TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ŞİZOFRENİ HASTALARINDA *RASD1* GENİ MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Ceren Damla DURMAZ ÖZDİNÇ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

ANKARA

2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ŞİZOFRENİ HASTALARINDA *RASD1* GENİ MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Ceren Damla DURMAZ ÖZDİNÇ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17L0230012 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2018

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	**: Dr. Ceren Damla Durmaz Özdinç**	**Sınav tarihi:** 01 / 11 / 2018
Anabilim/Bilim Dalı	**: Tıbbi Genetik AD**	
Tez Danışmanı	**: Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi**	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: Şizofreni Hastalarında *RASD1* Geni Mutasyonlarının Araştırılması			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1	☒ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Ferda Emriye PERÇİN
GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Dr. Öğ. Üyesi Halil Gürhan KARABULUT
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Şizofreni kronik seyirli ve tekrarlayan psikozlarla karakterize psikiyatrik bir hastalıktır. Şizofreninin toplumda görülme sıklığı yaklaşık %1 olarak belirtilmektedir. Şizofreni sadece hastalar için değil aynı zamanda aileler ve toplum için de oldukça yıkıcı bir hastalıktır. Multifaktöriyel bir hastalık olan şizofreninin etiyolojisi yapılan çok sayıda araştırmaya rağmen net olarak anlaşılamamıştır. Günümüzde şizofreni tanısında rutin olarak kullanılan biyolojik bir marker bulunmadığından, şizofreni tanısı klinik olarak koyulmaktadır. Bu çalışmanın şizofreni hastalığının etiyolojisinin aydınlatılmasında literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Türkiye Cumhuriyeti'nin ilk üniversitesi unvanını taşıyan Ankara Üniversitesi'nin köklü bir bölümü olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan uzmanlığımı almanın gururunu yaşıyorum. Eğitimim süresince üzerimde çok emeği olan başta Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi olmak üzere, Dr. Öğr. Üyesi Halil G. Karabulut, Dr. Öğr. Üyesi Timur Tuncalı ve Dr. Öğr. Üyesi Nüket Yürür Kutlay ve Öğr. Gör. Dr. Arzu Vicdan hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez konumun belirlenmesinden, proje başvurusuna tezimin her aşamasında çok değerli katkılarını benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi ve engin bilgileri ile özellikle tezimin laboratuvar aşamasında her türlü sorunumu çözen Dr. Öğr. Üyesi Halil G. Karabulut hocalarıma,

Bu tez çalışmasında yapmış olduğu katkılardan dolayı Doç. Dr. Güvem Gümüş Akay ve Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne,

Birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim asistan arkadaşlarım Şule Altıner, Mustafa Gökoğlu, Ezgi Gökpınar İli, Elifcan Taşdelen, İbrahim Kaplan ve Hande Nur Cesur Baltacı'ya,

Dört sene boyunca bir parçası olmaktan mutluluk duyduğum AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın artık ailem gibi gördüğüm tüm çalışanlarına,

Bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan canım anneme, kardeşlerime, bir yerlerden beni izlediğine ve benimle gurur duyduğuna inandığım canım babama,

Her koşulda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen iki gözümün çiçeği sevgilim Nihat'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ceren Damla Durmaz

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER ve KISALTMALAR v
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
TABLOLAR DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Şizofreniye Genel Bakış 3
2.1.1. Şizofreni Tanı Kriterleri 3
2.1.2. Çevresel Risk Faktörleri 4
2.2. Şizofreni Genetiği 5
2.3. Şizofreni Patofizyolojisi ile İlgili Hipotezler 6
2.3.1. Dopaminerjik Hipotez 6
2.3.2. İnternöron Disfonksiyonu 7
2.3.3. Kynurenic Asit Hipotezi 8
2.3.4. İnflamasyon Hipotezi 9
2.3.5. Glutaminerjik Hipotez 11
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. Gereç 22
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 22
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar 22
3.1.3. Solüsyonların Hazırlanması 23
3.2. Yöntem 24
3.2.1. DNA Örneğinin Elde Edilmesi 24
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 24
3.2.3. Jel Elektroforezi 28
3.2.4. PCR Sonrası Temizleme 29
3.2.5. Dizi Analizi Reaksiyonu 29
3.2.6. Dizi Analizi Reaksiyonu Sonrası PCR Ürünü Temizleme 30
3.2.7. Dizi Analizi 30

4. BULGULAR 31
4.1. *RASD1* Geninde Daha Önce Tanımlanmış Olan Varyantlar 40
4.2. *RASD1* Geninde İlk Kez Bu Çalışmada Saptanan Varyant 48
5. TARTIŞMA 49
6. SONUÇLAR 56
ÖZET 58
SUMMARY 59
KAYNAKLAR 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACBD3 : Acyl-Coenzyme A Binding Domain Containing 3

AS : Angelman Sendromu

AÜBAUM : Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi

BSA : Bovine serum albumin

CNV : Kopya sayısı değişiklikleri

CREB : cAMP Response Element Binding Protein

DEXRAS1 : Dexamethasone-induced Ras-related protein 1

DMSO : Dimetil sülfoksit

DMT1 : Divalent metal transporter 1

DSM : The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

eNOS : Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase

EtBr : Etidyum Bromür

ExAC : Exome Aggregation Consortium

GABA : Gamma-aminobütirik asit

GAD67 : Glutamik asit dekarboksilaz 67

GAP : GTPase-Activating Protein

GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor

gnomAD : Genome Aggregation Database

GRE : Glukortikoid Response Element

GWAS : Genom boyu asosiyasyon çalışması

IDO : Indoleamine 2,3-dioksijenaz

IL : Interlökin

iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KAT : Kynurenine aminotranferaz

kDa : Kilodalton

KMO : Kynurenine monooksijenaz

KYNA : Kynurenic asit

MAF : Minör Alel Frekansı

MAPK **:** Mitogen-Activated Protein Kinase

MHC **:** Majör histokompatibilite kompleksi

NMDA **:** N-metil-D-aspartik asit

NMDAR **:** N-metil-D-aspartik asit reseptorü

nNOS **:** Nöronal Nitrik Oksit Sentaz

NO **:** Nitrik Oksit

NOS **:** Nitrik Oksit Sentaz

NOS1 **:** Nitrik Oksit Sentaz 1

NOS1AP **:** Nitrik oksit sentaz-1 adaptör proteini

NRXN1 **:** Neurexin

PCR **:** Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PTB **:** Phosphotyrosine-binding domain

PWS **:** Prader-Willi Sendromu

QUIN **:** Quinolinic asit

RASD1 **:** Ras Related Dexamethasone Induced 1

RPM **:** Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)

SGENE **:** Schizophrenia Genetics Consortium

TBE **:** Tris/Borate/EDTA

TD **:** Touch-Down

TNF **:** Tümör nekrozis faktör

TOPMed **:** Trans-Omics for Precision Medicine

UTR **:** Untranslated Region

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Serebral korteksteki nöron–glia etkileşiminin şematik gösterimi- Owen ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 8

Şekil 2.2. Kynurenine yolağının şematik gösterimi. Mavi oklar aktivasyonu, kırmızı oklar inhibisyonu göstermektedir- Schwarz (2009)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 9

Şekil 2.3. İmmünolojik aracılı psikozun olası mekanizmalarının şematik gösterimi- Khandaker ve ark. (2015)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 10

Şekil 2.4. NOS1'in yapısı ve fonksiyonunun şematik gösterimi- Candemir ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 13

Şekil 2.5. NOS1AP proteininin yapısı ve diğer proteinlerle olan etkileşiminin şematik gösterimi- Wang ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 14

Şekil 2.6. Dexras1 proteini yapısının şematik gösterimi- Thapliyal ve ark. (2014)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 16

Şekil 2.7. RASD1'in adenil siklaz inhibisyonunun şematik gösterimi- Greenwood ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 17

Şekil 2.8. Dexras1 aktivasyonun şematik gösterimi- Thapliyal ve ark. (2014)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 18

Şekil 2.9. Dexras1'in demir metabolizmasındaki rolünün şematik gösterimi- White ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 19

Şekil 2.10. Prepulse inhibisyonun şematik gösterimi- Oral ve ark. (2012)'dan modifiye edilerek alınmıştır. 20

Şekil 4.1. Çalışmamızda saptanan 9 varyantın *RASD1* geni üzerinde şematik gösterimi 31

Şekil 4.2. Hastalarda saptanan varyant kombinasyonlarının grafik olarak gösterilmesi 39

Şekil 4.3. NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. 40

Şekil 4.4. NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T varyantının kapiller elektroforez görüntüsü..... 41
Şekil 4.5. NG_028074.1:g.6147 A>T, NM_016084.4:c.722 A>T varyantının 14 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü..... 42
Şekil 4.6. NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G varyantının 20 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü..... 43
Şekil 4.7. NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T varyantının kapiller elektroforez görüntüsü..... 44
Şekil 4.8. NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C varyantının 20 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü. 45
Şekil 4.9. NG_028074.1:g.6728 G>A, NM_016084.4:c*457 G>A varyantının 56 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü..... 46
Şekil 4.10. NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. 47
Şekil 4.11. NG_028074.1:g.6303 G>A, NM_016084.4:c*32 G>A; varyantının 166 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü..... 48
Şekil 5.1. rs2232839 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 50
Şekil 5.2. rs139149360 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 50
Şekil 5.3. rs550585475 varyantının Polyphen veri tabanında In-siliko analizi ... 51
Şekil 5.4. rs2232841 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 51
Şekil 5.5. rs11545787 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 52
Şekil 5.6. rs111300422 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 52
Şekil 5.7. rs1671822 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği..... 53
Şekil 5.8. rs711352 varyantının Farklı Toplumlardaki Sıklık Grafiği..... 54

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Şizofreni hastası bulunan ailelerde etkilenen bireye yakınlık derecesine göre şizofreninin tekrarlama riski – Nussbaum ve ark. (2015)'ndan alınmıştır. 6

Tablo 3.1. PCR'de kullanılan primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları. 24

Tablo 3.2. Fragman 1 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları 25

Tablo 3.3. Fragman 2 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları 26

Tablo 3.4. Fragman 3 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları 26

Tablo 3.5. Fragman 4 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları 27

Tablo 3.6. Fragman 1 ve 2'nin çoğaltılmasında kullanılan TD PCR koşulları 27

Tablo 3.7. Fragman 3'ün çoğaltılmasında kullanılan PCR koşulları 28

Tablo 3.8. Fragman 4'ün çoğaltılmasında kullanılan TD PCR koşulları 28

Tablo 3.9. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları 29

Tablo 3.10. Dizi analizi reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler 30

Tablo 4.1. Hastalarda saptanan *RASD1* varyantları 32

Tablo 5.1. Saptanan varyantların alel frekansları ve MAF skorları 55

1. GİRİŞ

Şizofreni kronik seyirli ve tekrarlayan psikozlarla karakterize psikiyatrik bir hastalıktır. Şizofreninin yaşam boyu prevalansı yaklaşık %1 olarak belirtilmektedir (Kahn ve ark., 2015). Günümüzde şizofreni tanısında rutin olarak kullanılan biyolojik bir marker bulunmadığından, şizofreni tanısı klinik olarak koyulmaktadır. Post-mortem beyin dokularından yapılan çok sayıda anatomik ve histokimyasal çalışmalara, patolojik incelemelere ve fonksiyonel nöro-görüntülemelere rağmen şizofreninin patogenezi net olarak anlaşılamamıştır. Şizofreninin patofizyolojisine yönelik birçok hipotez oluşturulmuştur. Güncel ve geçerli hipotezlerden birisi de N-methyl-D-aspartat reseptörü (NMDAR) hipofonksiyonudur (Coyle, 2012). Post sinaptik membranda yer alan NMDA reseptörleri geniş bir protein kompleksi ile etkileşim halindedir. Bu kompleksin bileşenlerinden birisi de Dexras1'dir.

Dexras1 (Dexamethasone-induced Ras-related protein 1), *RASD1* geni tarafından kodlanan ras süper ailesine mensup küçük bir GTPazdır. *Rasd1* geni ilk olarak 1998 yılında Kemppainen ve Behrend tarafından fareye ait AtT-20 pituiter hücre serisinde deksametazon ile uyarılabilen bir gen olarak tanımlanmıştır (Kemppainen ve Behrend, 1998). *Rasd1*'in expresyonu glukokortikoid, deksametazon ve beta östradiol gibi steroid hormonların etkisiyle artmaktadır (Thapliyal ve ark., 2014). Dexras1 proteini glutaminerjik post sinaptik aralıkta NOS1AP (Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini) ile etkileşim halindedir. NOS1AP, PDZ bağlanma bölgesi aracılığıyla NOS1 (Nitrik oksit sentaz 1) ile, PTB bölgesi aracılığı ile de Dexras1 ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda Dexras1-NOS1AP-NOS1 üçlü kompleksi oluşur (Fang ve ark., 2000). NOS1, NMDAR aracılı kalsiyum akışı ile aktive olur ve nitrik oksit üretilir. Oluşan NO Dexras1'in S-Nitrozilasyonunu sağlar ve Dexras1 aktive olur (Thapliyal ve ark., 2014).

Dexras1 gerek daha önce şizofreni ile ilişkisi gösterilmiş NOS1, NOS1AP ve NMDAR ile olan yakın ilişkisi, gerekse proteinin fonksiyonuna yönelik yapılan çalışmalarda gösterilen demir homeostazı üzerinden nörotoksisiteye neden olması ile şizofreni etiyolojisinde rol oynama potansiyeli olan bir proteindir (Chen ve ark., 2013). Bir başka dikkat çekici nokta, şizofrenide prepulse inhibisyonun azalmasıdır. *Rasd1*

geni knock-out farelerde yapılan çalışmalarda ise prepulse inhibisyonun arttığı gösterilmiştir (Carlson ve ark., 2016).

Bu çalışmada; Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBAUM) Hücre Serisi Biyobankası'ndan elde edilen 200 şizofreni tanılı hastaya ait DNA materyalinde *RASD1* geni tüm gen dizi analizi yapıldı. Böylelikle, şizofreni hastalığı ile ilişkilendirilen NOS1, NOS1AP, NMDAR gibi moleküller ile yakın ilişkisi bulanan ve daha önce tüm gen dizi analizi ile şizofreni hastalarında hiç araştırılmamış olan *RASD1* geni incelenerek literatüre katkı sağlanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Şizofreniye Genel Bakış

Şizofreni kronik seyirli ve tekrarlayan psikozlarla karakterize psikiyatrik bir hastalıktır. Şizofreninin yaşam boyu prevalansı yaklaşık %1 olarak belirtilmektedir (Kahn ve ark., 2015). Şizofreni sadece hastalar için değil aynı zamanda aileler ve toplum için de oldukça yıkıcı bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından en çok küresel yük oluşturan 10 hastalıktan birisi olarak seçilmiştir (Murray ve Lopez, 1996). Şizofreni hastaları arasında işsizlik oranı %80-90'lara ulaşmaktadır ve yine şizofreni hastalarının beklenen yaşam süreleri normal topluma göre 10-20 yıl daha kısadır (Owen ve ark., 2016).

Şizofreni kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Şizofreni hastalığının kliniği; pozitif semptomlar, negatif semptomlar ve kognitif fonksiyonlarda bozukluk olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır. İşitsel ve görsel halüsinasyonlar, delüzyonlar, konuşma ve davranışlarda bozulmalar, dezorganize düşünme ve her türlü psikotik bulgu pozitif semptom olarak değerlendirilmektedir. İlk psikotik bulgular genellikle geç adölesan veya erken erişkinlik döneminde görülmekle birlikte birçok hastada prodromal faz mevcuttur (Lieberman ve ark., 2001). Anhedoni, afektif küntleşme, sosyal içe kapanma ve enerjide azalma gibi özellikler ise negatif semptomları oluşturur (Andreasen, 1982). Şizofreni hastalarında görülen dikkatin azalması, işlem belleğinde, görsel, sözel öğrenme ve bellekte etkilenme gibi bulgular kognitif fonksiyonların bozulması nedeniyle ortaya çıkar (Nuechterlein ve ark., 2004).

2.1.1. Şizofreni Tanı Kriterleri

Günümüzde şizofreni tanısında rutin olarak kullanılan biyolojik bir marker bulunmadığından, şizofreni tanısı klinik olarak DSM-5 (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) kriterlerine göre koyulmaktadır (Association, 2013). Bu ktiterler şunlardır;

A) Aşağıdaki belirtilerden iki ya da daha fazlası bir aylık sürecin önemli bir kısmında bulunmalıdır. Bunlardan en az birinin aşağıdaki 1, 2 ya da 3. maddeden biri olması gerekir.

1. Sanrılar

2. Varsanılar

3. Darmadağın konuşma

4. İleri derecede dağınık ya da katatonik davranış

5. Negatif belirtiler

B) İş, kişiler arası ilişkiler ya da kendine bakım gibi, bir ya da birden çok ana alanda işlevsellik düzeyi bozulmuştur.

