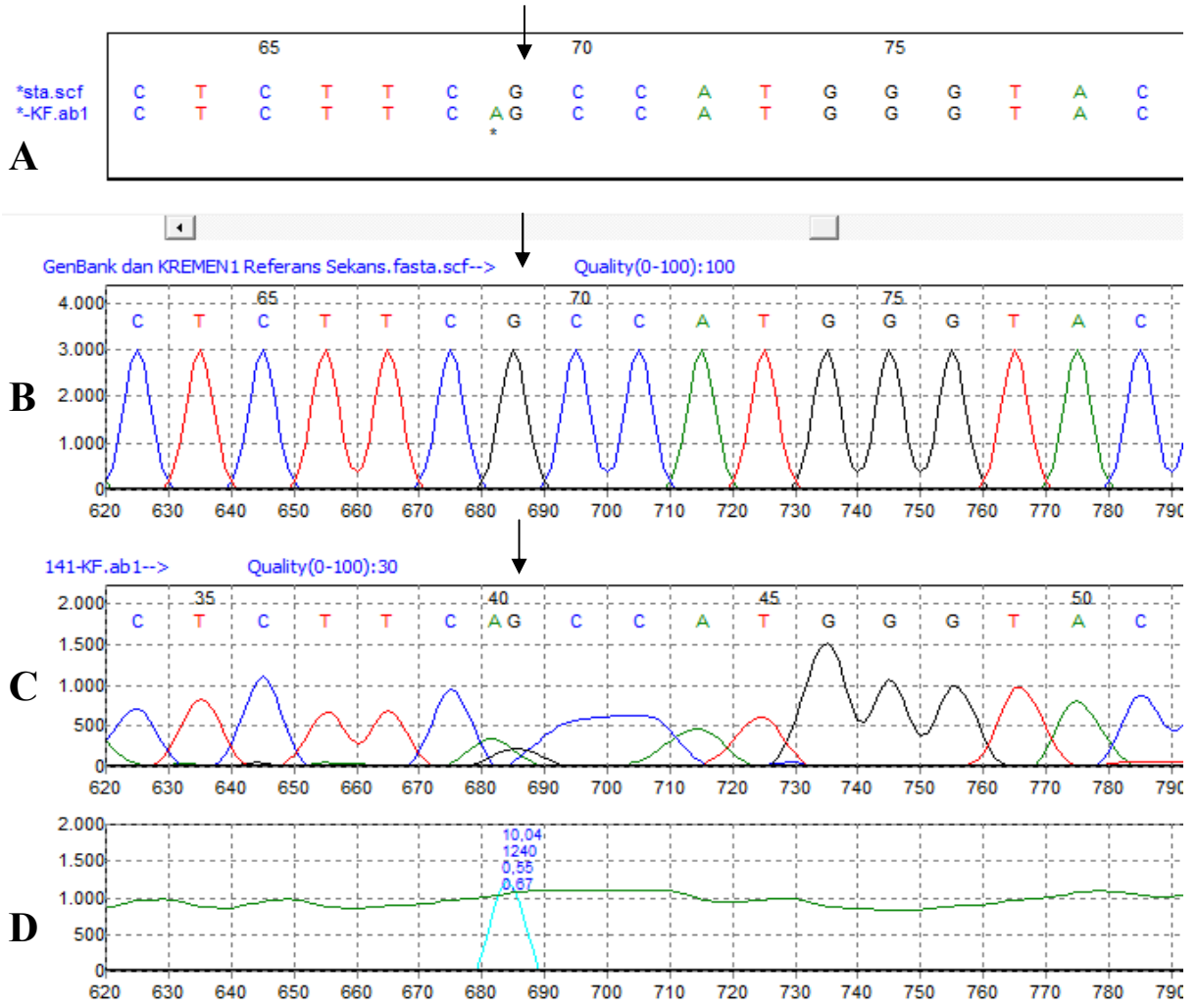
Şekil 14: Örnek 102, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 102. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overlap* değerleri de verilmiştir. Drop 0,52 overlap 0,55



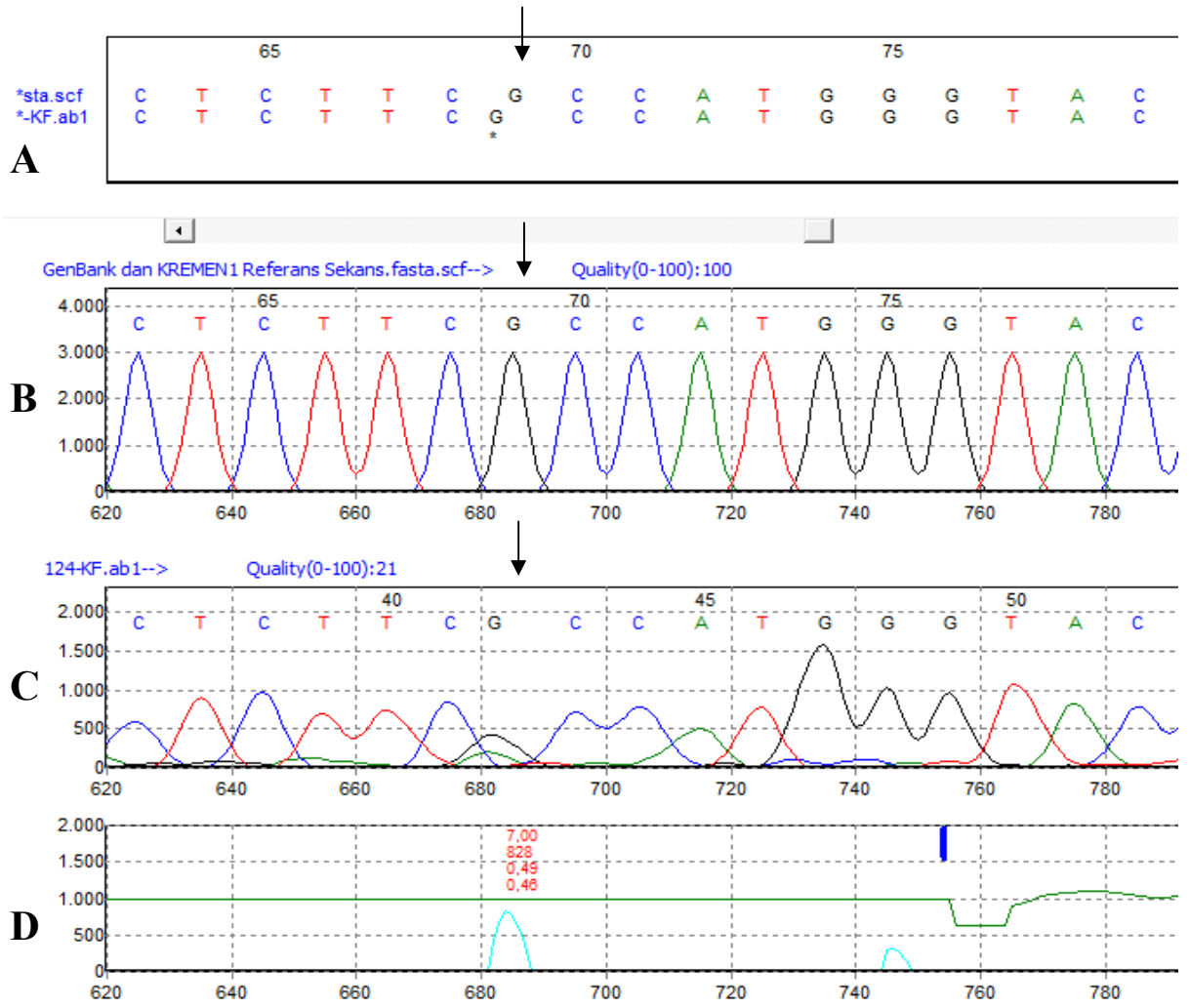
Şekil 15: Örnek 141, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 141. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overlap* değerleri de verilmiştir. Drop 0,67 overlap 0,55