C) Bu belirtiler en az 6 ay sürer. Bu sürenin en az bir aylık dönemi A tanı kriterlerini kapsamaktadır.

D) Şizoaffektif bozukluk ya da psikoz özellikleri gösteren depresyon ve bipolar bozukluk dışlanmalıdır.

E) Bu bozukluk, madde kullanımı ya da başka bir sağlık durumunun etkilerine bağlanamaz.

F) Otizm kapsamında bir bozukluk öyküsü varsa, şizofreni tanısı konulabilmesi için gerekli diğer belirtilerin yanı sıra, belirgin sanrılar ya da varsanılar en az bir aylık bir süreyle varsa, şizofreni tanısı da konur.

Şizofreni hastalığının ayırıcı tanısında şizoaffektif bozukluk, bipolar affektif bozukluk, psikotik majör depresyon, şizotipal kişilik bozukluğu, şizoid kişilik bozukluğu, diğer medikal sebeplere (Wilson hastalığı, sifiliz vb.) veya madde kullanımına bağlı psikoz yer alır. Bu durumlar şizofreni tanı sürecinde dikkatli bir şekilde dışlanmalıdır.

2.1.2. Çevresel Risk Faktörleri

Şizofreni genetik yatkınlık ile birlikte çevresel etkilerin katkı sağladığı, multifaktöriyel, heterojen ve kompleks bir hastalıktır. Etiyolojide etkili olan birçok risk faktörü tanımlanmıştır.

Bunlar;

1) Prenatal ve Perinatal Olaylar

Kış sonu ve bahar başlarında doğan bireylerde şizofreni gelişme riski daha fazladır. Bu durum, kışın hamilelik ve doğum komplikasyonlarının artması, beslenme bozuklukları ve bazı enfeksiyonlara yakalanma riskinin yüksek olması ile ilgilidir.

Yine hemoraji, preterm eylem, hipoksi gibi perinatal olaylar da şizofreni yatkınlığı ile ilişkilendirilmiştir (Clarke ve ark., 2006).

2) Paternal yaş

İleri yaşta baba olan erkeklerin çocuklarında şizofreni gelişmesi riskinin genç yaşta baba olan erkeklerin çocuklarına göre artmış olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Miller ve ark., 2011).

3) Cinsiyet

Erkek / kadın oranı 1.4 civarındadır (Abel ve ark., 2010). Erkeklerde şizofreni başlangıç yaşı ortalama 20-24 iken, kadınlarda yaklaşık 5 yıl daha geç başladığı görülmektedir (Kahn ve ark., 2015).

4) Kentsel Yaşam

Kentsel yaşam koşulları şizofreni riskini arttırmaktadır (Krabbendam ve Van Os, 2005).

5) Göçmenlik

Göçmenlerde daha yüksek oranda şizofreni hastalığının görülüyor olması ayrımcılık ve psikososyal faktörlerle ilişkilendirilmektedir. (Bourque ve ark., 2011).

6) Madde Kullanımı

Epidemiyolojik çalışmalar kanabis kullanımının psikoz gelişimi için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Di Forti ve ark., 2009).

7) Sosyal Zorluklar

2.2. Şizofreni Genetiği

Multifaktöriyel bir hastalık olan şizofreninin kalıtsal yönünün aydınlatılmasına yönelik birçok aile, ikiz ve evlatlık çalışmaları bulunmaktadır. Monozigotik ikiz konkordansı %40-50'lere ulaşmaktadır (Cardno ve ark., 1999). Ailesinde şizofreni hastası bulunan bireylerin, yakınlık derecesine göre değişmekle beraber, topluma göre şizofreni riski artmıştır (Nussbaum ve ark., 2015). Şizofreni hastası bulunan ailelerde etkilenen bireye yakınlık derecesine göre şizofreninin tekrarlama riski Tablo 2.1'de verilmiştir. Şizofreni etiyopatogenezinde rol oynayan genlerin tanımlanmasına yönelik çok sayıda bağlantı analizi ve genom boyu asosiyasyon çalışması (GWAS) mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda birçok lokus ve aday gen belirlenmiş olup, 1. 6. ve 22. kromozomlarda bir yığılım görülmektedir (Butler ve ark., 2016). Ayrıca,

şizofreni ile ilişkili birçok kopya sayısı değişikliği (CNV) bildirilmiştir. Bunlar arasında 1q21.1 delesyon ve duplikasyonları, 2p16.3 Neurexin *(NRXN1*) delesyonu, 15q11.2 delesyonu, AS/PWS duplikasyonları, 15q13.3 delesyonu, 16p11.2 duplikasyonu ve şizofreniyle en sık ilişkilendirilen 22q11.2 delesyonu sayılabilir (Stefansson ve ark., 2008).

Tablo 2.1. Şizofreni hastası bulunan ailelerde etkilenen bireye yakınlık derecesine göre şizofreninin tekrarlama riski – Nussbaum ve ark. (2015)'ndan alınmıştır.

Şizofreni Tanılı Bireyle Yakınlık Derecesi	**Tekrarlama Riski**
Her iki ebeveyni şizofreni hastası olan birey	%46
Hasta bireyin çocuğu	%9-16
Hasta bireyin kardeşi	%8-14
Hasta bireyin yeğeni	%1-4
Hasta bireyin amca/hala/dayı/teyzesi	%2
Hasta bireyin kuzeni	%2-6
Hasta bireyin torunu	%2-8

2.3. Şizofreni Patofizyolojisi ile İlgili Hipotezler

Post mortem beyin dokularından yapılan çok sayıda anatomik ve histokimyasal çalışmalara, patolojik incelemelere ve fonksiyonel nöro-görüntülemelere rağmen şizofreninin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Şizofreninin patofizyolojisine yönelik geliştirilen hipotezler aşağıda sıralanmıştır:

2.3.1. Dopaminerjik Hipotez

Mezolimbik yolakta artmış dopamin aktivitesinin özellikle şizofreninin pozitif semptomlarının altındaki neden olduğuna dayanan bir hipotezdir. Pozitif semptomların tedavisinde etkin olan antipsikotiklerin dopamin antagonisti etkileri ve amfetamin, metilfenidat gibi dopamin aktivitesini arttıran maddelerin psikotik

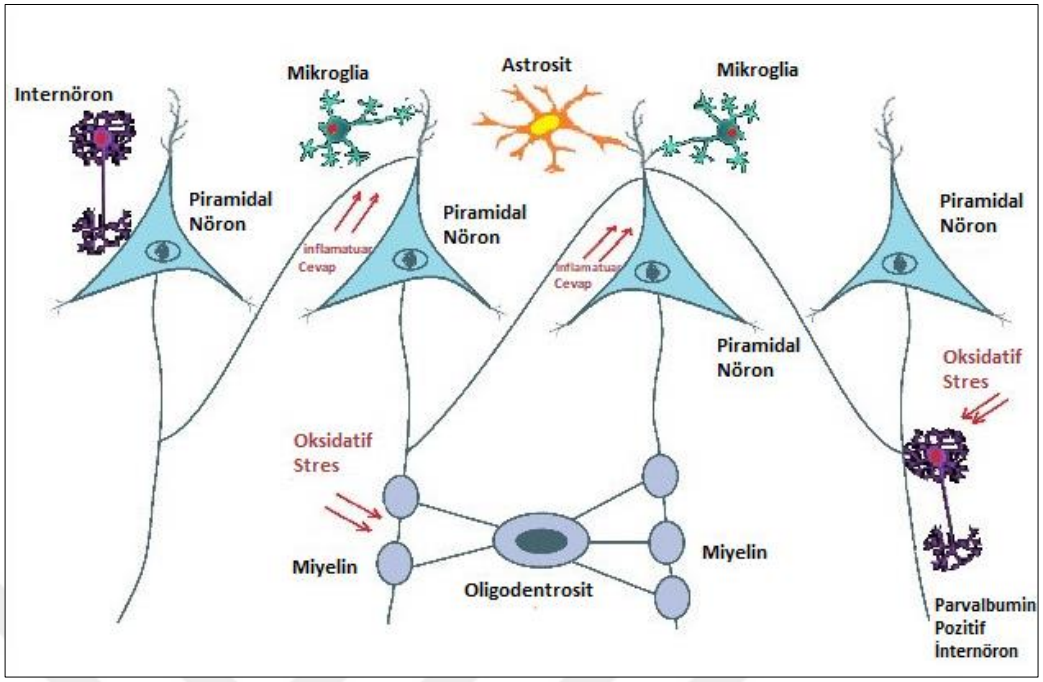
semptomlara yol açması bu hipotezi destekleyen bulgulardır. Mezolimbik yolakta D2 reseptör aktivitesinin artması şizofreninin pozitif semptomları ile ilişkilendirilirken, prefrontal kortekste D1 reseptör hipofonksiyonu ve azalmış dopamin aktivitesi ise negatif ve kognitif semptomlarla ilişkilendirilmiştir (Goldman-Rakic ve ark., 2004).

Yapılan genetik çalışmaların dopamin metabolizması ile ilişkili genleri işaret etmesi dopaminerjik hipotezi kuvvetlendiren bulgulardır. Ancak dopaminerjik hipotez şizofreninin tüm bulgularını özellikle de negatif semptomlarını açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Ayrıca antidopaminerjik etkili tıbbi tedaviler negatif ve kognitif semptomlar üzerinde etkili olamamaktadır. Bütün bunlar dopaminerjik hipotezin şizofreni patogenezini tek başına açıklamaya yetecek bir hipotez olmadığını gösterir niteliktedir.

2.3.2. İnternöron Disfonksiyonu

İnternöronlar inhibitör (GABAerjik) nöronlardır ve eksitatör olan piramidal nöronları regüle ederler. Şizofreni hastalarının post mortem beyin dokularında yapılan çalışmalar, GABA sentezleyen enzim olan glutamik asit dekarboksilaz (*GAD67*) mRNA expresyonunun prefrontal kortekste azaldığını göstermiştir (Gonzalez-Burgos ve ark., 2010).

Bu değişiklik özellikle kalsiyum bağlayan bir protein olan parvalbumini eksprese eden, parvalbumin pozitif internöronları etkiler. Yapılan çalışmalar şizofreni hastalarının parvalbumin pozitif internöronlarında bozukluk olduğunu ve inhibitör nöronlarla eksitatör nöronlar arasındaki dengenin bozulmasının hastalık patogenezinde anahtar rol oynadığını göstermiştir (Şekil 2.1) (Owen ve ark., 2016).

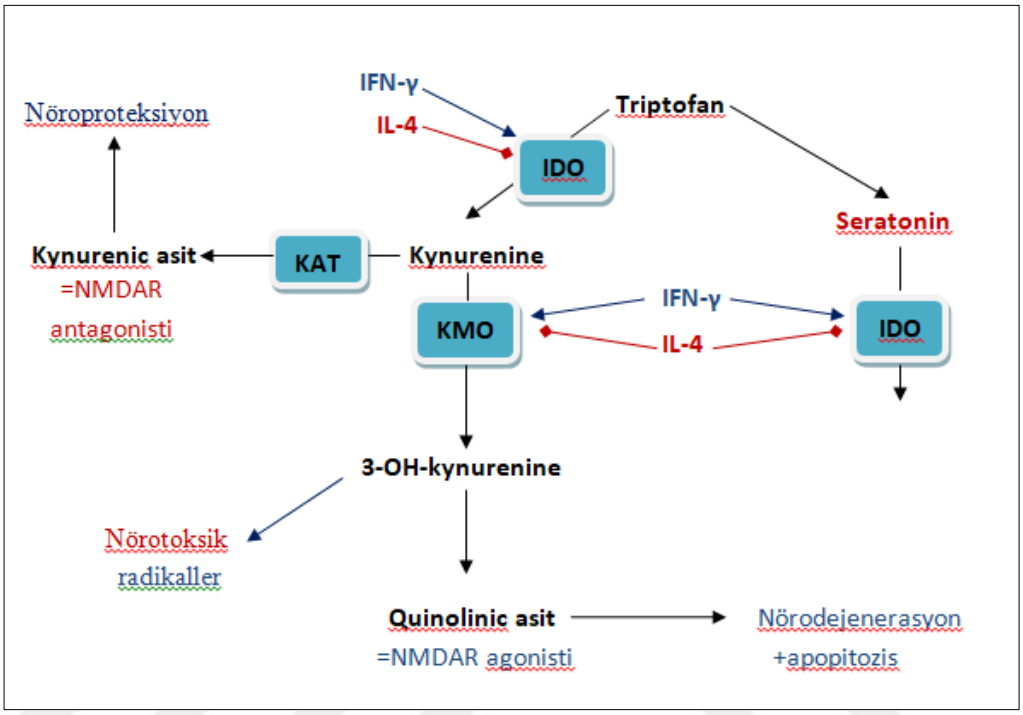


Şekil 2.1. Serebral korteksteki nöron–glia etkileşiminin şematik gösterimi- Owen ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

2.3.3. Kynurenic Asit Hipotezi

Kynurenic asit (KYNA), esansiyel bir aminoasit olan triptofanın "Kynurenine pathway" adı verilen bir yolakta metabolize olması sırasında ortaya çıkan bir üründür. Triptofanın kynurenine yolağı üzerinden metabolize olması sırasında birçok nöroaktif madde açığa çıkar. Kynurenic asit (kynurenine aminotranferaz (KAT) tarafından sentezlenir) NMDA reseptörünün endojen antagonistidir ve nöroprotektiftir. Quinolinic asit (QUIN) ise NMDA reseptör agonistidir. Hem 3-hydroxykynurenine (3OH-kynurenine) hem de QUIN eksitotoksisite ve nörotoksik radikaller üzerinden nörodejenerasyona ve apoptoza yol açar. Kynurenine yolağının anahtar enzimi olan indoleamine 2,3-dioxygenaz (IDO) ve 3-OH-kynurenine'i oluşturan enzim kynurenine monooksijenaz (KMO) ve interferon-γ (IFN-γ) gibi proinflamatuar sitokinler aracılığı ile aktive olurken, interlökin-4 (IL-4) gibi antiinflamatuar sitokinler aracılığı ile inhibe olur (Şekil 2.2).

Yapılan çalışmalar şizofreni hastalarının serebrospinal sıvılarında ve postmortem beyin dokularında KYNA'nın arttığını göstermiştir (Erhardt ve ark., 2009).



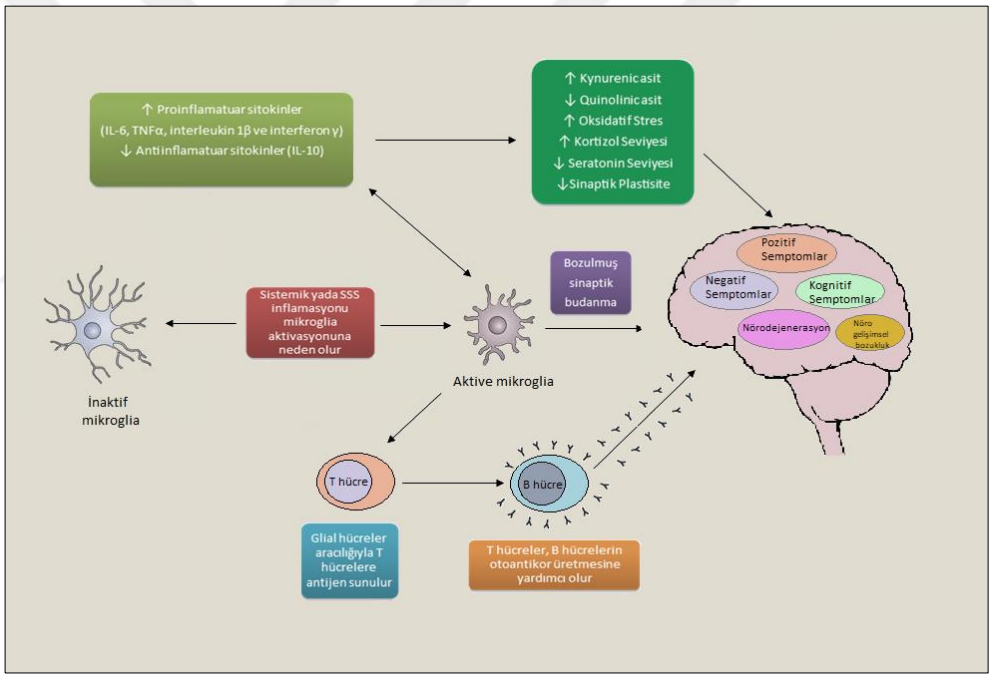
Şekil 2.2. Kynurenine yolağının şematik gösterimi. Mavi oklar aktivasyonu, kırmızı oklar inhibisyonu göstermektedir- Schwarz (2009)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

2.3.4. İnflamasyon Hipotezi

İnflamatuar hipotez şizofreninin etyopatogenezinin aydınlatılmasına yönelik öne sürülen hipotezlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda; şizofreni hastalarında proinflamatuar sitokinler ile antiinflamatuar sitokinlerin arasındaki dengenin proinflamatuar sitokinlerin lehine bozulduğu, IL-6, TNFα, interleukin 1β ve interferon γ proinflamatuar sitokinlerin serum konsantrasyonlarının arttığı, antiinflamatuar sitokinlerden IL-10'un serum konsantrasyonunun ise azaldığı saptanmıştır (Şekil 2.3). Normal şartlarda nöroinflamasyon sonucunda aktive olan mikrogliaların şizofreni hastalarında da aktive olduğu, mikroglial aktivasyonun şizofreni hastalarının

beyinlerindeki gri madde kaybı ve kognitif etkilenme ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Şizofreni hastalarının serumlarında ve serebrospinal sıvılarında çeşitli düzeylerde beyinin farklı bölgelerine, NMDA reseptörlerine ve voltaj kapılı potasyum kanal kompleksine karşı gelişmiş antikor düzeylerinde artma saptanmıştır (Khandaker ve ark., 2015).

Şizofreni genetiğini aydınlatmaya yönelik yapılan 3 büyük GWAS sonucunun (International Schizophrenia Consortium, Molecular Genetics of Schizophrenia ve Schizophrenia Genetics Consortium (SGENE)) işaret ettiği ortak lokuslardan birinin MHC lokusu olması, şizofreninin immun sistemle ilişkisi olduğunu destekleyen bulgulardan birisidir. Yine 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada C4 lokusu ile şizofreni arasında ilişki bulunmuştur (Sekar ve ark., 2016).



Şekil 2.3. İmmünolojik aracılı psikozun olası mekanizmalarının şematik gösterimi- Khandaker ve ark. (2015)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

2.3.5. Glutaminerjik Hipotez

Glutamat santral sinir sistemindeki majör eksitatör nörotransmitterdir. Glutamatın şizofreni patogenezinde yer aldığına dair çalışmalar 1980'lerden beri yapılmaktadır. N-methyl-D-aspartat reseptörü (NMDAR) glutamat kapılı katyon kanallarının bir alt tipidir. Ketamin, fensiklidin gibi NMDAR antagonisti özelliği olan dissosiyatif anesteziklerin sağlıklı bireylerde şizofreninin psikotik, negatif ve kognitif fonksiyonlarını taklit etmesi üzerine NMDAR hipofonksiyonu hipotezi şizofreni patogenezinde yerini almıştır. NMDAR üzerindeki glisin modülatör bölgesi üzerinden NMDAR fonksiyonunu arttıran ajanların, şizofreni hastalarında görülen kognitif ve negatif bulguları gerilettiği gösterilmiştir (Coyle, 2012). Post sinaptik membranda yer alan NMDA reseptörleri geniş bir protein kompleksi ile etkileşim halindedir. Birçok GWAS ve vaka-kontrol çalışmasında glutaminerjik post-sinaptik komponentlerden biri olan nöronal nitrik oksit sentaz (*NOS1*) geni ile şizofreni arasında asosiyasyon gösterilmiştir (Freudenberg ve ark., 2015).

2.3.5.1. NOS1

Nitrik oksit (NO); vazodilatasyon, nörotransmisyon, tümörogenesis ve immun cevap gibi birçok önemli fizyolojik ve patolojik süreçte yer alan gaz yapıda bir sinyal molekülüdür. Nitrik oksit hücre membranını çok kolay geçer ve yarılanma ömrü çok kısadır.

Nitrik oksitin birçok fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar arasında, santral sinir sitemi gelişimi (sinaptik plastisitenin regülasyonu, mediatörlerin salınımı, nöral dokunun gelişimi), damar düz kasının gevşemesi (vazodilatasyon) ve inflamatuar süreçlerdeki önemli rolleri sıralanabilir. NO ikinci haberci olup, cGMP üzerinden etki eder. NO, aynı zamanda bir serbest radikaldir ve eşlenmemiş elektron nedeniyle toksik potansiyeli bulunur. Yüksek konsantrasyonda nitrik oksit, fizyolojik pH'da oldukça güçlü bir oksidan olan peroxynitrite'e (ONOO) dönüşür. Peroxynitrit lipid peroksidasyonunu başlatarak protein, aminoasit ve nükleik asitlerin zarar görmesine neden olabilir.

NO, L-arjininin deaminasyon ile L-sitrüline dönüşümü sırasında açığa çıkar ve bu reaksiyonu katalizleyen enzim nitrik oksit sentazdır. Nitrik oksit sentaz heme-

mono-oksijenaz sitokrom P450 süper ailesine mensuptur. Nitrik oksit sentazın 3 izoformu bulunmaktadır; nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelyal NOS (eNOS). nNOS nitrik oksit sentazın nöronal izoformudur ve *NOS1* geni tarafından kodlanır. Santral sinir sistemindeki NO'nun ana kaynağını nNOS oluşturur.

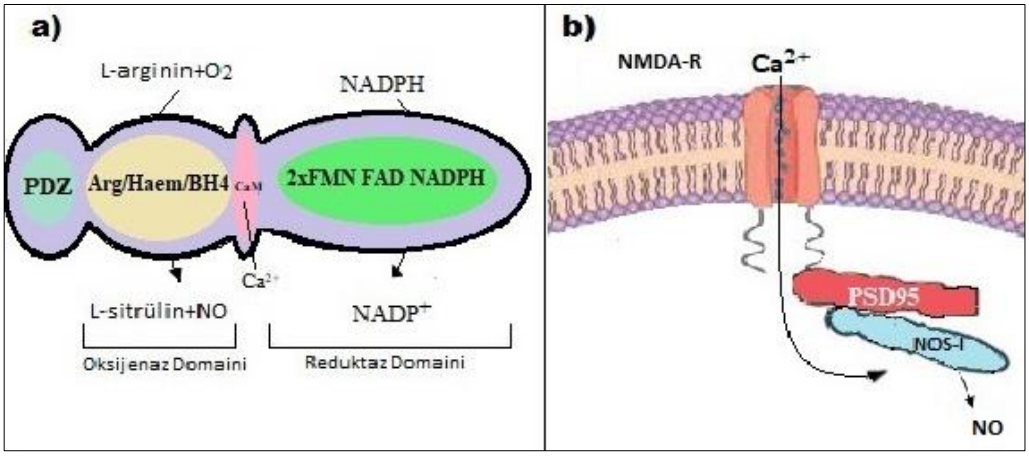
NOS1 geni kromozom 12q24.2-31'de lokalizedir. Yirmi dokuz ekzonlu olan bu genin 11 ayrı promoteri olan 12 alternatif ekzon-1'i mevcuttur ve 1a'dan-1j'ye kadar adlandırılırlar. Alternatif birinci ekzonlar translasyona uğramazlar ve bazı ekzon- 1'ler doku veya hücreye özgüdür örneğin ekzon 1c ve 1f/g beyin dokusunda eksprese olur. Farklı ayıklanma varyantları bulunan *NOS1*geninin, tüm bölgeleri içeren transkripti NOS-1α olup hem PDZ hem de PIN bölgesini içerir (Freudenberg ve ark., 2015).

nNOS homodimer halinde çalışır ve homodimerizasyonu kalsiyum-kalmodülin bağımlıdır. Nöronal izoform nörogelişimsel sürece katılır, retrograd neurotransmitter olarak rol oynar, hafıza ve öğrenme süreçlerinde önemlidir. Birçok proteinle etkileşim içerisindedir. nNOS'un N terminalinde PDZ bölgesi bulunur ve bu bölge aracılığıyla PSD93/95 ve NOS1AP (Nitrik oksit sentaz-1 adaptör proteini) ile etkileşime girer (Courtney ve ark., 2014).

NOS-1'in PDZ bölgesi ile PSD93/95'un PDZ-2 bölgesi etkileşim halindedir. Glutaminerjik post sinapslarda PSD95'in PDZ1/2 bölgesi NMDA reseptörünün GluN2 alt ünitesine bağlanır ve NOS-1'i NMDA reseptörünün proksimal kısmına getirir. Böylece NMDA reseptörü aracılı Ca^{+2}akışı NOS-1'i aktive eder (Candemir ve ark., 2016).

NOS-1'in oksijenaz bölgesi L-arjinin aminasyonunda rol oynar ve bu tepkime sırasında NO açığa çıkar. Redüktaz bölgesi ise NADPH'ın $NADP^{+}$'ya indirgenmesi ile oksijenaz bölgesine elektron sağlar (Şekil 2.5a).

NMDA reseptörleri glutamatla uyarıldığında hücre içine Ca^{+2} akışı meydana gelir, bu Ca^{+2} akışı NOS'ın akvite olmasına ve NO üretimine yol açar (Şekil 2.5b). Üretilen NO guanilatsiklazı aktive eder ve cGMP sentezini arttırır. NO konsantrasyonu, glutaminerjik nörotransmisyon aktivitesini yansıtır.



Şekil 2.4. NOS1'in yapısı ve fonksiyonunun şematik gösterimi- Candemir ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

(a) NOS-I proteini yapısının şematik gösterimi. (b) NMDA reseptorü (NMDA-R) ve NOS-I PDZ bölgeleri aracılığıyla PSD95 ile etkileşim halindedir. NMDA reseptörü aracılığıyla hücre içine Ca^{+2} akışının gerçekleşmesi NOS1'i aktive eder ve NO üretilir (Candemir ve ark., 2016).

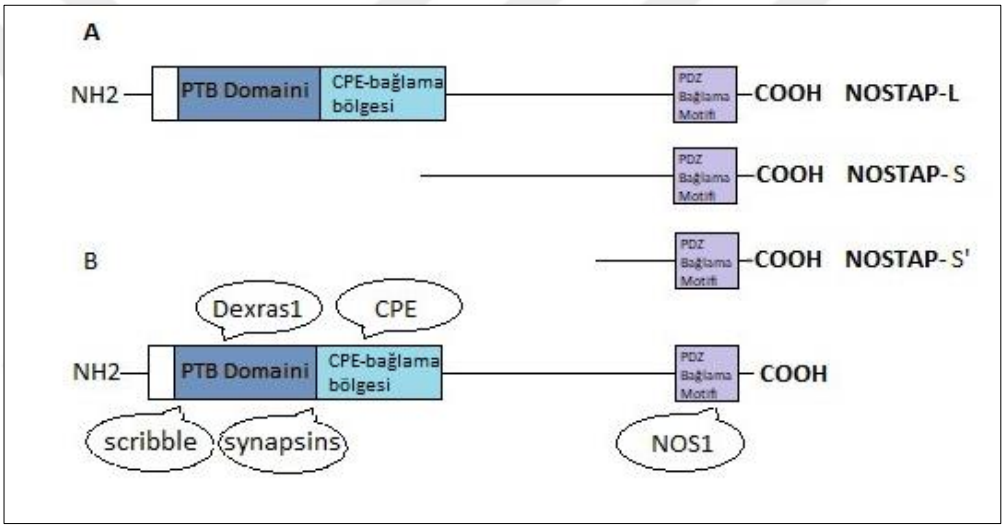
Yapılan çalışmalar sonucunda prefrontal kortekste NOS1 düzeyinin azalması şizofreni etiyopatogenezinde sorumlu tutulmuştur. GWAS ve bağlantı çalışmaları sonucunda da *NOS1* geni şizofreni için aday genlerden birisi olarak belirlenmiştir. Birçok farklı popülasyondaki şizofreni hasta örneklerinde *NOS1*'e ait SNP'ler çalışılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin ekzon 1c'nin promoter bölgesinde yer alan rs41279104 varyantı şizofreni hastalarında anlamlı bulunmuş ve fonksiyonel çalışma sonucunda da *NOS1* gen ekspresyonunu azalttığı ortaya konmuştur (Weber ve ark., 2014).

2.3.5.2. *NOS1AP* (*CAPON*)

Nitrik oksit sentaz 1 adaptör proteini (CAPON); karboksi ucunda PDZ ligand motifi, amino ucunda ise fosfotirozin binding (PTB) motifi içerir. PTB bölgesi aracılığıyla Dexras1, scribble ve sinapsin proteinleriyle, PDZ ligand motifi aracılığıyla da NOS1 ile etkileşime girer ve PSD95 ile yarışır (Şekil 2.6). NOS1AP, dendritik gelişim, hippo yolağı sinyalizasyonu, nNOS üretimi gibi işlevlerde rol oynar. Santral

sinir sisteminde olfaktor bulbus, serebellum ve hipokampusta bol miktarda bulunur. İnsanda bilinen 3 izoformu vardır; uzun form NOS1AP (NOS1AP-L), kısa form NOS1AP (NOS1AP-S) ve NOS1APS'(Wang ve ark., 2016).

NOS1AP'ın uzun formu (NOS1AP-L) amino ucunda PTB (phosphotyrosine-binding) bölgesi içerirken karboksi ucunda PDZ (PSD-95/discs-large/ZO-1) bağlanma motifi içerir. NOS1AP'ın kısa formu (NOS1AP-S) ise yalnızca PDZ-bağlanma motifi içerir. NOS1AP-S', NOS1AP-L'nin trunkasyona uğramış halidir ve PDZ-bağlanma motifi içerir (Şekil 2.6a). Dexras1, scribble ve synapsins PTB bölgesine bağlanırken NOS1 PDZ-bağlanma motifi ile bağlanır (Şekil 2.6b) (Wang ve ark., 2016).



Şekil 2.5. NOS1AP proteininin yapısı ve diğer proteinlerle olan etkileşiminin şematik gösterimi- Wang ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

Yapılan bağlantı analizi çalışmalarında *NOS1AP* geni de şizofreni için aday genler arasında gösterilmiş olup (Brzustowicz, 2008) şizofreni hastalarının post-mortem beyin dokularındaki NOS1AP düzeyinde değişiklikler ortaya konmuştur. Şizofreni hastalarının dorsolateral prefrontal kortekslerinde özellikle NOS1AP-S izoformunun mRNA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir.

2.3.5.3. RASD1

2.3.5.3.1. Ras Süper Ailesi

Ras süper ailesi; korunmuş moleküler yapı ve benzer biyokimyasal özellikler gösteren, 150'den fazla üyesi bulunan küçük GTPazlardan oluşur. Bu süper ailede yer alan proteinlerin genel özellikleri düşük molekül ağırlıklı oluşları (20-30kDa), GTP-bağlayabilme ve hidrolize edebilmeleri, proliferasyon, diferansiyasyon, polarizasyon, adezyon, migrasyon ve apoptosiz gibi hayati hücresel süreçlerin regülasyonunda yer almalarıdır (Wennerberg ve ark., 2005). Ras süper ailesinde yer alan proteinler GTP bağlandığında aktif hale gelirken, GTP GDP'ye hidrolize olduğunda inaktif hale gelir. Bu dönüşümü kontrol eden iki ana grup faktör vardır: Guanin nükleotid değiştirici faktörler (GEFs) ve GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) (Goitre ve ark., 2014). GEF'ler Ras proteinlerinin GTP bağlı aktif forma geçmesini sağlarken, GAP'lar ise inaktif GDP bağlı forma dönüşümü sağlar. Aktif formasyondaki Ras süper ailesi proteinleri, sinyal yolağının alt basamaklarında bulunan efektör proteinlere doğrudan bağlanarak bu proteinleri aktif hale geçirirler.

Ras süper ailesi dizi ve fonksiyon benzerliği ele alınarak 5 ana aileye ve çok sayıda alt aileye ayrılmıştır. Bu beş ana aile şunlardır: Ras, Rho, Rab, Arf ve Ran (Cox ve Der, 2010). Çeşitli türlerdeki diziler karşılaştırıldığında Ras süper ailesindeki tüm küçük GTPaz'larda primer yapının %30-55'inin korunarak benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. GTP-binding domaini ise tüm Ras süper ailesi proteinlerinde ortaktır (Rojas ve ark., 2012).

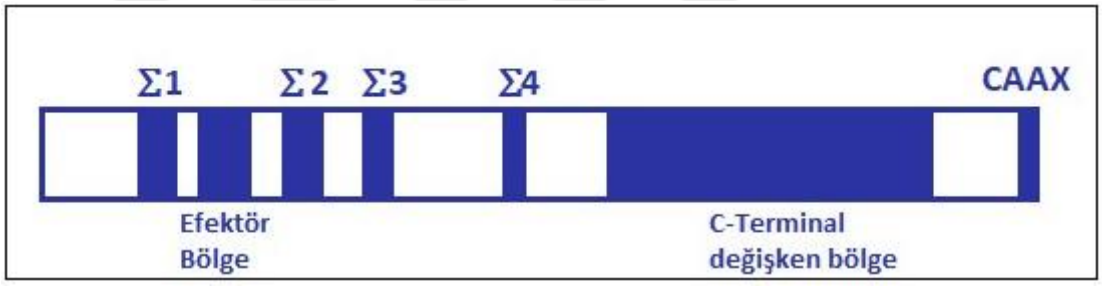
2.3.5.3.1. *RASD1* Geni Yapı ve Fonksiyonları

Rasd1 geni ilk olarak 1998 yılında Kemppainen ve Behrend tarafından fareye ait AtT-20 pituiter hücre serisinde deksametazon ile uyarılabilen bir gen olarak tanımlanmıştır (Kemppainen ve Behrend, 1998). Dexras1 (Dexamethasone-induced Ras-related protein 1), *RASD1* geni tarafından kodlanan ras süper ailesine mensup küçük bir GTPazdır.