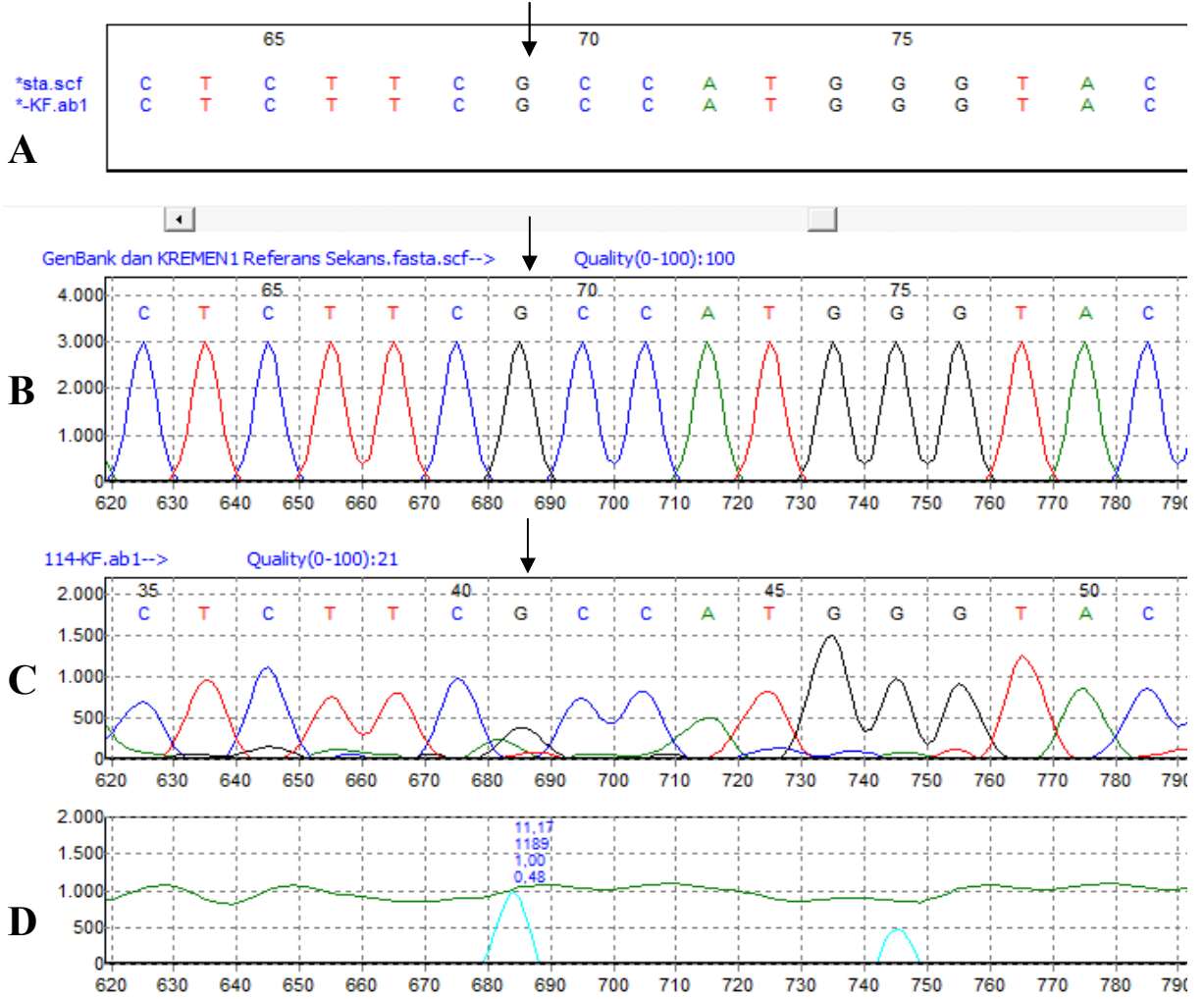
Şekil 16: Örnek 124, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 124. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overloop* değerleri de verilmiştir. Drop 0,46 overloop 0,49



Şekil 17: Örnek 114, G>A (heterozigot) değişimi.

(A) KREMEN1 geni DNA dizisi, “sta.scf” ile ifade edilen sıra GenBank’ dan alınan referans dizi, “-KF.ab1” ile ifade edilen sıra ise örneğimizin DNA dizi analizi sonucu elde edilen dizisidir. Ok ve yıldız ile ifade edilen bu bölgeden anlaşılan referans dizide ‘G/G’ şeklinde bulunan allelin 114. örnekte heterozigot ‘G/A’ değişimine sahip olduğudur. Tanımlı SNP ifadesi: **rs713526 G>A**

(B) GenBank’ dan KREMEN1 geninin .FASTA formatında alınıp .scf formatına dönüştürülmesiyle programa yüklenen *referans DNA dizi*.

(C) KREMEN1 geninde amplifiye ettiğimiz bölgenin ileri yönde DNA dizi analizi yapılarak piklerle de ifade edilmiş her bir örneğe ait *DNA dizisi*.

(D) Örnek ve referansa ait piklerin gerek yüksekliklerinin gerekse alanlarının kıyaslanması ile değişimi nitel olarak ortaya koyan pikleri içeren tablo. (A) bölümünde ulaşılan sonuç bu tabloda oluşan değerlere dayanmaktadır. Pik üzerinde *drop* ve *overlap* değerleri de verilmiştir. Drop 0,48 overlap 1,00

4.5. Ayrıntılarıyla Hasta ve Kontrol Grubundaki Bireylerin İlgili Polimorfizmler Açısından Genotip Dağılımları

Aşağıdaki tabloda çalışmaya dahil edilen tüm şizofreni hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin nükleotid değişimlerine göre dağılımları ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Tablo 19).

Tablo 19: İlgili polimorfizmler açısından hasta ve kontrol grubundaki bireylerin genotipleri.

Ayrıntılarıyla Örnekler ve Genotipleri											
Hiçbir örnekte rs116100643 ve rs201088346 değişimine rastlanmamıştır!											
rs713526 G>A polimorfizmi içeren ya da içermeyen örnekler aşağıda ayrıntılı olarak gösterilmiş, heterozigot G>A değişimini içerenler MAVİ renk ile gölgelendirilerek işaretlenmiştir! Hiçbir örnekte homozigot G>A değişimine rastlanmamıştır!											
Hasta Grubu								Kontrol Grubu			
42	44	52	76	78	80	81	84	6	10	12	19
85	88	91	93	102	103	105	112	45	150	1	2
114	118	124	126	128	130	140	141	3	9	11	24
143	148	152	29	37	38	39	40	25	26	27	28
41	43	46	47	48	50	51	53	32	33	35	49
55	58	59	62	64	68	69	70	54	56	61	146
71	72	73	74	75	77	79	82	149	153	154	155
87	89	90	92	94	95	96	97	156	157	3K	4K
98	99	100	101	104	106	107	109	83	4	5	7
110	111	113	115	117	119	120	121	8	13	14	15
122	123	125	127	129	131	132	133	16	17	18	20
134	135	136	137	138	139	142	144	21	22	23	30
145	147	151	1K	2K	5K	6K	8K	31	34	36	

4.6. Şizofreni Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait KREMEN1 Geni rs713526 G>A Polimorfizmi İçin Genotip Dağılımları ve Allel Frekansları

Tablo 19' dan da anlaşılacağı gibi toplamda 104 hasta ve 51 sağlıklı kontrol çalışmamızda değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta ve kontrol grubundaki bireylerin ayrı ayrı olmak üzere KREMEN1 geni rs713526 (G>A değişimi) polimorfizmi açısından genotip dağılımları ve allel frekansları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 20).

Tablo 20: KREMEN1 geninde rs713526 G>A polimorfizmi açısından hasta, kontrol ve toplam (hasta+kontrol)' a göre genotip dağılımları ve allel frekansları.

Gruplar	rs713526 için Genotip Dağılımı				rs713526 için Allel Frekansı		
	n	G/G	G/A	A/A	n	G	A
Hasta	104	77 (0,74)	27 (0,26)	0 (0,0)	208	0,87	0,13
Kontrol	51	45 (0,88)	6 (0,12)	0 (0,0)	102	0,94	0,06
Toplam ^a	155	122 (0,79)	33 (0,21)	0 (0,0)	310	0,89	0,11

^aTüm popülasyonu/örnekleme (şizofreni hastası + sağlıklı kontrol) ifade etmektedir.

4.7. İstatistiki Değerlendirmeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örneklem (toplam) ayrı ayrı değerlendirilerek, KREMEN1 geninde rs713526 G>A polimorfizmi açısından genotip dağılımlarının bu popülasyonlarda Hardy-Weinberg eşitliğini/oranını/dengesini sağlayıp sağlamadığını test ettik. Aşağıdaki tabloda bu dağılımlara ait farklılıkların istatistiki neticeleri bulunmakla birlikte, ilgili popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları da gösterilmiştir (Tablo 21).

Tablo 21: Popülasyonların rs713526 polimorfizmi (G>A değişimi) açısından genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliği değerlendirmesi.