RASD1 geni kromozom 17p11.2'de lokalize, evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş, 2 ekzonlu bir gendir. Dexras1 proteini 281 aminoasitten oluşan, diğer Ras

proteinleri ile yaklaşık %35 homoloji gösteren ve belirgin olarak beyin olmak üzere kalp, böbrek ve karaciğerde eksprese olan bir proteindir (Cheng ve Obrietan, 2006).

Dexras1 proteini diğer ras proteinleri gibi guanin nükleotid bağlanma-hidroliz paketi (Σ1–Σ4) ve biyolojik aktivitesi için gerekli protein-protein etkileşimlerini yaptığı effektör bölgeleri içerir (Şekil 2.7). Karboksi ucunda diğer ras proteinlerinde de bulunan CAAX motifi bulunur. Bu motif bir posttranslasyonel lipid modifikasyonu olan prenilasyon için önemlidir. Prenilasyon, Dexras1 proteininin plazma membranındaki lokalizasyonunu sağlar (Thapliyal ve ark., 2014). Dexras1 yapısal olarak ras proteinlerinde bulunan korunmuş tüm GTPaz motiflerini içerirken, C terminalinde bulunan 7 kDA uzama ile diğer Ras proteinlerinden ayrılır. C terminalindeki bu uzama, belirgin olarak striatumda eksprese olan *RASD2* geninin ürünü olan Rhes proteininde de bulunmaktadır (Harrison ve LaHoste, 2013).

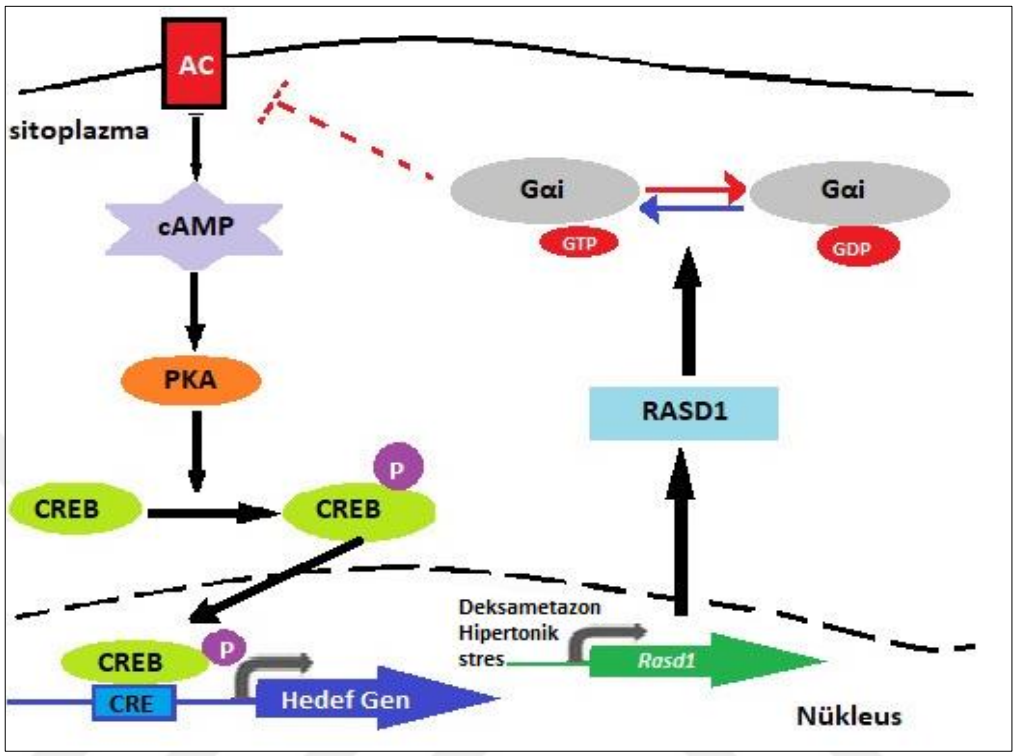


Şekil 2.6. Dexras1 proteini yapısının şematik gösterimi- Thapliyal ve ark. (2014)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

Dexras1'in expresyonu glukokortikoid, deksametazon ve beta östradiol gibi hormonların etkisiyle artmaktadır (Thapliyal ve ark., 2014). *Rasd1* geninin 3' bölgesine komşu, poli A sinyalinin 2.3 kb altında "glukortikoid response element" (GRE) tanımlanmıştır. Bu element Dexras1'in glukortikoid hormonlara hızlı yanıt vermesini sağlar (Kemppainen ve ark., 2003).

Dexras1'in heterotrimerik G proteinlerin Gαi alt ailesi üzerinde GEF aktivitesi bulunmaktadır. Dexras1, Gαi proteinlerini aktive ederek adenil siklazı ve dolaylı olarak ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) ile CREB (cAMP response element binding protein) sinyal yolaklarını inhibe

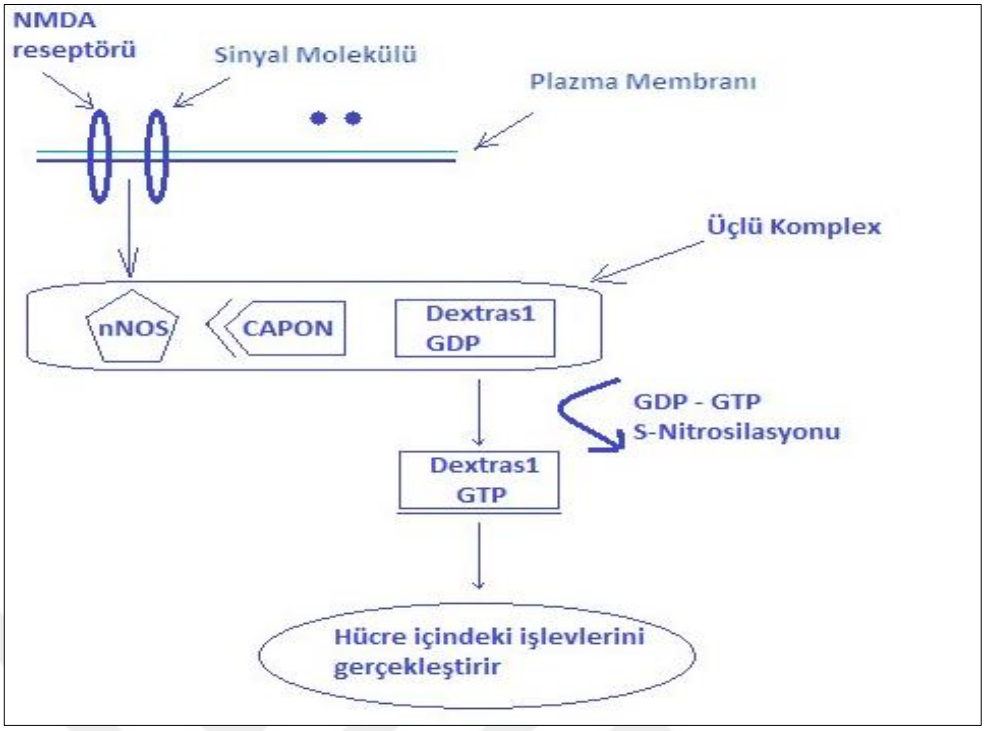
eder (Şekil 2.8) (Graham ve ark., 2004, Graham ve ark., 2002) (Greenwood ve ark., 2016).



Şekil 2.7. RASD1'in adenil siklaz inhibisyonunun şematik gösterimi- Greenwood ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

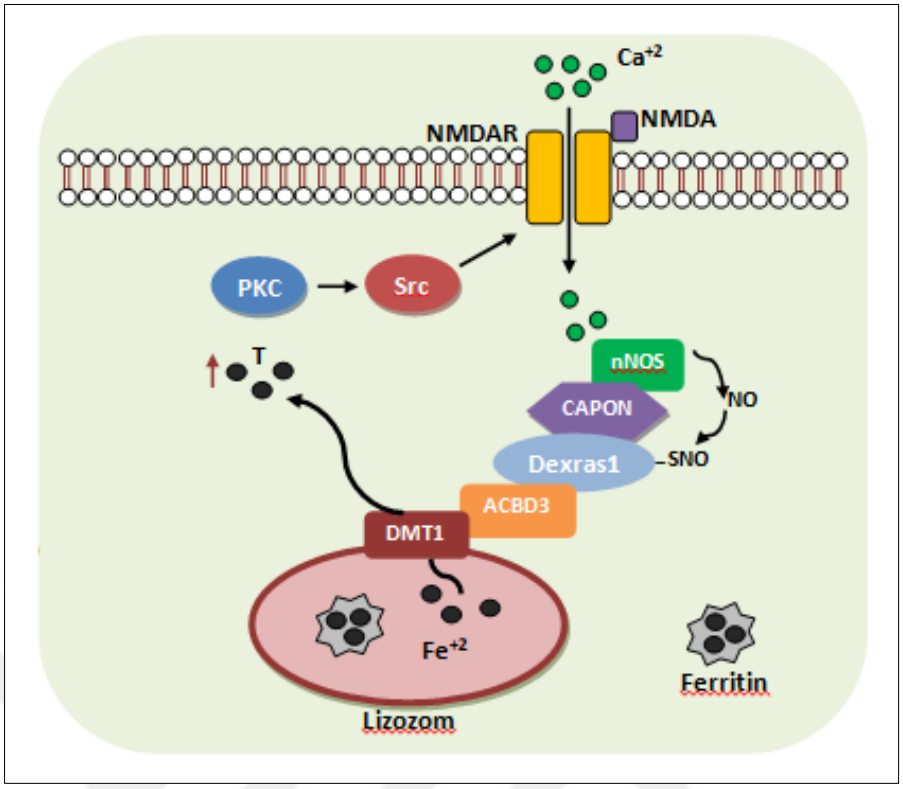
Dexras1 proteini glutaminerjik post sinaptik aralıkta NOS1AP (CAPON) ile etkileşim halindedir (Fang ve ark., 2000). NOS1AP, PDZ bağlanma bölgesi aracılığıyla NOS1 ile etkileşime girerken PTB bölgesi ile de Dexras1 ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda Dexras1-NOS1AP-NOS1 üçlü kompleksi oluşur.

NOS1, NMDAR aracılı kalsiyum akışı ile aktive olur ve nitrik oksit üretilir. Oluşan NO Dexras1'in 11. pozisyonundaki sistein aminoasidi üzerinden S-Nitrozilasyonunu sağlar ve Dexras1 aktive olur (Şekil 2.9). S-Nitrozilasyon sonrası aktive olan Dexras1 hücre içinde işlevlerini gerçekleştirir (Thapliyal ve ark., 2014).



Şekil 2.8. Dexras1 aktivasyonun şematik gösterimi- Thapliyal ve ark. (2014)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

Yapılan çalışmalar Dexras1'in nöronal demir homeostazında da kritik rol oynadığını göstermiştir. nNOS'un NMDAR aracılı aktivasyonu sonrası Dexras1 de S-nitrozilasyon ile aktive olur ve ACBD3 ile DMT1 üzerinden hücre içerisine fizyolojik olarak demir akışını sağlar (Şekil 2.10) (White ve ark., 2016). Birçok nörodejeneratif hastalıkta beyinde demir birikimi gösterilmiş olup, bu durumun nörotoksisiteye yol açtığı bilinmektedir.

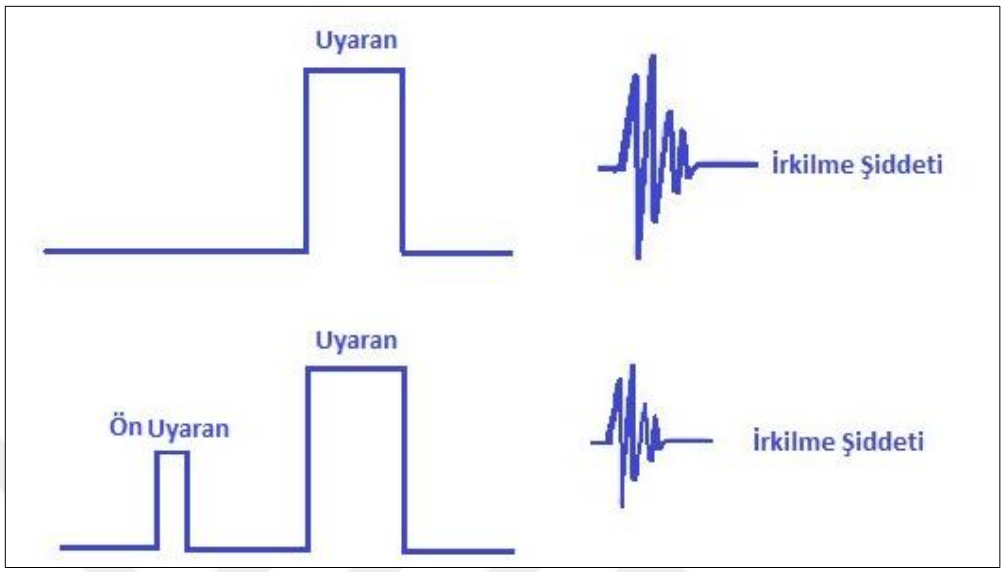


Şekil 2.9. Dexras1'in demir metabolizmasındaki rolünün şematik gösterimi- White ve ark. (2016)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

Chen ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada; Dexras1 knock-out fareler ile yaban tip fareler karşılaştırıldığında primer kortikal nöronlarda NMDA ilişkili demir akışına bağlı hücre ölümünün Dexras1 knockout farelerde azaldığı saptanmıştır. Dexras-1'in NO ve demir akışı üzerinden NMDA ilişkili nörotoksisitede rol oynadığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2013).

Prepulse inhibisyon fizyolojik olarak görülen nörolojik bir fenomendir. İrkilmeye neden olacak görsel veya işitsel bir uyaran öncesinde daha düşük bir şiddette ve daha kısa sürede verilen ön uyaranın, ikinci uyaranın oluşturduğu irkilme refleksinin şiddettini azaltmasına prepulse inhibisyon denir (Şekil 2.11) (Sema ve Göktalay, 2012). Prepulse inhibisyonun birçok nörolojik ve psikiyatrik hastalıkta azaldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Şizofreni hastalarında da sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında prepulse inhibisyonun azaldığı bilinmektedir (Mena ve ark., 2016). Carlson ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bir çalışmada; *Rasd1* geni

knock-out edilen farelerde prepulse inhibisyonun arttığı gösterilmiştir (Carlson ve ark., 2016).



Şekil 2.10. Prepulse inhibisyonun şematik gösterimi- Oral ve ark. (2012)'dan modifiye edilerek alınmıştır.

RASD1 geni evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir gen olup, literatürde bu genin yapısı ve nörolojik hastalıklar arasındaki ilişkiye yönelik çalışma oldukça azdır. Daha önce otizm ve konuşma gecikmesi olan bir vakada *RASD1* geninin de lokalize olduğu kromozom 17p11.2 bölgesinin duplikasyonuna rastlanmış ve bu bireyde yapılan doz çalışmasında *RASD1* geninin ekspresyonunun arttığı gösterilerek, bunun hastanın klinik durumunu açıklayabileceği öne sürülmüştür (Nakamine ve ark., 2008).

Dexras1 gerek daha önce şizofreni ile ilişkisi gösterilmiş NOS1, NOS1AP ve NMDAR ile olan yakın ilişkisi, gerekse proteinin fonksiyonuna yönelik yapılan çalışmalarda gösterilen demir homeostazı üzerinden nörotoksisiteye neden olması ile şizofreni etiyolojisinde rol oynama potansiyeli olan bir proteindir. Bir başka nokta, şizofrenide prepulse inhibisyon azalmakta, Dexras1 geni knock-out farelerde ise prepulse inhibisyon artmaktadır.