Gruplar	rs713526 için Genotip Dağılımı				Hardy-Weinberg (H-W) Değerlendirmesi		
	n	G/G	G/A	A/A	χ^2	p-değeri [†]	H-W [†]
Hasta	104	77 (0,74)	27 (0,26)	0 (0,0)	2,31	0,13	dengede
Kontrol	51	45 (0,88)	6 (0,12)	0 (0,0)	0,2	0,65	dengede
Toplam	155	122 (0,79)	33 (0,21)	0 (0,0)	2,2	0,14	dengede

[†] $p>0,05$ olması durumunda popülasyonda Hardy-Weinberg (H-W) dengesi vardır.

Tablo 21' den de anlaşılacağı gibi, ilgili genotip dağılımları için tüm popülasyonlar Hardy-Weinberg dengesini sağlamaktadır.

Şizofreni hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu, rs713526 G/A polimorfizmini taşıma oranları açısından kıyaslandığında, şizofreni hastası bireylerin kontrol grubundaki bireylere göre (G/A) heterozigot genotipini daha yüksek oranda taşıdığı görülmüştür. Şizofreni grubunda

G/A genotipine %26 oranında, sağlıklı kontrol grubunda ise %12 oranında rastlanmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (P=0,042).

Tablo 22: KREMEN1 geninde rs713526 G>A polimorfizmi açısından hasta ve kontrol gruplarının birbiriyle karşılaştırılmasının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Gruplar	rs713526 G>A için Genotip Dağılımı			İstatistiki Değerlendirme [†]	
	n	G/G	G/A	χ^2	p-değeri
Hasta	104	77 (0,74)	27 (0,26)	4,12	0,042
Kontrol	51	45 (0,88)	6 (0,12)		

[†]Polimorfizm (G/A genotipi) bir hastalık etkeni olarak düşünüldüğünde, şizofreni hasta ve sağlıklı kontrol bireylerde görülme oranı farklılığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi. P değerinin %95 güven aralığında 0,05' den küçük çıkması iki grup arasındaki bu farklılığın istatistiki olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Şizofreni [OMIM 181500] belirtileri genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden ve dünya çapında toplumun yaklaşık %0,5-1' ini etkileyen kronik, güçten düşürücü psikotik ve ciddi bir bozukluktur (1). Araştırmalar şizofreni hastalarının üçte birinin hayatları boyunca bir veya daha çok kez intihar girişiminde bulunduklarını ve şizofreni hastalarının yaklaşık %5-10' unun intihar sonucunda hayatını kaybettiğini ortaya koymuştur (1,3,126,127). Şizofreni hastalarında yaşam süreleri %20 daha kısadır (128). Psikiyatrik hastalıklar arasında şizofreni en sakatlık verici hastalık olup, ruh sağlığı servislerinde uzun süre yatışlı tedavileri gerektirebilir. Örneğin, hastanelerdeki psikiyatri servislerindeki tüm yatakların yaklaşık %25' ini şizofreni hastaları doldurmakta ve kliniğe başvuruların %50 sini bu hastalar oluşturmaktadır. Bu denli ciddi ve toplumun bütününe hem ekonomik hem de ruhsal yönde olumsuz etkileyen şizofreni hastalığının bir de yüklü bir tedavi masrafı vardır. Örneğin, şizofreni hastalığının Amerika' daki toplam tedavi maliyetleri ülke genelinde yaklaşık 45 milyar Amerikan Doları (1994 yılı için), Büyük Britanya' daki ise yaklaşık 2.6 milyar sterlin olduğu tahmin edilmektedir. Ekonomik ve sosyal maliyeti bir araya geldiğinde, şizofreni dünyanın en sakatlık veren on hastalığından biri halini almaktadır (2).

İkiz çalışmalarından edinilen bilgilere göre, şizofreni yaklaşık %80 oranında genetik geçişlidir (bu oran kalça eklemi osteoartritinde yaklaşık %60 iken, hipertansiyon hastalığında ise %30-50 arasındadır) (12). Bu yüzden bu genetik geçişte rol oynayan, dolayısıyla hastalığa neden olabilecek genetik unsurlar (genler ve gen ürünleri gibi) son yıllarda yoğun anlamda araştırılmaktadırlar. Akrabalık, ikiz ve evlat edinme çalışmaları ile şizofreninin bu derece genetik bir hastalık olduğunun anlaşılmasından sonra araştırmacılar genetik biliminin temellerini oluşturan genler üzerine odaklanmışlardır. Hastalığın ortaya çıkışı ile ilgili genetik çalışmalardan elde edilen veriler şizofrenide erken beyin gelişiminin etkilendiğini göstermektedir. Şizofreni ile ilişkisi olan yapısal genlerin çoğunun nöronal proliferasyon, göç veya sinaps oluşumu ile ilgili nörogelişimsel genler olduğu gösterilmiştir (78). Ayrıca bununla paralel olarak da aşağıda sayılan nedenlerden ötürü de şizofreninin nörogelişimsel bir hastalık olduğu daha da netleşmiştir:

- ❖ Şizofreni geliştiren çocuklarda gelişimsel süreç boyunca prefrontal olarak aşırı eksitator sinaptik budanma ve inhibitör sinapslar açısından da nöronlar arası düşmüş aktivite dikkat çekmektedir. Böylece şizofrenide prefrontal kortekste gelişimsel süreç boyunca

eksitator-inhibitör denge bozulmuş olur. Ayrıca miyelinizasyonda da azalma dikkati çeken unsurlardandır (73)

- ❖ Çocukluk çağı şizofreni hastası beyin görüntüleme çalışmalarına göre Gri Madde kaybının şizofrenili çocuklarda sağlıklı akranlarına göre çok daha fazla olduğunu gösterilmiştir (74)
- ❖ Şizofreni hastalarında akuadukt stenozu, araknoid ve septal kistler, korpus kallozum agenezisi ve yokluğu, normal yapısal serebral asimetrier gibi erken beyin gelişiminde görülen morfolojik anormallikler daha yüksek oranda görülmektedir(75)
- ❖ İleride şizofreni olacak çocuklarda IQ' nun erken yaşlarda ve devamlı olarak düştüğü gösterilmiştir (77)
- ❖ Beyin gelişimini düzenleyen DISC1 ve NRG1 gibi genlerin pre ve perinatal fare beyinlerinde susturulması bu canlılarda erken yetişkinlik döneminde şizofrenideki gibi nörokimyasal ve davranışsal bozukluklara neden olmuştur (79)
- ❖ Şizofreni genetiği ile otizm ve diğer farklı nörogelişimsel hastalıkların genetik yapısı örtüşmektedir (80,81)

Yukarıda nedenleriyle anlatıldığı gibi şizofreni nörogelişimsel bir hastalıktır ve aşağıdaki kanıtlardan da anlaşıldığı gibi bu nörogelişimsel süreci gen ekspresyonundaki değişiklikleriyle Wnt sinyal yolağı düzenler (90-92,95).

- Wnt sinyal yolağının anahtar bileşenlerinden biri GSK-3 enzimidir (96,97) ve şizofreni hastalarının post-mortem prefrontal korteksinde GSK-3β mRNA seviyesi %36, GSK-3β protein seviyesi %41 ve GSK-3 aktivitesi de %45 oranında düşmektedir (98-100)
- Şizofreni hastalarının post-mortem hipokampusunda Wnt sinyal yolağının önemli bileşenlerinden olan sitoplazmik β ve γ-katenin seviyesi düşmekte (95) ve Wnt-1' in ekspresyonu artmaktadır (101)
- Şizofrenide antipsikotikler ve psikomimetikler direk Wnt sinyal yolağını etkilerler (61,102).

Yukarıda anlatılan nedenlerden ötürü şizofreniyi nörogelişimsel bir hastalık olarak kabul edip Wnt sinyal mekanizması üzerine araştırma yapmayı tercih ettik. Özellikle bu sinyal yolağının elemanlarından olan KREMEN gen ailesi ve proteinleri sinyal mekanizmasını çift yönlü (pozitif ve negatif) kontrol etmesinden dolayı dikkatimizi çekti. Ayrıca şizofreni için yapılmış olan bir genetik bağlantı analizi çalışmasında KREMEN1 genini de içeren 22q12-q13.1 bölgesinin bu hastalığa yatkınlık için önemli olduğu vurgulanmıştı (115). Ayrıca fare

embriyosu gelişimsel sürecinde iki KREMEN geninin ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada, KREMEN2 ye göre KREMEN1 geninin beyin ve nöron gelişimi ile ilgili aşamalarda daha ön planda olduğu gösterilmişti (116). Son olarak da, Japon popülasyonunda yapılmış bir allel-temelli genetik ilişki çalışmasında KREMEN1 genindeki bir SNP' in (rs713526) (117) şizofreni riskini modüle edebileceği rapor edilmişti (118).