Bütün bu bilgiler ışığında *RASD1* geninin şizofrenideki patolojik süreçlerde rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Weber ve arkadaşlarının 2014 yılında farklı toplumlardan şizofreni hastalarında yaptığı bir çalışmada; *NOS1*, *NOS1AP*, *DYNLL1*,

RASD1 ve *SYN2* genlerinden seçilen 36 farklı SNP değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *RASD1* geninde rs4924755, rs711352, rs2232841 ve rs2232838 varyantları incelenmiş ve şizofreni ile ilişkili bulunmamıştır (Weber ve ark., 2014). Ancak literatürde *RASD1* geninin tamamının şizofreni hastalarında değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda daha önce şizofreni hastalarında tüm gen dizi analizi yöntemi ile incelenmemiş olan *RASD1* geninin yapısal değişikliklerini araştırarak şizofreni hastalığının etiyolojisine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada; daha önceden izole edilip, Ankara Üniversitesi Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (AÜBAUM) Hücre Serisi Biyobankası'nda bankalanmış olan 200 şizofreni hastasına ait DNA örneği kullanılmıştır. Çalışma için Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan onay alınmıştır (Karar No: 02-69-17).

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Genepro thermal cycler (Bioer)
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E452 (Consort, Belgium)
Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.)
Gel Logic 200 Imaging System (Kodak)
Autovortex Mixer SA2 (Stuart Scientific)
M-240 R mikrosantrifüj cihazı (BOECO Germany)
3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

RASD1 genine özgü primer çiftleri
dATP, dCTP, dGTP, dTTP
5x TBE
Tris base
Borik asit
EDTA
NaOH tablet
Ethidium Bromide
6x yükleme tamponu
Bromfenol mavisi
Ksilen siyanol
Gliserol

GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific, katalog no: SM0373)

Sephadex® G-50 (Santa Cruz, katalog no: SC-255033)

Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific-katalog no: EP0402, GeneAll AmpONE™- katalog no:501-020)

10X PCR buffer

MgCl2

DMSO

BSA

Agaroz

ExoSAP-IT™ (Thermo Scientific, katalog no: 78201)

ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction mix (Applied Biosystems, kalatog no: 4337455)

Formamid

3.1.3. Solüsyonların Hazırlanması

dNTP miks çalışma solüsyonu: 100 mM'lık dATP, dCTP, dGTP, dTTP solüsyonlarının her birinden 50 µL alınarak 25 mM'lık bir karışım hazırlanmıştır. 25 mM'lık karışımdan alınan 20 µL, 80 µL steril distile su ile karıştırılarak 5mM konsantrasyonda çalışma solüsyonu elde edilmiştir. Solüsyon - 20°C'de saklanmıştır.

5x TBE (1 L): 54 gr Tris base, 27,5 gr Borik asit ve 20 mL 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH2O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Solüsyon + 4 °C'de saklanmıştır.

1x TBE: 5x TBE solüsyonu 1:4 oranında dH2O ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Solüsyon + 4 °C'de saklanmıştır.

0,5 M EDTA (100 mL): 18,61 gr EDTA ve 2 gr NaOH tableti, 80 mL distile su içinde çözülmüştür. pH 8,0 yapılarak dH2O ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Solüsyon + 4 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide (10 mL): 100 mgr Ethidium Bromide, 10 mL distile su içinde vorteks ile karıştırılmıştır. Alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanmıştır.

6x yükleme tamponu: 0,025 gr bromfenol mavisi, 0,025 gr ksilen siyanol ve 0,3 mL gliserol karıştırılarak dH2O ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

Sefadeks: 13 mL steril distile suya 1 gr Sephadex® G-50 eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sefadeks ilk kullanımdan önce 30 dakika bekletilmiştir. Solüsyon + 4 °C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA Örneğinin Elde Edilmesi

200 şizofreni hastasına ait DNA örneği, AÜBAUM Yöntemin Kurulu'nda ilgili kararın çıkmasının ardından, AÜBAUM Hücre Serisi Biyobankası'ndan uygun koşullarda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına transfer edilmiştir.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RASD1 geni (NG_028074.1) promoter, 5'UTR bölgesi, 2 ekzonu, 1 intronu ve 3'UTR bölgesini kapsayacak şekilde 4 fragman halinde çoğaltılmıştır. Primer dizileri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonrası elde edilen ürünlerin uzunlukları da Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR'de kullanılan primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları.

Primer Adı	**Primer Nükleotid Dizisi (5'→3')**	**Ürün Uzunluğu**
Fragman 1F	GTGGAAAAGCGGAGTCCGAG	622
Fragman 1R	GAAGTCCTCGATGGTAGGCG	
Fragman 2F	GAGCTGAGTATCCCGGCCA	650
Fragman 2R	GCTCGATCTCGCGCTGGT	
Fragman 3F	AGTCTGGACAACCGCGAC	717
Fragman 3R	TCCTAAGGAGCAGATGACC	
Fragman 4F	AAGGAGGACCTTTTTGTTAAGTCAA	753
Fragman 4R	GTTCCACCTAAGTCAAAGCCC	

3.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kimyasal Karışımları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu *Taq* DNA Polymerase (Fragman 1 için Thermo Fisher, katalog no: EP0402, Fragman 2-3-4 için ise GeneAll AmpONE™- katalog no:501-020) seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *RASD1* geninin 1., 2. ve 4. fragmanları için touchdown (TD) PCR, 3. fragman için ise normal PCR yapılmıştır. PCR'lar *Genepro* (Bioer) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR'da kullanılan kimyasalların miktarları sırasıyla Tablo 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'de verilmiştir. 1. ve 2. fragmanın TD PCR'ında kullanılan sıcaklık ve süreler Tablo 3.6'da, 3. fragmanın PCR'ında kullanılan sıcaklık ve süreler Tablo 3.7'de, 4. fragmanın TD PCR'ında kullanılan sıcaklık ve süreler ise Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Fragman 1 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları

Kimyasallar	**Hacim**
10X PCR buffer	2,5 µl
Magnesium Chloride (25 mM)	1,5 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
Forward primer (10pm/µl)	1 µl
Reverse primer (10pm/µl)	1 µl
DMSO (%10)	2,3 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dH_2O	14,5 µl
DNA (100ng/µl)	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.3. Fragman 2 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları

Kimyasallar	**Hacim**
10X PCR buffer	2,5 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
Forward primer (10pm/µl)	1 µl
Reverse primer (10pm/µl)	1 µl
DMSO (%10)	2,3 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dH_2O	16 µl
DNA (100ng/µl)	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.4. Fragman 3 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları

Kimyasallar	**Hacim**
10X PCR buffer	2,5 µl
BSA (1mg/ml)	1 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
Forward primer (10pm/µl)	1 µl
Reverse primer (10pm/µl)	1 µl
DMSO (%10)	2,3 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dH_2O	15 µl
DNA (100ng/µl)	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.5. Fragman 4 PCR'ında kullanılan kimyasalların miktarları

Kimyasallar	**Hacim**
10X PCR buffer	2,5 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
Forward primer (10pm/µl)	1 µl
Reverse primer (10pm/µl)	1 µl
DMSO (%4)	0,9 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dH_2O	17,4 µl
DNA (100ng/µl)	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.6. Fragman 1 ve 2'nin çoğaltılmasında kullanılan TD PCR koşulları

	Sıcaklık	**Süre**	
1	94 °C	4 dk	
2	94 °C	1 dk	7 Siklus
3	62 °C	1 dk	
	-1.0 °C		
4	72 °C	1 dk	
5	94 °C	1 dk	28 Siklus
6	54 °C	1 dk	
7	72 °C	1 dk	
8	72 °C	7 dk	
9	4 °C	∞	

Tablo 3.7. Fragman 3'ün çoğaltılmasında kullanılan PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	
1	94 °C	4 dk	
2	94 °C	45 sn	30 Siklus
3	58 °C	45 sn	
4	72 °C	1 dk	
8	72 °C	7 dk	
9	4 °C	∞	

Tablo 3.8. Fragman 4'ün çoğaltılmasında kullanılan TD PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	
1	94 °C	4 dk	
2	94 °C	45 sn	4 Siklus
3	62 °C	45 sn	
	-1.0 °C		
4	72 °C	1 dk	
5	94 °C	45 sn	31 Siklus
6	58 °C	45 sn	
7	72 °C	1 dk	
8	72 °C	7 dk	
9	4 °C	∞	

3.2.3. Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bu amaçla 90 ml 1x TBE ve 1,8 gr agaroz karıştırılarak oluşan çözelti mikrodalga fırında orta (medium) ayarda 4 dakika ısıtılmıştır. Eriyen jel içine 1.0 µl EtBr (Ethidium Bromide) (10 mg/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Jel, elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.) 1x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirilmiştir.

PCR sonrası 10 µl PCR ürünü, 2 µl 6x yükleme tamponu ile karıştırılıp, karışımın 10 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 volt (V)'da 45 dakika elektroforez uygulanmıştır. Jel, Kodak Gel 200 cihazında görüntülenerek, Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların boyları, GeneRuler 50bp DNA Ladder kullanılarak kontrol edilmiştir.

3.2.4. PCR Sonrası Temizleme

PCR sonrası temizleme işlemi için *ExoSAP-IT*™ enzimatik temizleme ürünü kullanılmıştır. Protokol doğrultusunda 5 µL PCR ürünü ile 2 µl ExoSAP-IT reaktifi 0.2 ml'lik PCR tüpünde karıştırılmıştır. Karışım 37°C'de 15 dakika; 80°C'de 15 dakika inkübe edilerek temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Dizi Analizi Reaksiyonu

PCR ürünleri temizlendikten sonra dizi analizi reaksiyonu uygulanmıştır. Reaksiyon için hazırlanan karışım ve uygulanan sıcaklık ve süreler Tablo 3.9 ve 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.9. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	**Hacim**
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)	1 µl
BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	3 µl
Forward/Reverse Primer (1pm/ µl)	2 µl
Temizlenmis PCR urunu	2 µl
dH_2O	2 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.10. Dizi analizi reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler

	Sıcaklık	Süre	
1	96 °C	2 dk	
2	96 °C	10 s	
3	50 °C	5 s	30 Siklus
4	60 °C	4 dk	
5	4 °C	∞	

3.2.6. Dizi Analizi Reaksiyonu Sonrası PCR Ürünü Temizleme

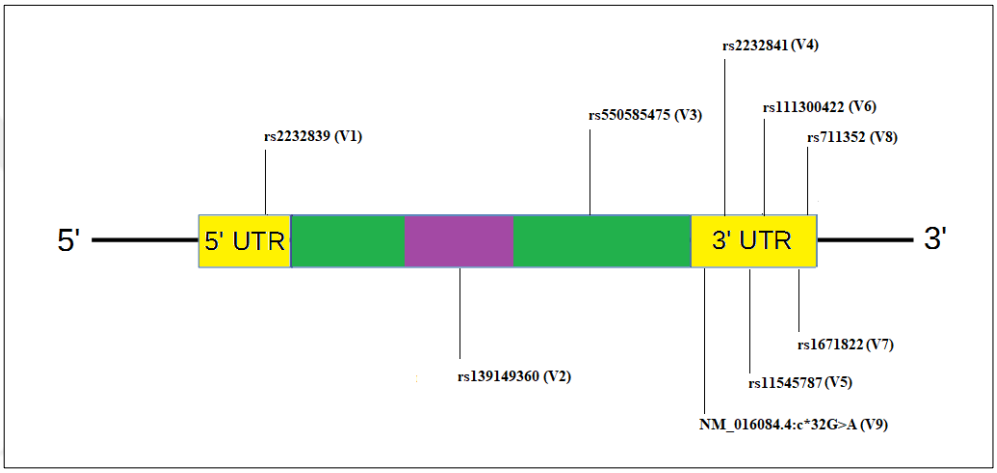
Spin kolonlara 650 µL sefadeks aktarılarak 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştirilip dizi analizi reaksiyonu sonrası elde edilen 10 µL'lik PCR ürünleri spin kolonlardaki sefadeksin orta kısmına bırakılmıştır. Spin kolonlar 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek ürün temizleme işlemi tamamlanmıştır.

3.2.7. Dizi Analizi

Dizi analizi, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Temizlenen 10 µL'lik PCR ürünleri, 5 µL formamid ile beraber 96-Well Plate üzerindeki kuyularda karıştırılmıştır. Plate bileşenleri doğru bir şekilde bir araya getirilerek cihaz üzerinde B pozisyonuna yerleştirilmiştir. FastSeq50_POP7 run module ve 3130POP7_BDTv3-KB-Denovo-v5.2 analiz protokolü kullanılarak elektroforez gerçekleştirilmiştir. Mutasyon değerlendirmesi için SeqScape version 2.7 ve Sequencing Analysis version 5.1 yazılımları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışılan örneklerin %87'sinde, *RASD1* geninde en az bir varyant saptanmıştır. Bu örneklerde 9 farklı varyant tespit edilmiş olup 1 varyant dışında tamamı dbSNP veri tabanında daha önce tanımlanmıştır. En fazla varyasyon genin 3'UTR bölgesinde (%87, 174 olguda) saptanmıştır (Şekil 4.1). Hastaların %20'sinde (40 olguda) 5'UTR bölgesinde, %2,5'unda (5 olguda) intronda, %0,5'inde ise (1 olguda) 2. ekzonda varyant saptanmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmamızda saptanan 9 varyantın *RASD1* geni üzerinde şematik gösterimi (Yeşil alanlar ekzonları, mor alan ise intronu şematize etmektedir)

Tez kapsamında çalışılan 200 şizofreni hastasına ait DNA örneğinde saptanan *RASD1* varyantları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalarda saptanan *RASD1* varyantları

Örnek No	Saptanan Varyant
1	(-)
2	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
3	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
4	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
5	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
6	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
7	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
8	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
9	(-)
10	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
11	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
12	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
13	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
14	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6147 A>T, NM_016084.4:c.722 A>T heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
15	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
16	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
17	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A homozigot NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T homozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
18	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
19	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
20	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
21	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
22	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
23	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot

24	(-)
25	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
26	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
27	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
28	(-)
29	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
30	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
31	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
32	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
33	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
34	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
35	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
36	(-)
37	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
38	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
39	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
40	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
41	(-)
42	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
43	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
44	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
45	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
46	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
47	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
48	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
49	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
50	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot

51	(-)
52	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
53	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
54	(-)
55	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
56	NG_028074.1:g.6728 C>A, NM_016084.4:c*457 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
57	(-)
58	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
59	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
60	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
61	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
62	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
63	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
64	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
65	NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
66	NG_028074.1:g.6728 C>A, NM_016084.4:c*457 G>A heterozigot
67	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
68	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
69	(-)
70	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
71	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
72	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A homozigot NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T homozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
73	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
74	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
75	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
76	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
77	(-)

78	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
79	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
80	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
81	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
82	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
83	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
84	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
85	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
86	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
87	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
88	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
89	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
90	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
91	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
92	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
93	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
94	NG_028074.1:g.6728 C>A, NM_016084.4:c*457 G>A heterozigot
95	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
96	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
97	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
98	(-)
99	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
100	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
101	(-)
102	(-)
103	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot

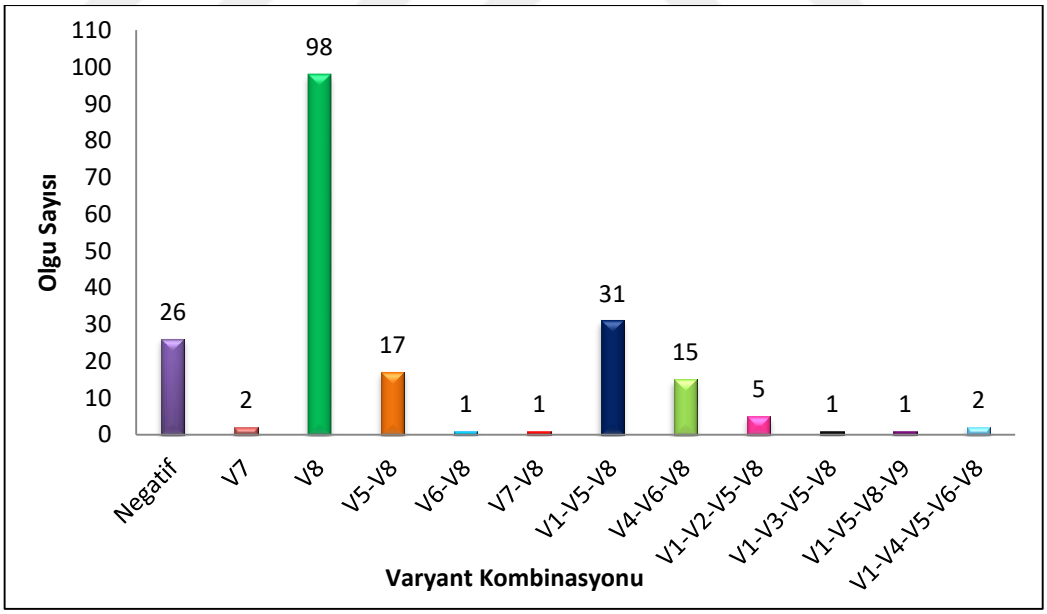
104	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
105	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
106	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
107	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
108	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
109	(-)
110	(-)
111	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
112	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
113	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
114	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
115	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
116	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
117	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
118	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
119	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
120	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
121	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
122	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
123	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
124	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
125	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
126	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
127	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
128	(-)
129	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot

130	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
131	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
132	(-)
133	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
134	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
135	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
136	(-)
137	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
138	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
139	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
140	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
141	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
142	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
143	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
144	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
145	(-)
146	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
147	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
148	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
149	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
150	(-)
151	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
152	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
153	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
154	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
155	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
156	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
157	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
158	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A homozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
159	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
160	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
161	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
162	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
163	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
164	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T heterozigot

	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
165	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
166	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6303 G>A, NM_016084.4:c*32 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
167	(-)
168	(-)
169	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
170	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
171	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
172	(-)
173	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
174	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
175	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
176	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
177	(-)
178	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
179	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
180	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
181	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
182	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
183	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
184	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
185	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
186	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
187	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
188	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
189	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
190	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
191	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
192	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot

193	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
194	(-)
195	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
196	NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
197	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
198	NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A heterozigot NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T homozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G homozigot
199	NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot
200	NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G heterozigot NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C heterozigot NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G heterozigot

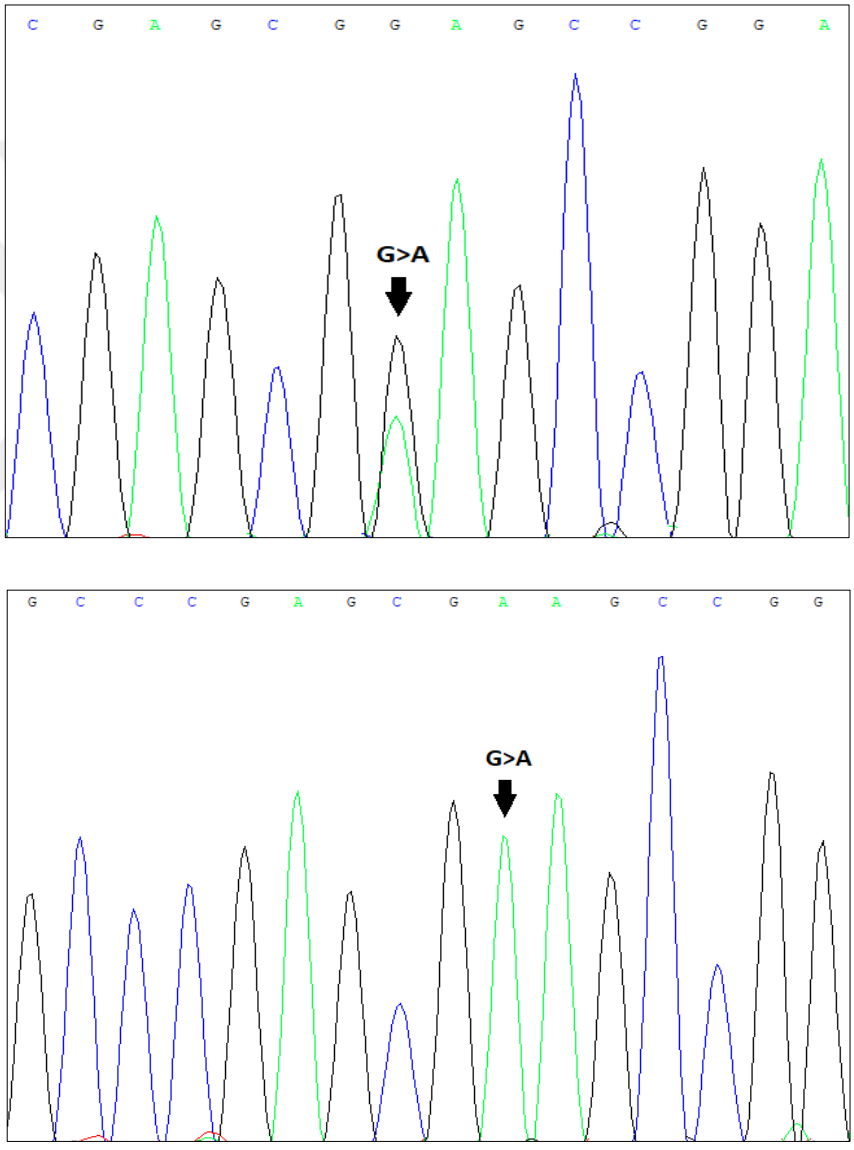
Hastaların 26'sında herhangi bir varyant saptanmadı. 100 olguda yalnızca bir varyant, 19 olguda 2'şer varyant, 46 olguda 3'er varyant, 7 olguda 4'er varyant 2 olguda ise 5'şer varyant saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hastalarda saptanan varyant kombinasyonlarının grafik olarak gösterilmesi

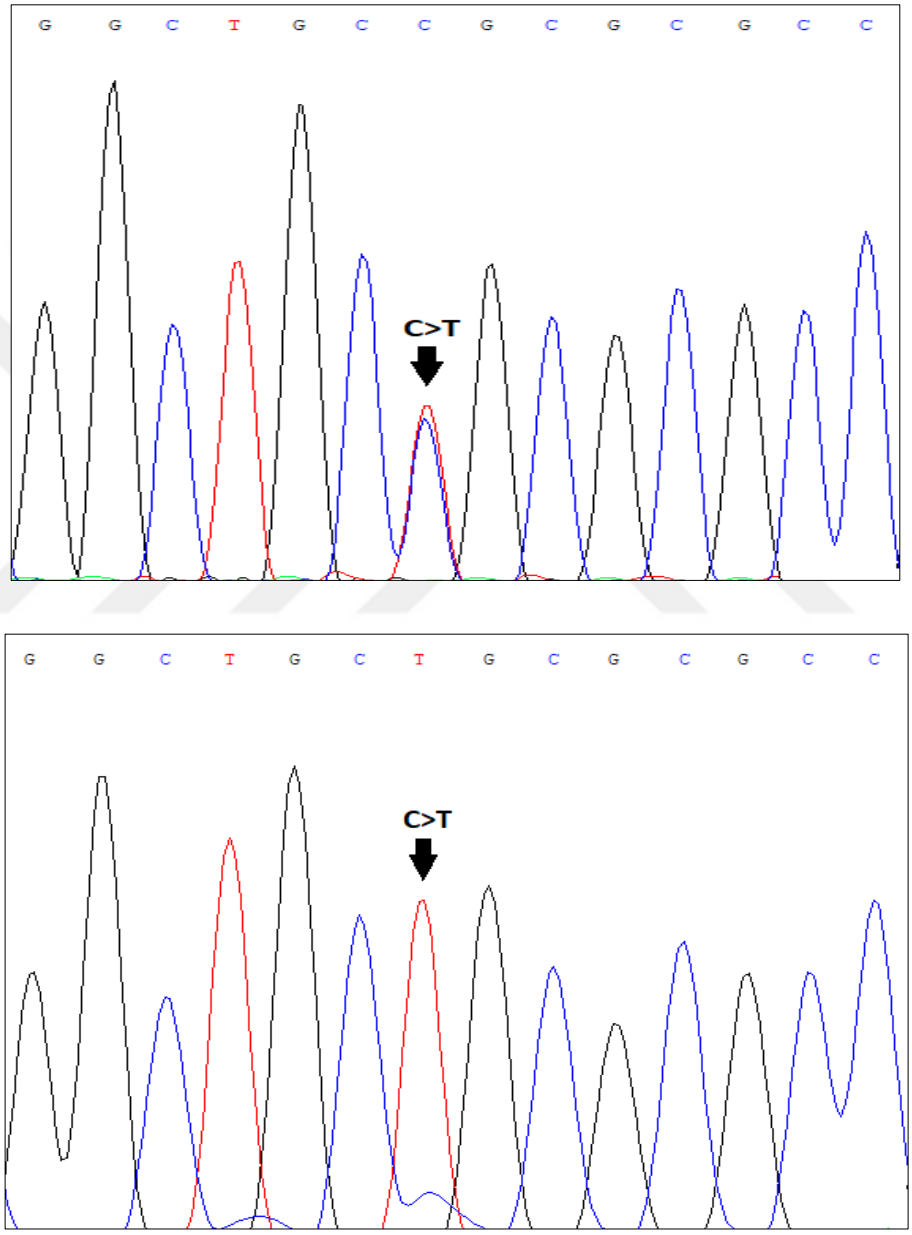
4.1. *RASD1* Geninde Daha Önce Tanımlanmış Olan Varyantlar

NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A; *RASD1* geninin 5'UTR bölgesinde 5075. pozisyondaki G nükleotidinin yerine A nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.2). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs2232839) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 40 olguda saptadığımız bu varyant; 37 hastada heterozigot, 3 hastada ise homozigot olarak bulunmuştur.



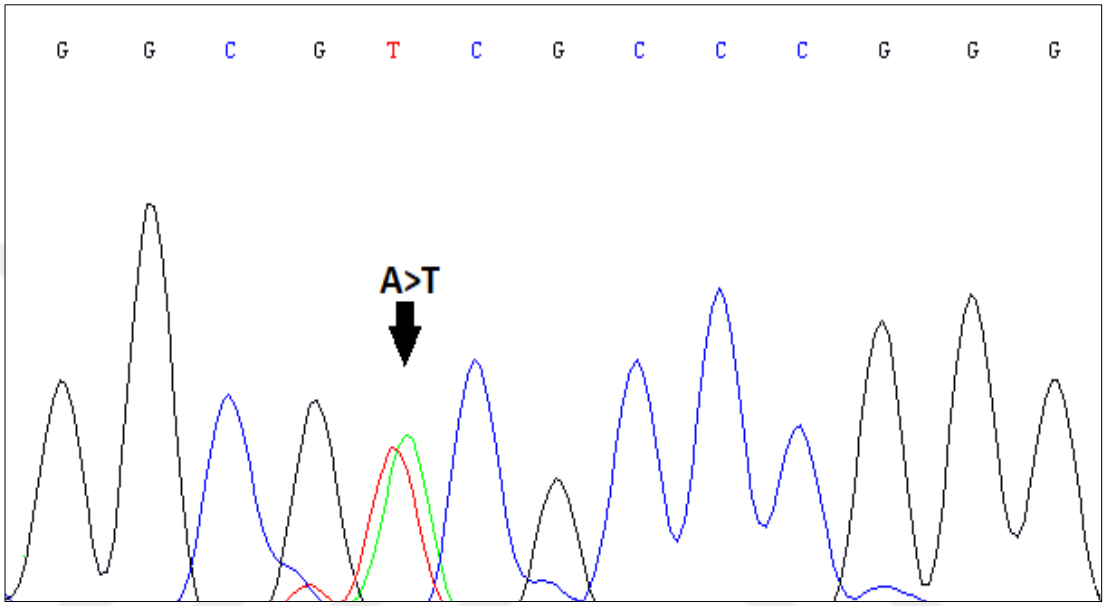
Şekil 4.3. NG_028074.1:g.5075 G>A, NM_016084.4:c-140 G>A varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. (Üstte 40 No.lu olguya ait heterozigot altta ise 72 No.lu olguya ait homozigot varyant görülmektedir.)

NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T; *RASD1* geninin intronunda 5583. pozisyondaki C nükleotidinin yerine T nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.3). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs139149360) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 5 olguda saptadığımız bu varyant; 3 hastada heterozigot, 2 hastada ise homozigot olarak bulunmuştur.



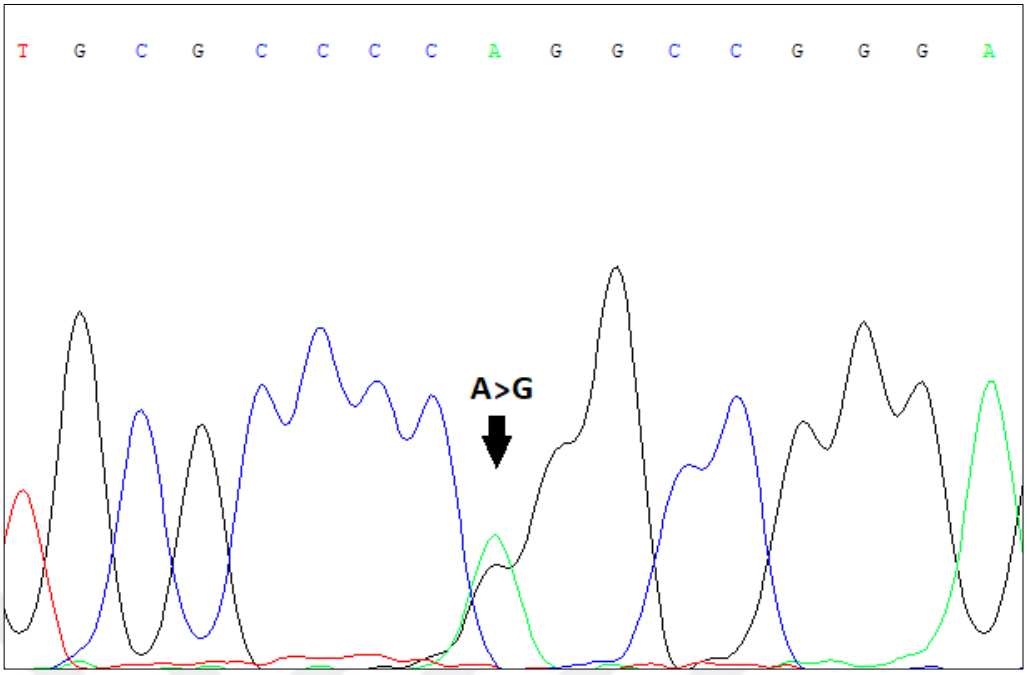
Şekil 4.4. NG_028074.1:g.5583 C>T, NM_016084.4:c.286+83 C>T varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. (Üstte 3 No.lu olguya ait heterozigot altta ise 17 No.lu olguya ait homozigot varyant görülmektedir.)

NG_028074.1:g.6147 A>T, NM_016084.4:c.722 A>T; *RASD1* geninin 2. ekzonunda 6147. pozisyondaki A nükleotidinin yerine T nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.4). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs550585475) 1000 genom ve ExAC veri tabanlarında ise daha önce bildirilmemiştir. Bu varyant bir olguda heterozigot olarak bulunmuştur.



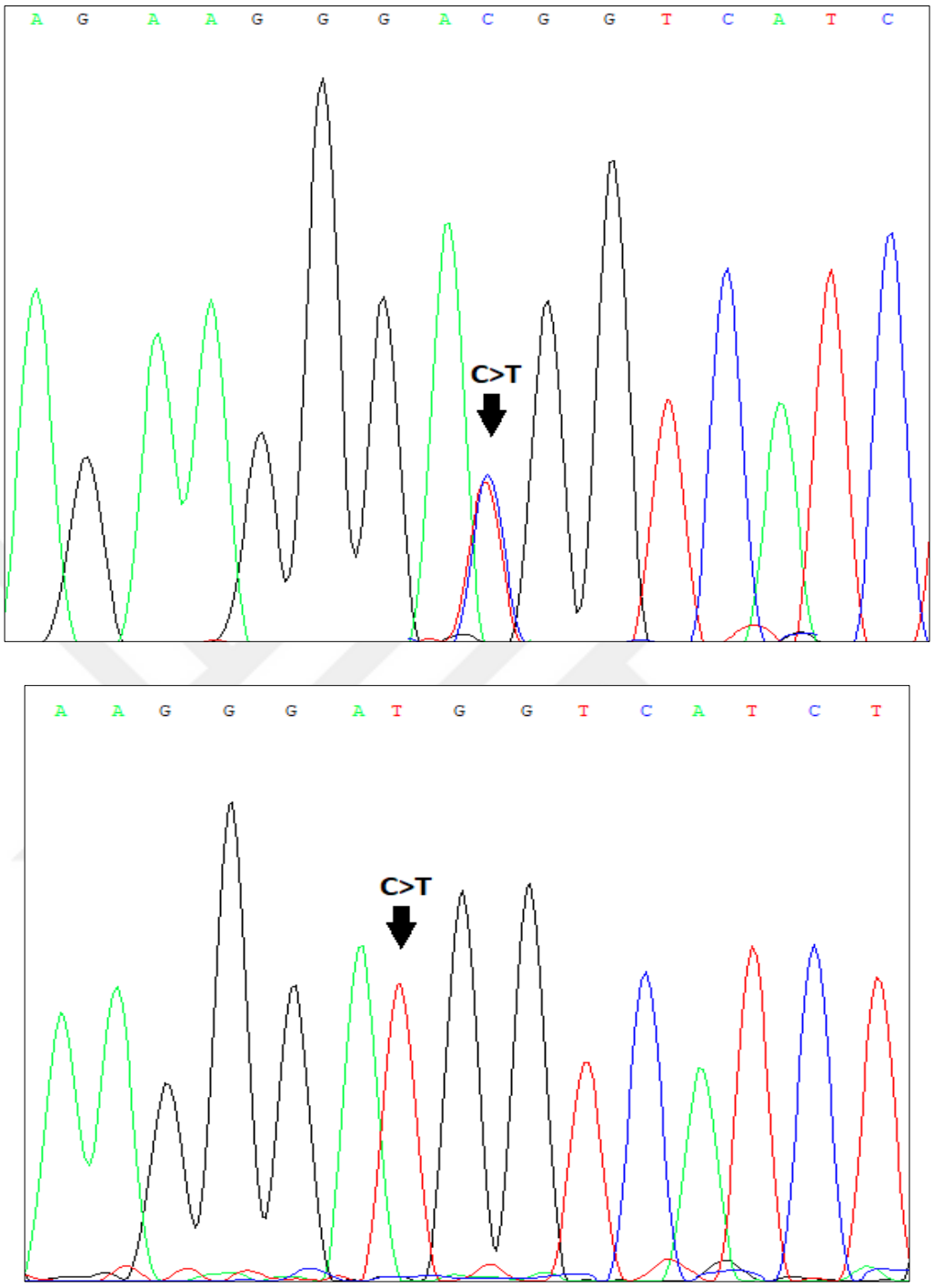
Şekil 4.5. NG_028074.1:g.6147 A>T, NM_016084.4:c.722 A>T varyantının 14 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6347. pozisyondaki A nükleotidinin yerine G nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.5). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs2232841) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 17 olguda saptadığımız bu varyant, 17 hastanın tamamında heterozigot olarak bulunmuştur.