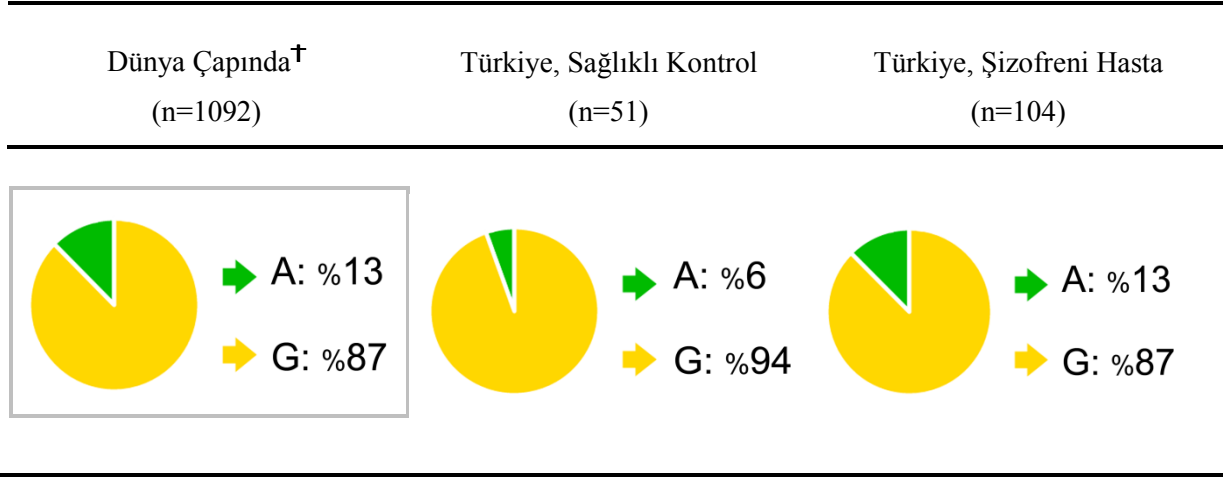
Bu nedenlerden ötürü biz de şizofreni hastalığıyla KREMEN1 geninin yakından ilişkili olabileceğini düşünüp daha önce bu gen üzerinde tanımlanmış rs713526, rs116100643 ve rs201088346 SNP' lerini içeren gen dizisi bölgesini PCR ile amplifiye edip dizi analizi yaptık. Şizofreni olgusu (n=104) ve sağlıklı kontrol (n=51) gruplarından oluşan örneklemde, dizi analizi sonuçlarına göre genotipler belirlendi ve allel frekansları hesaplandı. Ardından KREMEN1 geninin ilgili bölgesindeki varyasyonlar, şizofreniye yatkınlık için etken olarak düşünülen genotipler bakımından istatistiksel değerlendirmeler yapıldı.

Amplifiye ettiğimiz bu bölgede literatürde daha önce tanımlanmış iki varyasyona (rs116100643 ve rs201088346) bizim örneklemimizi oluşturan şizofreni hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinde rastlanmamıştır. Popülasyon genetiği çalışmalarında da [1000Genomes(129) ve HapMap(130)] dünya çapında bu varyasyonlar çok nadir gözlenmiştir (örneğin rs116100643 [C>T] de "T" allel frekansı 0.01 dir).

Nispeten yaygın olan rs713526 G>A polimorfizmi bizim örneklemimizi oluşturan şizofreni hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında da farklı oranlarda ve yaygın şekilde rastlanmıştır. Biz rs713526 G>A polimorfizmi ile ilgili kendi örneklemimizden elde ettiğimiz tüm verileri diğer çalışmalar ile de kıyaslayarak değerlendirdik. Aşağıdaki tabloda rs713526 G>A polimorfizmi açısından dünyada tespit edilen allel oranları ile (1000Genomes ve HapMap dan elde edilen veriler ve tabii ki şizofreni hastası olmayan ve seçilmiş sağlıklı kontrol grupları) bizim sağlıklı kontrol ve şizofreni grubumuzda tespit ettiğimiz oranlarını karşılaştırdık (Tablo 23).

Tablo 23: rs713526 G>A polimorfizmi için sağlıklı kontrol ve şizofreni hasta bireylerde saptadığımız allel frekanslarının dünya çapındaki sağlıklı popülasyonlardakiler ile kıyaslanması.

rs713526 G>A polimorfizmi için allel frekansları



[†]Veri 1000 Genomes ve HapMap gibi kapsamlı ve tüm genom popülasyon genetiği projelerinden elde edilmiştir. Dünya çapındaki çeşitli etnik guruplardan seçilmiş sağlıklı bireylerde tüm genom sekanslaması ile varyasyonlar ortaya koyulmuştur (129,130).

Yukarıdaki tabloda “Dünya Çapında” ifadesiyle verilmiş allel frekansları 18 etnik grubun toplam ortalama allel frekansını ifade etmektedir. Ancak etnik gruplar arasında bu varyasyon için allel frekansları açısından büyük farklılıklar da vardır. Örneğin Afrika daki etnik gruplar bu varyasyonu daha yüksek oranda (allel A: %34, G: %66) taşıırken, Avrupa daki etnik gruplar ise bu varyasyonu daha düşük oranda (allel A: %1, G:%99) taşımaktadırlar (129,130). Bizim örneklemimizi oluşturan bireyler tüm Türkiye’yi temsil etmese de (daha ziyade ege bölgesi), saptadığımız allel frekansları dünya ortalamalarına uymaktadır. Ancak kontrol grubu için uymamaktadır. Bu nedenle kesinlikle kontrol grubundaki örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

Ayrıca literatürdeki şizofreni için yapılmış olan bir genetik bağlantı analizi çalışmasında KREMEN1 genini de içeren 22q12-q13.1 bölgesinin bu hastalığa yatkınlık için önemli olduğu vurgulanmıştı (115). Bununla birlikte Japon popülasyonunda yapılmış bir allel-temelli genetik ilişki çalışmasında (örneklemi >3000 birey olan vaka-kontrol çalışması) KREMEN1 genindeki bir SNP’ in (rs713526) şizofreni riskini modüle edebileceği rapor edilmişti (A alleli için p=0,009) (118). Bizim çalışmamızda da rs713526 G>A polimorfizmi şizofreni hasta grubunda sağlıklı kontrole göre daha yüksek oranda gözlemlendi. Ancak, hasta grubunda minor allel olan A’ nın frekansı %13 iken, sağlıklı kontrol grupta %6 olmasına rağmen, bu

frekanslar açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık yoktur [$p=0,06$].

Ayrıca, şizofreni hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu rs713526 G>A polimorfizmini, heterozigot G/A genotipi şeklinde taşımaları açısından kıyaslandığında, şizofreni hastası bireylerin kontrol grubundaki bireylere göre bu genotipi (G/A) daha yüksek oranda taşıdığı görüldü. Şizofreni grubunda G/A genotipine %26 oranında, sağlıklı kontrol grubunda ise %12 oranında rastlanmış olup istatistiki bakımdan anlamlı bir fark vardır ($P=0,042$). Bu bakımdan değerlendirildiğinde bulduğumuz veriler yukarıda bahsedilen literatürleri destekler niteliktedir. Her ne kadar Japon popülasyonunda yapılan bu allel-temelli ilişki analizinde örneklem bizimkinden daha geniş olsa da (>3000 örnek), Türk popülasyonu ($n=155$, 104 şizofreni hasta, 51 sağlıklı kontrol) olarak farklı bir etnik yapıya sahip örneklemde de benzer bulgulara ulaşmak hipotezimizi desteklemektedir.