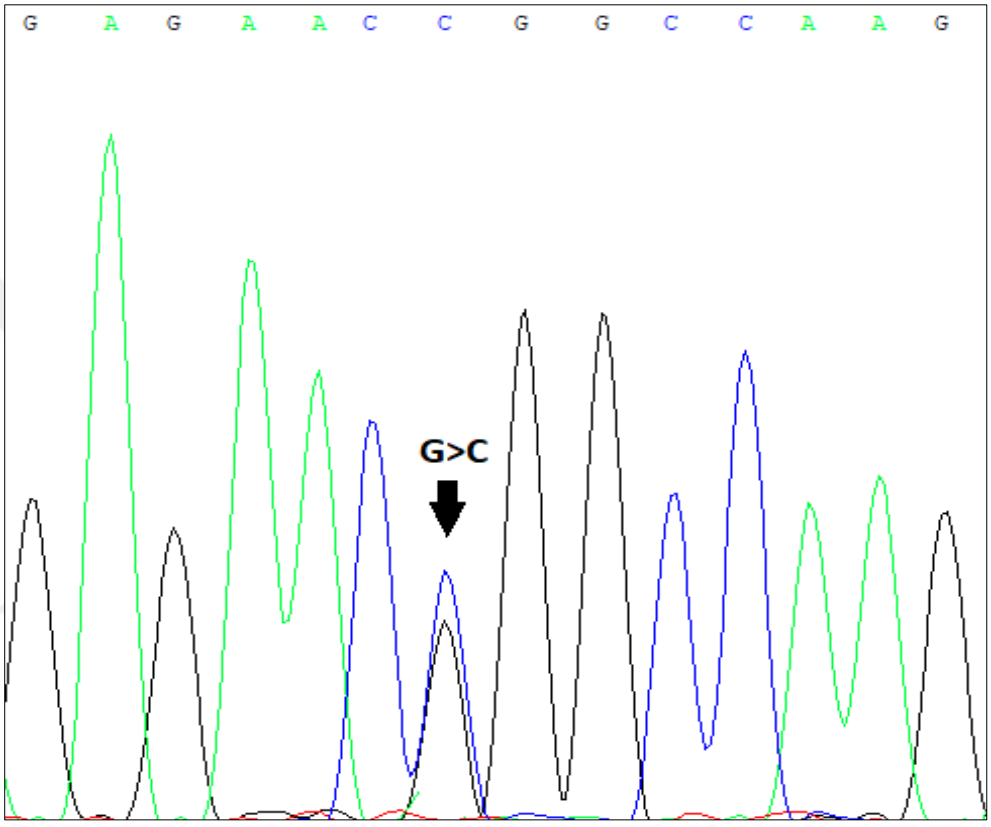
Şekil 4.6. NG_028074.1:g.6347 A>G, NM_016084.4:c*76 A>G varyantının 20 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6432. pozisyondaki C nükleotidinin yerine T nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.6). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs11545787) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 57 olguda saptadığımız bu varyant; 47 hastada heterozigot, 10 hastada ise homozigot olarak bulunmuştur.



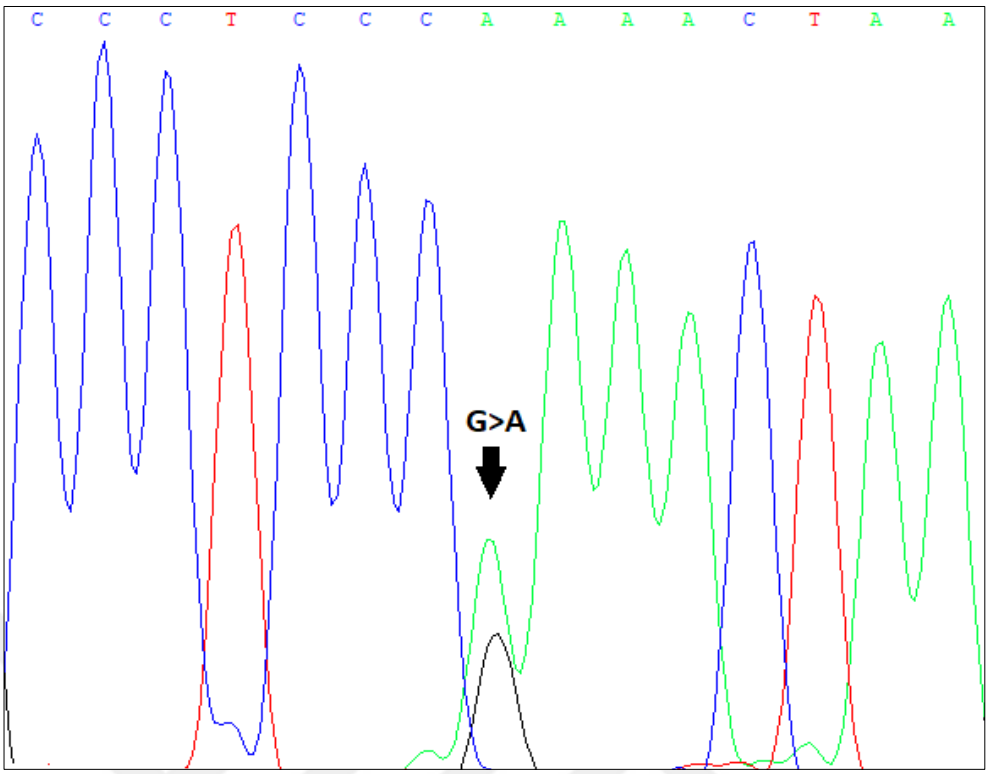
Şekil 4.7. NG_028074.1:g.6432 C>T, NM_016084.4:c*161 C>T varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. (Üstte 14 No.lu olguya ait heterozigot altta ise 17 No.lu olguya ait homozigot varyant görülmektedir.)

NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6461. pozisyondaki G nükleotidinin yerine C nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.7). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs111300422) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 18 olguda saptadığımız bu varyant, 18 hastanın tamamında heterozigot olarak bulunmuştur.



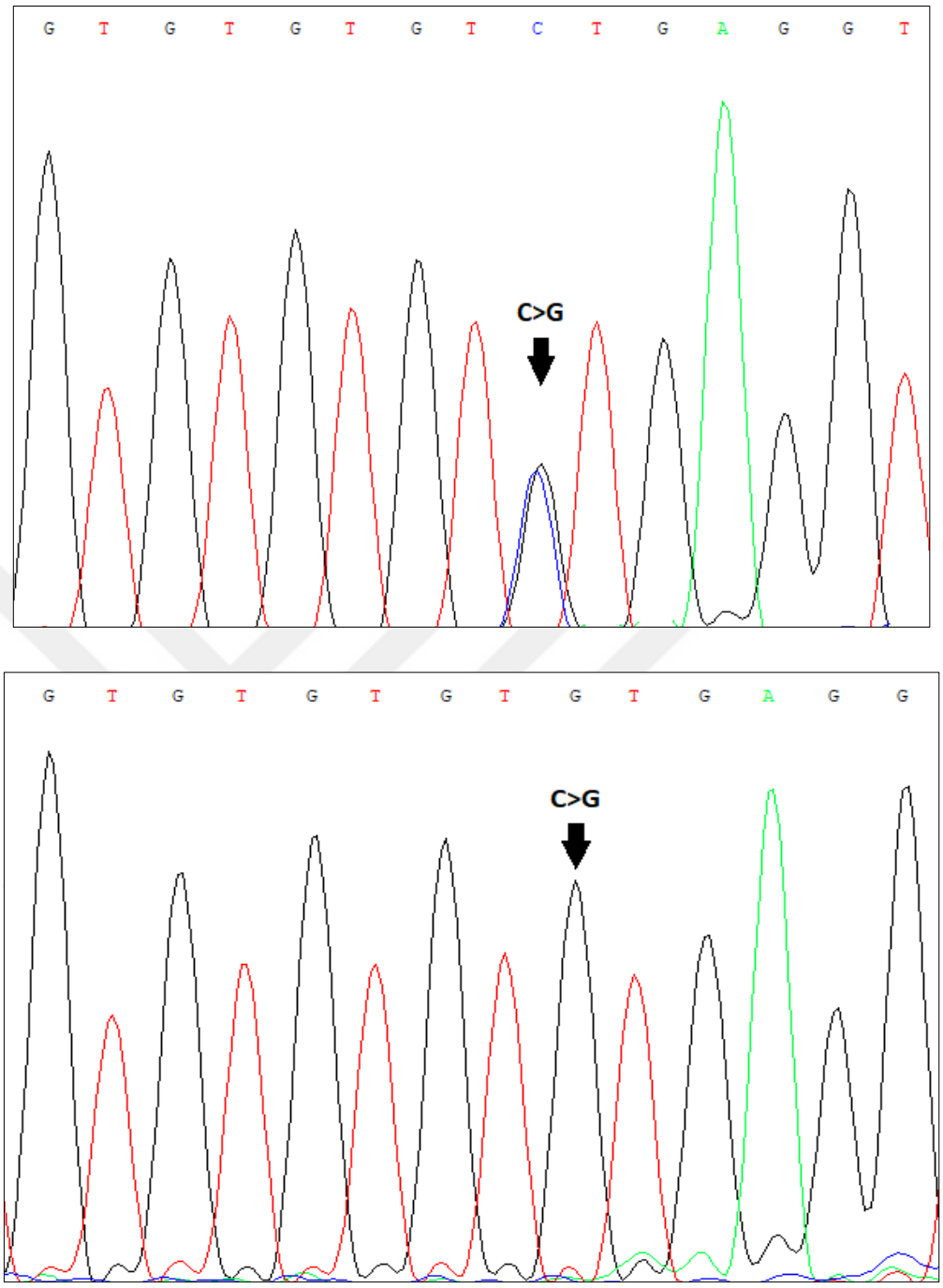
Şekil 4.8. NG_028074.1:g.6461 G>C, NM_016084.4:c*190 G>C varyantının 20 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

NG_028074.1:g.6728 G>A, NM_016084.4:c*457 G>A; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6728. pozisyondaki G nükleotidinin yerine A nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.8). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs1671822) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 3 olguda saptadığımız bu varyant, 3 hastanın tamamında heterozigot olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9. NG_028074.1:g.6728 G>A, NM_016084.4:c*457 G>A varyantının 56 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

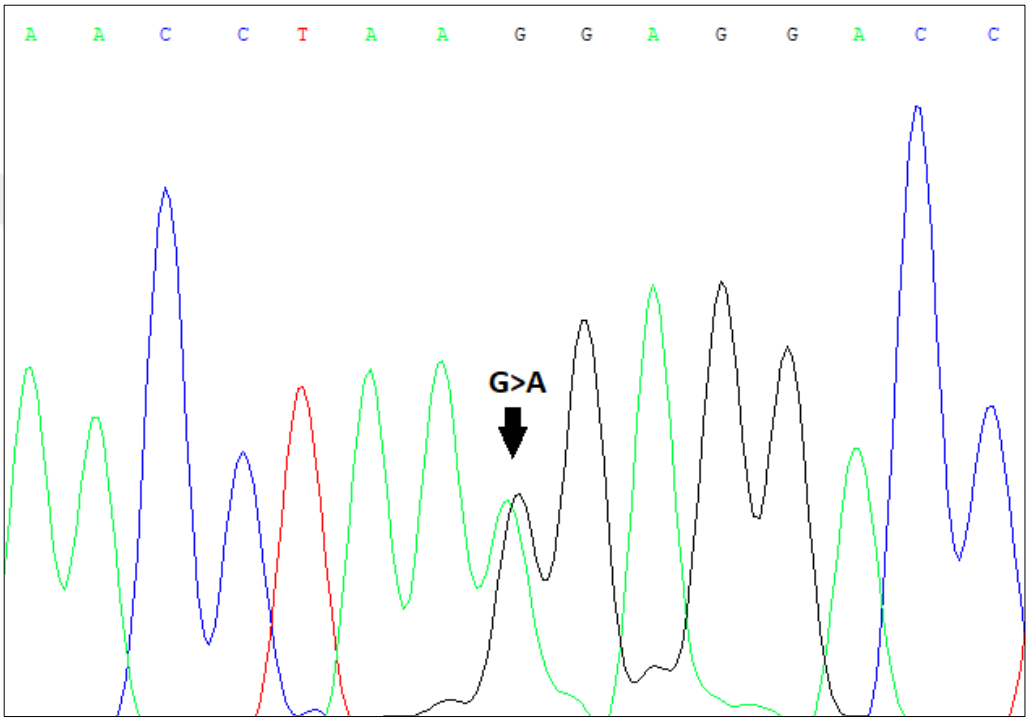
NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6892. pozisyondaki C nükleotidinin yerine G nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.9). dbSNP veri tabanında tanımlı olan bu varyant (rs711352) polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. 172 olguda saptadığımız bu varyant; 99 hastada heterozigot, 73 hastada ise homozigot olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. NG_028074.1:g.6892 C>G, NM_016084.4:c*621 C>G varyantının kapiller elektroforez görüntüsü. (Üstte 55 No.lu olguya ait heterozigot altta ise 61 No.lu olguya ait homozigot varyant görülmektedir.)

4.2. *RASD1* Geninde İlk Kez Bu Çalışmada Saptanan Varyant

NG_028074.1:g.6303 G>A, NM_016084.4:c*32 G>A; *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde 6303. pozisyondaki G nükleotidinin yerine A nükleotidinin gelmesi ile oluşmuş bir varyanttır (Şekil 4.10). Bu varyant dbSNP veri tabanında tanımlı değildir. ExAC ve 1000 genom veri tabanlarında da daha önce bildirilmemiştir. Bu varyant bir olgumuzda heterozigot olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. NG_028074.1:g.6303 G>A, NM_016084.4:c*32 G>A; varyantının 166 No.lu olguya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

5. TARTIŞMA

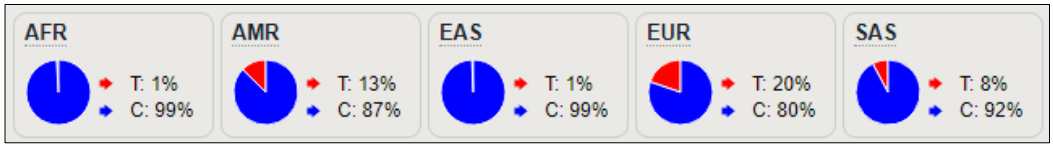
Şizofreni multifaktöriyel bir hastalık olup, yapılan çok sayıda histopatolojik, biyokimyasal ve genetik çalışmaya rağmen etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Şizofrenide ailesel yatkınlık; ikiz ve aile çalışmaları ile net bir şekilde ortaya konulmuş ve genetik yatkınlık lokuslarının belirlenmesi için çok merkezli ve oldukça kapsamlı çok sayıda genom boyu assosiyasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Şizofreni etyopatogenezi için ortaya atılan birçok hipotezin en çok kabul görenlerinden birisi de NMDAR hipofonksiyonudur. Bu yolakta yer alan birçok gen şizofreni hasta grubunda çalışılmış ve bazı varyantlar şizofreni hastalarında anlamlı bulunmuştur.