Diğer taraftan, araştırmamızda DNA dizi analizini yaptığımız gen bölgesi KREMEN1 geninin intronik bölgesindedir. Günümüzde genlerin intronik bölgelerinin de oldukça işlevsel olduğu bilinmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi genin yedi farklı transkripti bulunmasına rağmen bunlardan dört tanesi incelediğimiz varyasyonları kapsayan gen bölgesini içermektedir. Dikkat çekici SNP olan rs713526 bu transkriptlerden ikisinde genin 3' bölgesindeki sekans varyant (downstream gen varyant) olarak, bir transkriptte intron içinde meydana gelen bir transkript varyant (intron varyant) olarak, son olarak da bir tanesinde (ENST00000479755) kodlanmayan RNA'da (non coding RNA) bulunan bir transkript varyant (kodlanmayan RNA varyant) olarak bulunur. SNP' in intron varyant olarak bulunması RNA sıplaysing (*splicing*) mekanizmasına etki etmesi bakımından, kodlanmayan RNA varyant olarak bulunması da transkript sürecinin yönlendirilmesine etki etmesi ve fonksiyonel RNA moleküllerinin (örn. miRNA, tRNA, rRNA gibi ncRNA' ların) yapısına etki etmesi bakımından önemli olabilir. KREMEN1 genindeki bu SNP' in (rs713526) yukarıda sayılan yapısal unsurları etkilenesi, bu unsurlar ile idare edilen sinyal yollarının nörogelişimsel sürece katkısını bozarak şizofreni hastalığına yatkınlık sağlıyor olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şizofreni belirtileri genellikle geç adolesan veya erken yetişkinlikte başlayıp çoğunlukla hayat boyu devam eden ve dünya çapında toplumun yaklaşık %0,5 ila %1 ini etkileyen kronik, güçten düşürücü ciddi ruhsal bir bozukluktur. Hastalık dünya çapında 24 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Şizofreni hastaları okul, iş, aile ve tüm sosyal yaşantılarında ciddi sıkıntılar ile karşılaşır. Hastaların umulan yaşam süreleri normal bireylere göre %20 daha kısadır. Tedavi masrafları ile birlikte de hastalık toplumlara oldukça fazla bir yük oluşturur. İkiz ve evlat edinme çalışmalarından elde edilen veriler hastalığın yaklaşık %80 oranında genetik geçişli olduğunu ortaya koymaktadır. Hangi genlerin şizofreninin patogeneze özellikle katkı sağladığının araştırılmasıyla eş zamanlı olarak hastalığın temellerine dair hipotezlere yönelik ciddi kanıtlar da ortaya koyulmuştur. Bu bakımdan günümüzde birçok araştırmacı tarafından kabul edilen düşünce şizofreninin nörogelişimsel bir hastalık olduğudur. Pre ve peri-natal dönemden itibaren genler tarafından regüle edilen sinyal mekanizmalarının işlevlerindeki bozukluklar nedeniyle hastalığın ilerleyen yıllarda kendini gösterdiği düşünülmektedir. Birçok araştırmadan elde edilen veriler nörogelişimde çok önemli bir yeri olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının şizofreni patogenezeinden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Biz araştırmamızda bu sinyal yolağını iki yönlü (hem pozitif hem de negatif) ve oldukça efektif şekilde etkileyen bir gen olan KREMEN1' i inceledik. Örneklemimizi oluşturan şizofreni hasta (n=104) ve sağlıklı kontrol (n=51) grubundaki bireylerde KREMEN1 geninin incelemek istediğimiz SNP'leri (rs713526, rs116100643 ve rs201088346) içeren bölgesini PCR' da amplifiye edip DNA dizi analizi yaptık. Ayrıca daha önce literatürde o bölge için dizayn edilmiş bir primer çifti bulunmadığından, ilk kez tarafımızdan primerler dizayn edildi ve optimize edilmiş oldu. Buna ek olarak, bu araştırma KREMEN1 geni ile ilgili Türkiye' de yapılan ilk araştırmadır.

Araştırmada sonuç olarak, yaygın olmayan rs116100643 ve rs201088346 SNP'lerine örnekleme rastlanmayıp, nispeten yaygın olan rs713526 G>A polimorfizmi açısından popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşıldı. Bu araştırmadan elde edilen en önemli sonuç ise, şizofreni hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubunun rs713526 G>A polimorfizmini heterozigot G/A genotipi şeklinde taşımaları açısından kıyaslandığında, şizofreni hastası bireylerin kontrol grubundaki bireylere göre bu genotipi (G/A) daha yüksek oranda taşıdığıdır. Şizofreni hasta grubunda G/A genotipine %26 oranında, sağlıklı kontrol

grubunda ise %12 oranında rastlanmış olup, bu bakımdan her iki grup arasında istatistiki bakımdan anlamlı bir fark vardır ($P=0,042$).

Bu veriler ile birlikte tezin başında sıralanan amaç ve hedeflere eksiksiz şekilde ulaşıldı. KREMEN1 geninde bulunan rs713526 G>A polimorfizminin şizofreni hasta grubunda sağlıklı kontrole göre daha yüksek oranda bulunması, bu genin ve barındırdığı bu varyasyonun nörogelişimsel bir hastalık olan şizofreni için risk teşkil ettiği ve şizofreniye yatkınlıkla ilişkisinin olduğu hipotezimizi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak yaptığımız araştırma bir çeşit allel-temelli genetik ilişki çalışması olup, KREMEN1 genindeki rs713526 G>A polimorfizminin literatürle paralel şekilde Türk popülasyonunda da şizofreni riskini modüle edebileceği gösterildi. Şizofreniyle ilişkili olabilecek bu varyasyon ile diğer genlerin ya da varyasyonların hastalığa etkisi birlikte değerlendirilerek daha ileri genetik ve moleküler biyolojik çalışmalar yapılmalıdır. Sonuçlarımız şizofreninin bu lokus ile ilişkisini vurgulamakta fikir verici olsa da, daha farklı etnik gruplardaki bireylerden oluşan ve kalabalık bir örneklem ile bu araştırma tekrarlanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Freedman R. Schizophrenia. N Engl J Med. 2003 Oct 30;349(18):1738-49. Review. PubMed PMID: [14585943](#).
2. Mueser KT, McGurk SR. Schizophrenia. Lancet. 2004 Jun 19;363(9426):2063-72. Review. PubMed PMID: [15207959](#).
3. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. Schizophr Res. 2009 May;110(1-3):1-23. doi: 10.1016/j.schres.2009.03.005. Epub 2009 Mar 27. Review. PubMed PMID: [19328655](#).
4. Horrobin DF. Schizophrenia: the illness that made us human. Med Hypotheses. 1998 Apr;50(4):269-88. PubMed PMID: [9690763](#).
5. Kyziridis TC. Notes on the history of schizophrenia. German J Psychiatry 2005; 8: 42-48
6. Stone MH. History of Schizophrenia and Its Antecedents. In: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO, editors. The American Psychiatric Publishing textbook of schizophrenia. 1st ed. Washington, DC. American Psychiatric Publishing, Inc. 2006; 1-17
7. Gottesman, I.I. Schizophrenia genesis: the origins of madness. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA 1991. [PMC1683109](#)
8. Sato M. Renaming schizophrenia: a Japanese perspective. World Psychiatry 2006; 5: 53–55. [PMC1472254](#)
9. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. Epidemiol Rev 2008; [30: 67–76](#).
10. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. PLoS Med. 2005 May;2(5):e141. Epub 2005 May 31. Review. PubMed PMID: [15916472](#)
11. Eaton WW. Epidemiology. In: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO, editors. The American Psychiatric Publishing textbook of schizophrenia. 1st ed. Washington, DC . American Psychiatric Publishing, Inc. 2006; 17-37
12. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. Lancet. 2009 Aug 22;374(9690):635-45. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60995-8. Review. PubMed PMID: [19700006](#).
13. Castle DJ, Wessely S, Murray RM. Sex and schizophrenia: effects of diagnostic stringency, and associations with and premorbid variables. Br J Psychiatry. 1993 May;162:658-64. PubMed PMID: [8149118](#).

14. http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/ , 2012
15. Binnay T, Ulas H, Elbi H, Alptekin K. Türkiye’de Psikoz Epidemiyolojisi: Yaygınlık Tahminleri ve Basvuru Oranları Uzerine SistematiK Bir Gozden Gecirme. Turk Psikiyatri Dergisi. 2011; 22(1):40-52.
16. Häfner H, an der Heiden W. Epidemiology of schizophrenia. Can J Psychiatry. 1997 Mar;42(2):139-51. Review. PubMed PMID: [9067063](#).
17. McGrath JJ, Hearle J, Jenner L, Plant K, ve ark. The fertility and fecundity of patients with psychoses. Acta Psychiatr Scand. 1999 Jun;99(6):441-6. PubMed PMID: [10408266](#).
18. Murray RM, Van Os J. Predictors of outcome in schizophrenia. J Clin Psychopharmacol. 1998 Apr;18(2 Suppl 1):2S-4S. PubMed PMID: [9555609](#).
19. Castle DJ, Abel K, Takei N, Murray RM. Gender differences in schizophrenia: hormonal effect or subtypes? Schizophr Bull. 1995;21(1):1-12. Review. PubMed PMID: [7770731](#).
20. Angermeyer MC, Kühn L, Goldstein JM. Gender and the course of schizophrenia: differences in treated outcomes. Schizophr Bull. 1990;16(2):293-307. PubMed PMID: [2374885](#).
21. Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. Arch Gen Psychiatry. 2003 Jun;60(6):565-71. PubMed PMID: [12796219](#).
22. Roy MA, Maziade M, Labbé A, Mérette C. Male gender is associated with deficit schizophrenia: a meta-analysis. Schizophr Res. 2001 Mar 1;47(2-3):141-7. PubMed PMID: [11278131](#).
23. Beauchamp G, Gagnon A. Influence of diagnostic classification on gender ratio in schizophrenia - a meta-analysis of youths hospitalized for psychosis. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 2004 Dec;39(12):1017-22. PubMed PMID: [15583911](#).
24. Kraepelin E. Dementia praecox and paraphrenia. New York: Krieger, 1971
25. Bleuler E. Dementia praecox or the group of schizophrenias. New York: International Universities Press, 1950.
26. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: WHO, 1992.

27. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV), fourth edn. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
28. Peralta V, Cuesta MJ. The nosology of psychotic disorders: a comparison among competing classification systems. *Schizophr Bull.* 2003;29(3):413-25. PubMed PMID: [14609237](#).
29. Erlenmeyer-Kimling L. Early neurobehavioral deficits as phenotypic indicators of the schizophrenia genotype and predictors of later psychosis. *Am J Med Genet.* 2001 Jan 8;105(1):23-4. PubMed PMID: [11424986](#).
30. Huber G, Gross G, Schüttler R, Linz M. Longitudinal studies of schizophrenic patients. *Schizophr Bull.* 1980;6(4):592-605. PubMed PMID: [7444391](#).
31. Yung AR, McGorry PD. The prodromal phase of first-episode psychosis: past and current conceptualizations. *Schizophr Bull.* 1996;22(2):353-70. Review. PubMed PMID: [8782291](#).
32. Liddle PF. The symptoms of chronic schizophrenia. A re-examination of the positive-negative dichotomy. *Br J Psychiatry.* 1987 Aug;151:145-51. PubMed PMID: [3690102](#).
33. Sayers SL, Curran PJ, Mueser KT. Factor structure and construct validity of the scale for the assessment of negative symptoms. *Psychol Assess* 1996; 8: 269–80.
34. Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? *Schizophr Bull.* 2000;26(1):119-36. Review. PubMed PMID: [10755673](#).
35. McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet.* 1995 Sep 9;346(8976):678-82. PubMed PMID: [7658823](#).
36. Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, et al. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry.* 1999 Feb;56(2):162-8. PubMed PMID: [10025441](#).
37. Thaker GK, Carpenter WT Jr. Advances in schizophrenia. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):667-71. Review. PubMed PMID: [11385502](#).
38. Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet.* 2003 Feb 1;361(9355):417-9. Review. PubMed PMID: [12573388](#).

39. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002 Jul;159(7):1080-92. PubMed PMID: [12091183](#).
40. Brown AS, Susser ES. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2008 Nov;34(6):1054-63. doi: 10.1093/schbul/sbn096. Epub 2008 Aug 4. PubMed PMID: [18682377](#)
41. Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, ve ark. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 Feb;65(2):146-52. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2007.20. PubMed PMID: [18250252](#).
42. Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2006 Apr;32(2):200-2. Epub 2006 Feb 9. PubMed PMID: [16469941](#).
43. Welham J, Isohanni M, Jones P, McGrath J. The antecedents of schizophrenia: a review of birth cohort studies. *Schizophr Bull*. 2009 May;35(3):603-23. doi: 10.1093/schbul/sbn084. Epub 2008 Jul 24. Review. PubMed PMID: [18658128](#)
44. Woodberry KA, Giuliano AJ, Seidman LJ. Premorbid IQ in schizophrenia: a meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2008 May;165(5):579-87. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07081242. Epub 2008 Apr 15. PubMed PMID: [18413704](#).
45. Tarbox SI, Pogue-Geile MF. Development of social functioning in preschizophrenia children and adolescents: a systematic review. *Psychol Bull*. 2008 Jul;134(4):561-83. doi: 10.1037/0033-2909.34.4.561. Review. PubMed PMID: [18605820](#).
46. Cannon M, Caspi A, Moffitt TE, Harrington H ve ark. Evidence for early-childhood, pan-developmental impairment specific to schizophreniform disorder: results from a longitudinal birth cohort. *Arch Gen Psychiatry*. 2002 May;59(5):449-56. PubMed PMID: [11982449](#).
47. Reichenberg A, Weiser M, Rabinowitz J, Caspi A, ve ark. A population-based cohort study of premorbid intellectual, language, and behavioral functioning in patients with schizophrenia, schizoaffective disorder, and nonpsychotic bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2002 Dec;159(12):2027-35. PubMed PMID: [12450952](#).
48. Zammit S, Allebeck P, David AS, Dalman C, ve ark. A longitudinal study of premorbid IQ Score and risk of developing schizophrenia, bipolar disorder, severe depression, and

- other nonaffective psychoses. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Apr;61(4):354-60. PubMed PMID: [15066893](#).
49. March D, Hatch SL, Morgan C, ve ark. Psychosis and place. *Epidemiol Rev* 2008; 30: 84–100.
 50. Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1039-46. PubMed PMID: [11695950](#).
 51. Krabbendam L, van Os J. Schizophrenia and urbanicity: a major environmental influence conditional on genetic risk. *Schizophr Bull*. 2005 Oct;31(4):795-9. Epub 2005 Sep 8. Review. PubMed PMID: [16150958](#).
 52. Veling W, Susser E, van Os J, Mackenbach JP, ve ark. Ethnic density of neighborhoods and incidence of psychotic disorders among immigrants. *Am J Psychiatry*. 2008 Jan;165(1):66-73. Epub 2007 Dec 17. PubMed PMID: [18086750](#).
 53. Cantor-Graae E, Selten JP. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry*. 2005 Jan;162(1):12-24. Review. PubMed PMID: [15625195](#).
 54. Veling W, Hoek HW, Wiersma D, Mackenbach JP. Ethnic identity and the risk of schizophrenia in ethnic minorities: a case-control study. *Schizophr Bull*. 2010 Nov;36(6):1149-56. doi: 10.1093/schbul/sbp032. Epub 2009 May 8. PubMed PMID: [19429842](#)
 55. Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull*. 2005 Jul;31(3):608-12. Epub 2005 Jun 23. PubMed PMID: [15976013](#).
 56. Barnes TR, Mutsatsa SH, Hutton SB, Watt HC, ve ark. Comorbid substance use and age at onset of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2006 Mar;188:237-42. PubMed PMID: [16507965](#).
 57. Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, ve ark. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ*. 2002 Nov 23;325(7374):1212-3. PubMed PMID: [12446537](#)
 58. van Os J, Bak M, Hanssen M, Bijl RV, ve ark. Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am J Epidemiol*. 2002 Aug 15;156(4):319-27. PubMed PMID: [12181101](#).

59. Weiser M, Reichenberg A, Rabinowitz J, Kaplan Z, ve ark. Self-reported drug abuse in male adolescents with behavioral disturbances, and follow-up for future schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2003 Sep 15;54(6):655-60. PubMed PMID: [13129661](#).
60. Keefe RS, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, ve ark. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jun;64(6):633-47. PubMed PMID: [17548746](#).
61. Alimohamad H, Sutton L, Mouyal J, Rajakumar N, ve ark. The effects of antipsychotics on beta-catenin, glycogen synthase kinase-3 and dishevelled in the ventral midbrain of rats. *J Neurochem*. 2005 Oct;95(2):513-25. Epub 2005 Sep 2. PubMed PMID: [16144542](#).
62. Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*. 2007 May;30(5):188-93. Epub 2007 Mar 26. Review. PubMed PMID: [17368565](#).
63. Javitt DC, Laruelle M. Neurochemical theories. In: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO, editors. *The American Psychiatric Publishing textbook of schizophrenia*. 1st ed. Washington, DC . American Psychiatric Publishing, Inc. 2006; 1-17
64. Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004 Mar;7 Suppl 1:S1-5. Review. PubMed PMID: [14972078](#).
65. Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan;10(1):40-68; image 5. Review. Erratum in: *Mol Psychiatry*. 2005 Apr;10(4):420. *Mol Psychiatry*. 2005 Aug;10(8):804. PubMed PMID: [15263907](#).
66. Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophr Res*. 2008 Dec;106(2-3):89-107. doi: 10.1016/j.schres.2008.07.020. Epub 2008 Sep 16. Review. PubMed PMID: [18799287](#).
67. Marengo S, Weinberger DR. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol*. 2000 Summer;12(3):501-27. Review. PubMed PMID: [11014750](#).
68. Feinberg I. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res*. 1982-1983;17(4):319-34. PubMed PMID: [7187776](#).

69. Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1987 Jul;44(7):660-9. PubMed PMID: [3606332](#)
70. Murray RM, Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 September 19; 295(6600): [681-682](#).
71. Murray RM, Jones P, O'Callaghan E. Fetal brain development and later schizophrenia. *Ciba Found Symp*. 1991;156:155-63; discussion 163-70. Review. PubMed PMID: [1855409](#).
72. Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*. 2008 Dec;9(12):947-57. Epub 2008 Nov 12. Review. PubMed PMID: [19002191](#)
73. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):187-93. PubMed PMID: [21068826](#).
74. Thompson PM, Vidal C, Giedd JN, Gochman P, et al. Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11650-5. PubMed PMID: [11573002](#)
75. Sharma T, Lancaster E, Sigmundsson T, Lewis S, et al. Lack of normal pattern of cerebral asymmetry in familial schizophrenic patients and their relatives--The Maudsley Family Study. *Schizophr Res*. 1999 Nov 30;40(2):111-20. PubMed PMID: [10593451](#).
76. Sørensen HJ, Mortensen EL, Schiffman J, Reinisch JM, et al. Early developmental milestones and risk of schizophrenia: a 45-year follow-up of the Copenhagen Perinatal Cohort. *Schizophr Res*. 2010 May;118(1-3):41-7. Epub 2010 Feb 23. PubMed PMID: [20181463](#).
77. Reichenberg A, Caspi A, Harrington H, Houts R, et al. Static and dynamic cognitive deficits in childhood preceding adult schizophrenia: a 30-year study. *Am J Psychiatry*. 2010 Feb;167(2):160-9. Epub 2010 Jan 4. PubMed PMID: [20048021](#).
78. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008 Apr 25;320(5875):539-43. Epub 2008 Mar 27. PubMed PMID: [18369103](#).
79. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, et al. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron*. 2010 Feb 25;65(4):480-9. PubMed PMID: [20188653](#)

80. Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietiläinen OP, ve ark. Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 1;18(5):988-96. Epub 2008 Oct 22. PubMed PMID: [18945720](#)
81. Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, ve ark. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry.* 2009 Sep;66(9):947-56. Review. PubMed PMID: [19736351](#)
82. Susser ES, Lin SP. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Arch Gen Psychiatry.* 1992 Dec;49(12):983-8. PubMed PMID: [1449385](#).
83. Xu MQ, Sun WS, Liu BX, Feng GY, ve ark. Prenatal malnutrition and adult schizophrenia: further evidence from the 1959-1961 Chinese famine. *Schizophr Bull.* 2009 May;35(3):568-76. Epub 2009 Jan20. PubMed PMID: [19155344](#)
84. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry.* 2010 Mar;167(3):261-80. Epub 2010 Feb 1. Review. PubMed PMID: [20123911](#).
85. Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, Johnson J, ve ark. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med.* 2009 Oct 22;7:62. PubMed PMID: [19845972](#)
86. AG Hariri, GU Özer, ME Ceylan, N Ceylan, ve ark. Şizofreni etyolojisinde nörogelişimsel hipotez. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 1999; 9(2):99-103
87. Wedenoja, J. Molecular Genetics of Schizophrenia and Related Intermediate Phenotypes in a Founder Population. National Institute for Health and Welfare, Helsinki; Institute for Molecular Medicine Finland FIMM, Helsinki, 2010 ISSN:1798-0062.
88. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, ve ark. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):827-34. PubMed PMID: [18583979](#).
89. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012 Jun 8;149(6):1192-205. Review. PubMed PMID: [22682243](#).
90. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):469-80. Review. PubMed PMID: [17081971](#).

91. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 2009 Oct;136(19):3205-14. doi: 10.1242/dev.033910. Review. PubMed PMID: [19736321](#).
92. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol*. 2006 Jan;21(1):103-24. Review. PubMed PMID: [16267791](#)
93. Nusse R. Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 May 1;4(5). pii: a011163. doi: 10.1101/cshperspect.a011163. Review. PubMed PMID: [22550232](#).
94. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, ve ark. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1245-56. PubMed PMID: [22682247](#).
95. Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S, Brion JP, ve ark. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport*. 1998 May 11;9(7):1379-83. PubMed PMID: [9631433](#).
96. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 2003 Apr 1;116(Pt 7):1175-86. Review. PubMed PMID: [12615961](#)
97. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810. Review. PubMed PMID: [15473860](#).
98. Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3 β immunoreactivity in postmortem frontal cortex of schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*. 2000 May;157(5):831-3. PubMed PMID: [10784483](#).
99. Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3 activity in frontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res*. 2001 Oct 1;52(1-2):101-5. PubMed PMID: [11595396](#).
100. Kozlovsky N, Shanon-Weickert C, Tomaskovic-Crook E, Kleinman JE, ve ark. Reduced GSK-3 β mRNA levels in postmortem dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenic patients. *J Neural Transm*. 2004 Dec;111(12):1583-92. Epub 2004 Jun 30. PubMed PMID: [15565492](#).
101. Miyaoka T, Seno H, Ishino H. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res*. 1999 Jul 27;38(1):1-6. PubMed PMID: [10427605](#).

102. Svenningsson P, Tzavara ET, Carruthers R, Rachleff I, ve ark. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science*. 2003 Nov 21;302(5649):1412-5. PubMed PMID: [14631045](#).
103. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, ve ark. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*. 2008 Mar 15;121(Pt 6):737-46. Review. PubMed PMID: [18322270](#).
104. Ellwanger K, Saito H, Clément-Lacroix P, Maltry N, ve ark. Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol*. 2008 Aug;28(15):4875-82. Epub 2008 May 27. PubMed PMID: [18505822](#).
105. Hassler C, Cruciat CM, Huang YL, Kuriyama S, ve ark. Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development*. 2007 Dec;134(23):4255-63. Epub 2007 Oct 31. PubMed PMID: [17978005](#).
106. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 2006 Dec 4;25(57):7469-81. Review. PubMed PMID: [17143291](#).
107. Wang K, Zhang Y, Li X, Chen L, ve ark. Characterization of the Kremen-binding site on Dkk1 and elucidation of the role of Kremen in Dkk-mediated Wnt antagonism. *J Biol Chem*. 2008 Aug 22;283(34):23371-5. Epub 2008 May 23. PubMed PMID: [18502762](#)
108. Li Y, Lu W, King TD, Liu CC, ve ark. Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS One*. 2010 Jun 8;5(6):e11014. PubMed PMID: [20543981](#)
109. Nakamura T, Aoki S, Kitajima K, Takahashi T, ve ark. Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel kringle-containing transmembrane protein. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Mar 19;1518(1-2):63-72. PubMed PMID: [11267660](#).
110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=kremen> , 2012
111. <http://www.genenames.org/> , 2012
112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> , 2012
113. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index , 2012
114. Zhang Y, Mao B. Embryonic expression and evolutionary analysis of the amphioxus Dickkopf and Kremen family genes. *J Genet Genomics*. 2010 Sep;37(9):637-45. PubMed PMID: [20933216](#).

115. Pulver AE, Karayiorgou M, Wolyniec PS, Lasseter VK, ve ark. Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: Part 1. *Am J Med Genet.* 1994 Mar 15;54(1):36-43. PubMed PMID: [8178837](#).
116. Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development.* 2002 Dec;129(24):5587-96. Erratum in: *Development.* 2003 Jan;130(2):425.. PubMed PMID: [12421700](#).
117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> , 2012
118. Aleksic B, Kushima I, Ito Y, Nakamura Y, ve ark. Genetic association study of KREMEN1 and DKK1 and schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res.* 2010 May;118(1-3):113-7. Epub 2010 Feb 11. PubMed PMID: [20153141](#).
119. <http://www.uniprot.org/> , 2012
120. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298, Mannheim, Germany. DNA Isolation Kit for Mammalian Blood. Cat. no: 11 667 327 001, Version October 2008.
121. Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.nd edition, New York, Cold Spring Harbor Lab. Pres, 2001.
122. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 2003.
123. <http://frodo.wi.mit.edu/> , 2012 (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386).
124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> , 2012
125. <http://www.abmgood.com/PCR/pdfs/Taq%20DNA%20Polymerase.pdf> , 2012
126. Hor K, Taylor M. Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *Journal of Psychopharmacology.* 2010; 24(11) Supplement 4. [81–90](#).
127. Meltzer HY. Suicidality in schizophrenia: a review of the evidence for risk factors and treatment options. *Curr Psychiatry Rep.* 2002 Aug;4(4):279-83. Review. PubMed PMID: [12126596](#).

128. Ryan MC, Thakore JH. Physical consequences of schizophrenia and its treatment: the metabolic syndrome. *Life Sci.* 2002 Jun 7;71(3):239-57. Review. PubMed PMID: [12034344](#).
129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/> , 212
130. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>, 2012

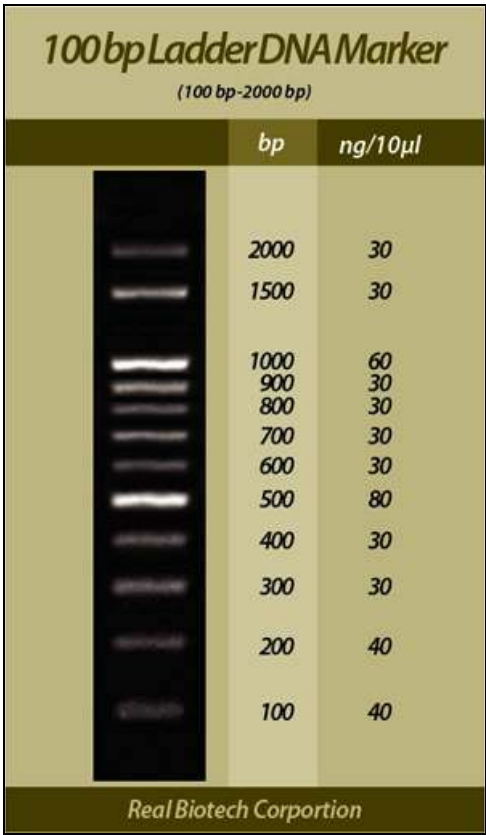
8. EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı

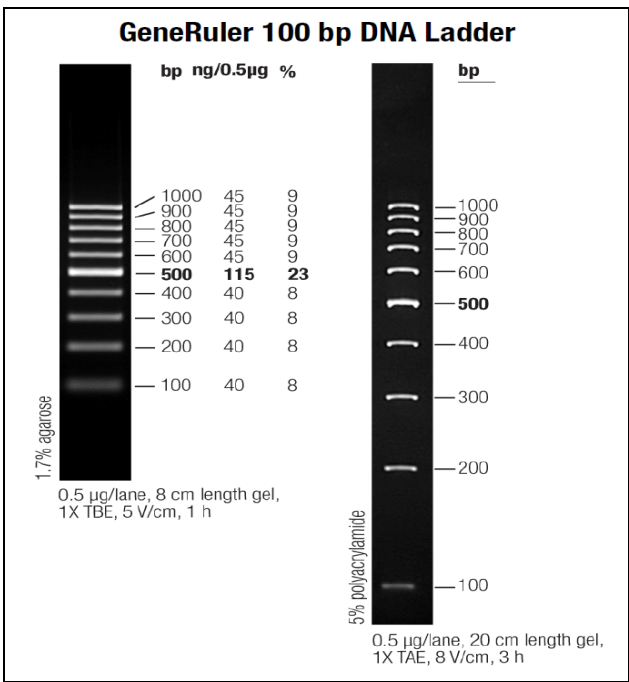
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/11-13	Tarih:07.04.2011				
	Yrd.Doç.Dr.Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU'nun sorumlusu olduğu "Kremen 1 Geninin Şizofreni İle İlişkinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

EK 2: Marker' lar

M₁: 100 bp marker (RBC)

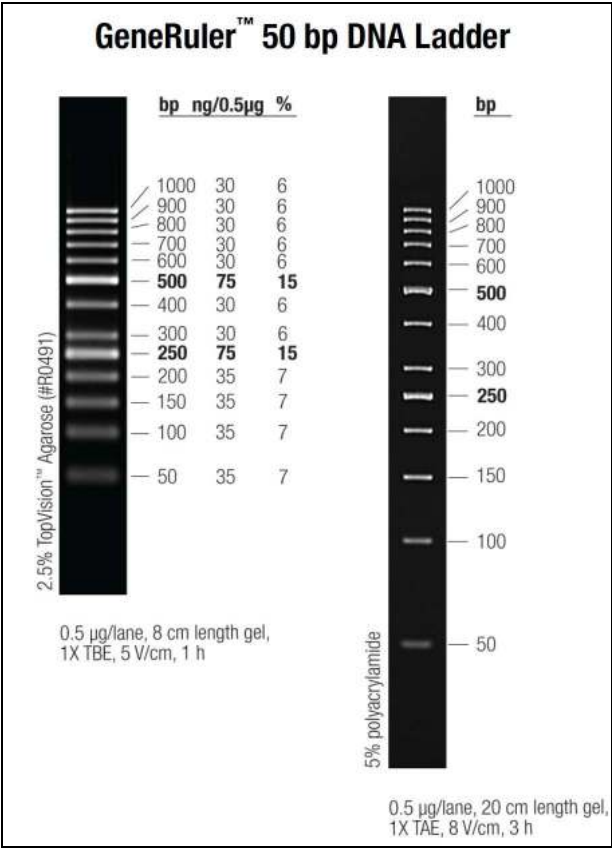


M₂: 100 bp marker (FERM.)



EK 2: Marker' lar (devam)

M₃: 50 bp marker (FERM.)



ÖZGEÇMİŞ

DUA ÖZSOYLU

TC Kimlik No / Pasaport No:	20090471238
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Temel Tıp Bilimleri Binası, 35340, Narlıdere-İZMİR
Telefon :	+90 507 390 85 60
Faks :	-
e-posta :	duaozsoylu@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Ün.	Fen Fakültesi	Biyoloji Lisans	3.13	2009
Türkiye	Dokuz Eylül Ün.	Sağlık Bilimleri Ens.	Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Yüksek Lisans		2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Ege Ün. Biyoloji Bölümü,	Türkiye	İzmir	Botanik Bahçesi ve Herbaryum Uygulama ve Araştırma Merkezi	Danışman	2007-2009
Dokuz Eylül Ün.,	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı	Lab. Çalışanı	2009-2012
HİTİT TIBBİ CİHAZLAR A.Ş.	Türkiye	İzmir	Pazarlama ve Satış Departmanı	Ürün Müdürü	2011-(devam)

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Terapötik Aferez, Plazmaferez, Şizofreni

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu, Vasfi Karatosun, Sefa Kızıldağ, **Dua Özsoylu**, Salih Kavukçu, ACVR1 gene mutations in four Turkish patients diagnosed as fibrodysplasia ossificans progressiva, Gene, Volume 515, Issue 2, 25 February 2013, Pages 444-446, ISSN 0378-1119, 10.1016/j.gene.2012.12.005.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Eresen Yazıcıoğlu Ç, Karatosun V, Kızıldağ S, **Özsoylu D.**, Kavukçu S., 2011. Klinik olarak fibrodisplazi ossifikans progresiva tanısı konulmuş sporadik üç olguda, ACVR1 geni mutasyon analizi. XII.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, 27-30.10. 2011.

Hayta, Ş., Nartop, P., Gürel, A., **Özsoylu, D.** In Vitro Koşullarda Klonal Çoğaltılan Türkiye'ye Özgü Bazı Endemik Tıbbi Bitkilerin Doğaya Yeniden Kazandırılması. Özgün Çözümler Proje Pazarı ve Yarışması, EBİLTEM, 8-9 Aralık 2009, Prof. Dr. Yusuf Vardar Mötbe Kültür Merkezi, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.

Resmi Olarak Halihazırda Çalıştığı Projeleri

Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu tanısı ile sağaltılan ergenlerde izlem çalışması: genetik, klinik gidiş tedavi ve Tc-99m Trodat beyin SPECT sonuçları. Proje süresi: 04/2008-06/2012, Proje yürütücüsü: Doç. Dr. Aynur AKAY.

Yürütücülüğünü Üstlendiği Tamamlanmış Projeleri

Endemik Geven (*Astragalus ptilodes* Boiss. var. *ptilodes*) Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları. Proje süresi: Eylül 2008-Haziran 2009. Proje yürütücüsü: Dua ÖZSOYLU. Proje danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL.(TÜBİTAK 2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı)

Önemli Sertifikaları

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, **Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası.** (80 saatlik kurs programına katılmış ve bu sertifikayı sınav sonucunda resmi olarak almaya hak kazanmıştır).

“EMBL - EBI Uygulamalı Literatür Tarama ve Biyoinformatik Kursu”, sertifikası.