Bu çalışmada; 200 şizofreni hastasının DNA örneğinde yine bu yolakta yer alan *RASD1* geninin tamamı (promoter, 5'UTR, her iki ekzon, intron ve 3'UTR bölgesi) Sanger dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. 174 hastada 9 farklı varyant tespit edilmiştir.

rs2232839

Bu varyant *RASD1* geninin 5'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %7.65'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %10.75 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı toplumlara göre değişiklik göstermektedir. rs2232839 alel frekansı Amerikan toplumlarında %13, Avrupa toplumlarında %20, Güney Asya toplumlarında %8 iken, Afrikan ve Doğu Asya toplumlarında yaklaşık %1'dir (Şekil 5.1)[1]. Bu veriler doğrultusunda rs2232839 (NG_028074.1:g.5075G>A, NM_016084.4:c-140G>A**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.

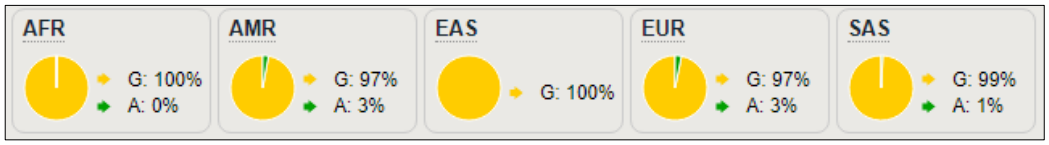
[1] Varyant sıklıklarını gösteren grafikleri içeren şekillerin tümü 1000 genom veri tabanından alınmıştır. 1000 genom veri tabanında *RASD1*genine ait nükleotid değişikliklerinin gösteriminde referans olarak kalıp zincir (antisense strand, minus strand, negatif zincir) kullanıldığından grafiklerin tamamında G'ler C, A'lar ise T olarak gösterilmektedir. AFR=Afrikan, AMR=Amerikan, EAS=Doğu Asya, EUR=Avrupa, SAS=Güney Asya.



Şekil 5.1. rs2232839 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs139149360

Bu varyant *RASD1* geninin intronunda yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %1.2'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %1.75 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı farklı toplumlarda değişiklik göstermektedir. rs139149360 alel frekansı Amerikan toplumlarında %3, Avrupa toplumlarında %3, Güney Asya toplumlarında %1 iken, Afrikan ve Doğu Asya toplumlarında yaklaşık %0'dır (Şekil 5.2). Bu veriler doğrultusunda rs139149360 (NG_028074.1:g.5583C>T, NM_016084.4:c.286+83C>T**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.



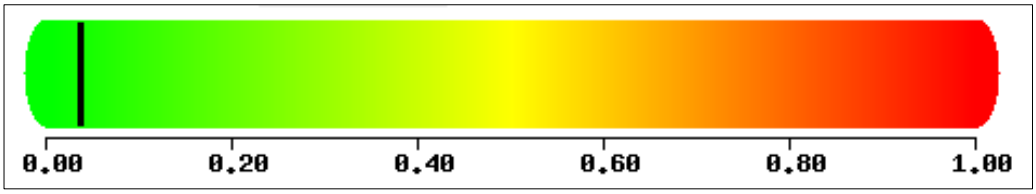
Şekil 5.2. rs139149360 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs550585475

Bu varyant *RASD1* geninin 2. ekzonunda yer almaktadır. Bu varyant 1000 genom ve ExAC veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir. TOPMed (Trans-Omics for Precision Medicine) veri tabanında sıklığı %0.003, gnomAD (Genome Aggregation Database) veri tabanında ise sıklığı %0.001 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %0.25 olarak hesaplanmıştır.

RASD1 geni 2. ekzonunda yer alan g.6147 pozisyonundaki A nükleotidinin T nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu değişiklik protein düzeyinde 241. pozisyondaki aspartik asit aminoasidinin valin aminoasidiyle değişimine yol açmaktadır. Bu

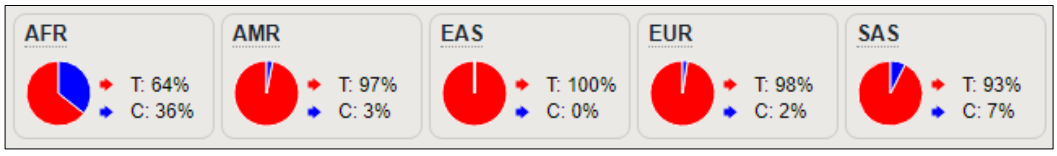
missense mutasyon in-siliko olarak analiz edildiğinde, 0.07 SIFT skoru ile protein fonksiyonu için tolere edilebilir bulunmuş, 0.038 Polyphen skoru ile de benign bir varyant olduğu görülmüştür (Şekil 5.3). Ancak literatürde bu varyant ile ilgili yeterli bilgi olmadığından net etkisi bilinmemektedir.



Şekil 5.3. rs550585475 varyantının Polyphen veri tabanında In-siliko analizi

rs2232841

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %11.8'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %4.25 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı toplumlara göre değişiklik göstermektedir. rs2232841 alel frekansı Amerika toplumlarında %3, Avrupa toplumlarında %2, Güney Asya toplumlarında %7, Afrika toplumlarında %36 iken Doğu Asya toplumlarında yaklaşık %0'dır (Şekil 5.4). Bu veriler doğrultusunda rs2232841 (NG_028074.1:g.6347A>G, NM_016084.4:c*76A>G**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.

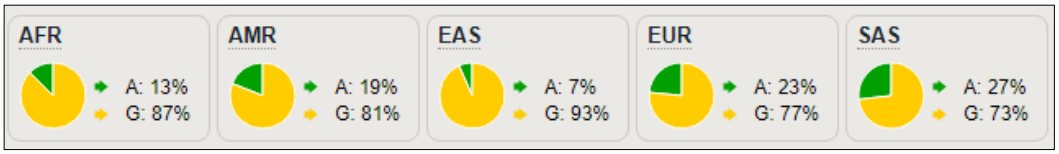


Şekil 5.4. rs2232841 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs11545787

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %17.27'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %16.75 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı toplumdan topluma

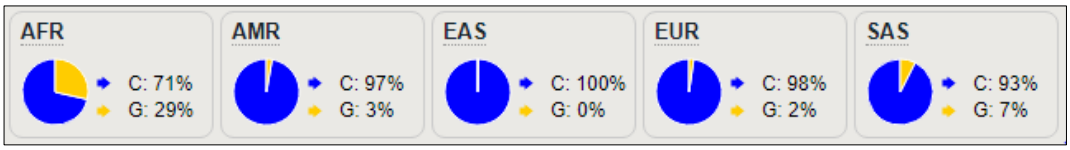
değişmektedir. rs11545787 alel frekansı Amerika toplumlarında %19, Avrupa toplumlarında %23, Güney Asya toplumlarında %27, Afrika toplumlarında %13, Doğu Asya toplumlarında yaklaşık %7'dır (Şekil 5.5,). Bu veriler doğrultusunda rs11545787 (NG_028074.1:g.6432C>T, NM_016084.4:c*161C>T**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.



Şekil 5.5. rs11545787 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs111300422

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %9.86'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %4.5 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı toplumlara göre değişiklik göstermektedir. rs111300422 alel frekansı Amerika toplumlarında %3, Avrupa toplumlarında %2, Güney Asya toplumlarında %7, Afrika toplumlarında %29 iken Doğu Asya toplumlarında yaklaşık %0'dır (Şekil 5.6). Bu veriler doğrultusunda rs111300422 (NG_028074.1:g.6461G>C, NM_016084.4:c*190G>C**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.



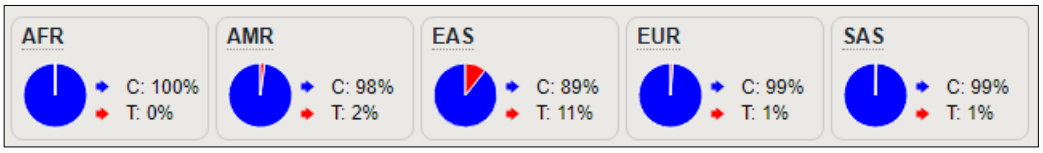
Şekil 5.6. rs111300422 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs2232841 varyantının saptandığı tüm hastalarda rs111300422 varyantı da saptanmıştır. Sırası ile global MAF skorları %11.8 ve %9.86 olan bu iki varyantın 17 hastada bir arada görülmesi aynı haplotipte yer aldıklarını düşündürmüştür. Biyobanka

DNA'sı kullanıldığı için anne-baba çalışması yapılamamıştır fakat 1000 genom veri tabanındaki *RASD1* genine ait 2504 genotip incelendiğinde, bu iki varyantın %8.66 oranında birlikte görüldüğü tespit edilmiş olup, bu durum iki varyantın aynı haplotipte yer alıyor olma ihtimalini güçlendirmiştir. 1000 genom veri tabanında bu varyantların normal popülasyonda birlikte görülme sıklığı bizim hasta grubumuzdakinden daha fazladır. Bu veriler değerlendirildiğinde bu haplotip hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.

rs1671822

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global MAF skoru %2.8'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %0.75 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı farklı toplumlarda değişiklik göstermektedir. rs1671822 alel frekansı Amerika toplumlarında %2, Avrupa toplumlarında %1, Güney Asya toplumlarında %1, Afrika toplumlarında %0, Doğu Asya toplumlarında ise yaklaşık %11'dır (Şekil 5.7). Bu veriler doğrultusunda rs1671822 (NG_028074.1:g.6728G>A, NM_016084.4:c*457G>A**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.

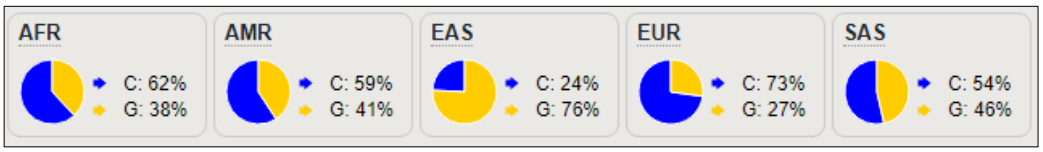


Şekil 5.7. rs1671822 varyantının farklı toplumlardaki sıklık grafiği

rs711352

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır ve 1000 genom veri tabanına göre Global alel frekansı %55'dir. Bizim çalışmamızda bu varyantın alel frekansı %61.25 olarak hesaplanmıştır. Bu varyantın sıklığı toplumlara göre değişiklik göstermektedir. Bu varyantın alel frekansı Amerika toplumlarında %59, Avrupa toplumlarında %73, Güney Asya toplumlarında %54, Afrika toplumlarında %62, Doğu Asya toplumlarında ise yaklaşık %24'tür (Şekil 5.8, Şekil 1000 genom veri tabanından alınmıştır). Bu veriler doğrultusunda rs711352

(NG_028074.1:g.6892C>G, NM_016084.4:c*621C>G**)** varyantı bizim çalışmamızda da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.



Şekil 5.8. rs711352 varyantının Farklı Toplumlardaki Sıklık Grafiği

NM_016084.4:c*32G>A

Bu varyant *RASD1* geninin 3'UTR bölgesinde yer almakta olup 1000 genom, dbSNP ve ExAC veri tabanlarında tanımlı değildir. Bizim çalışmamızda tek bir hastada heterozigot olarak saptanan bu varyantın alel frekansı %0.25 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan in-siliko analizlerde 3'UTR bölgesinde yer alan bu varyantın ayıklanmayı bozmadığından aminoasit diziliminde ya da protein yapısında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı anlaşılmıştır. Çalışmamızda nadir varyant olarak değerlendirdiğimiz bu değişiklik hakkında literatürde hiç veri olmadığından net etkisi bilinememektedir.

Çalışmamızda saptanan bu varyantların alel frekansları ve 1000 genom veri tabanından alınan MAF skorları toplu olarak Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. Saptanan varyantların alel frekansları ve MAF skorları

Bulunan varyant	Heterozigot sayısı	Homozigot sayısı	Alel Frekansı	Global MAF
rs2232839	37	3	0.1075	0.0765
rs139149360	3	2	0.0175	0.0120
rs550585475	1	—	0.0025	—
rs2232841	17	—	0.0425	0.1180
rs11545787	47	10	0.1675	0.1727
rs111300422	18	—	0.045	0.0986
rs1671822	3	—	0.0075	0.0280
rs711352	99	73	0.6125	0.550*
NM_016084.4:c*32G>A	1	—	0.0025	—

***B**u varyant için minör alel referans genomdaki alel olduğundan minör alel frekansı yerine alel frekansı verilmiştir.

Literatürde şizofreni hastalarında *RASD1* geni varyantlarının araştırıldığı tek bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada *RASD1* geninde rs4924755, rs711352, rs2232841 ve rs2232838 varyantları incelenmiştir (Weber ve ark., 2014). Bu varyantlardan rs2232838 genin 5'UTR bölgesinde, rs2232841 ve rs711352 ise genin 3'UTR bölgesinde yer almakta olup rs4924755 ise *RASD1*'in 3'UTR bölgesinin dışındadır. Bu çalışmada rs2232841 ve rs2232838 varyantları çalışmanın dahil edilme kriterleri (MAF skorları, Hardy-Weinberg eşitliğini sağlaması vb.) değerlendirildiğinde istatistiksel olarak çalışma dışı bırakılmış, diğer iki varyant ise yapılan analir sonucunda şizofreni hastalığı ile ilişkilendirilememiştir. Bu varyantlardan rs2232841 ve rs711352 bizim çalışmamızda da saptanmış olup istatistiksel olarak şizofreni ile ilişkilendirilememiştir.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmaya dahil edilen olguların %87'sinde *RASD1* geninde en az bir varyant saptanmıştır. Bir tanesi 5'UTR, bir tanesi intronik bölge, bir tanesi 2. ekzon ve altı tanesi 3'UTR bölgesinde olmak üzere toplam 9 farklı varyant tespit edilmiştir.
2. Bu dokuz varyantın sekiz tanesi dbSNP veri tabanında daha önce tanımlanmış değişiklikler olup, 3'UTR bölgesinde yer alan NM_016084.4:c*32G>A değişikliği ilk kez bu çalışmada tanımlanmıştır.
3. rs2232839, rs139149360, rs2232841, rs11545787, rs111300422, rs1671822 ve rs711352 varyantları; MAF skorları ve in-siliko analizler ile birlikte değerlendirilerek polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.
4. NM_016084.4:c*32G>A varyantının ise hasta grubumuzda alel frekansı %1'den az olduğundan ender varyanttır. İn-sliko analizinde 3'UTR bölgesinde yer alan bu varyant ayıklanmayı da bozmadığından aminoasid dizilimine herhangi bir etkisi olmadığı sonucu çıkarılabilir. Ancak, literatürde bu varyant ile ilgili hiç veri olmadığından net etkisi bilinememektedir.
5. Çalışmamızda rs2232841 varyantının saptandığı hastaların tamamında rs111300422 varyantı da saptanmış olup aynı haplotipte yer aldıkları düşünülmüştür. 1000 genom projesinde yer alan 2504 bireye ait genotipler incelendiğinde bu iki varyantın aynı haplotipte olduğu anlaşılmıştır. Bu haplotipin bizim çalışmamızdaki sıklığı ile 1000 genom veri tabanındaki sıklığı karşılaştırıldığında hastalık ile ilişkilendirilmemiştir.
6. rs550585475 varyantı dbSNP veri tabanında bildirilmiş ancak 1000 genom veri tabanında bildirilmemiştir. 2. ekzonda yer alan bu missense mutasyon *p.Asp241Val* değişikliğine yol açmakta olup in-siliko analizlerde tolere edilebilir bir değişiklik olabileceği düşünülmüştür. Ancak literatürde bu varyanta ilişkin çok az veri olduğundan net etkisi bilinememektedir.
7. Bu çalışmada 200 şizofreni hastasının DNA örneğinde *RASD1* geninin tamamı promoter, 5'UTR, her iki ekzon, intron ve 3'UTR bölgesini kapsayacak şekilde Sanger dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. Olgularda saptanan varyantlar şizofreni ile ilişkilendirilememiştir. Dexras1 proteininin fonksiyonları, hücre içerisinde rol aldığı sinyal yolakları ve etkileşimde olduğu bazı proteinlerin

şizofreni etiyolojisinde yer aldıkları düşünüldüğünde; *RASD1* geni ile ilgili gen, transkript ve protein düzeyinde yapılacak çalışmaların şizofreni hastalarının post-mortem beyin dokularında yapılması, bu genin şizofreni etiyolojisindeki olası rolünü anlamak açısından önemli olacaktır.

ÖZET

Şizofreni Hastalarında *RASD1* Geni Mutasyonlarının Araştırılması

Şizofreni kronik seyirli ve tekrarlayan psikozlarla karakterize psikiyatrik bir hastalıktır. Şizofreninin toplumda görülme sıklığı yaklaşık %1 olarak belirtilmektedir. Günümüzde şizofreni tanısında rutin olarak kullanılan biyolojik bir marker bulunmadığından şizofreni tanısı klinik olarak koyulmaktadır. Post mortem beyin dokularından yapılan çok sayıda anatomik ve histokimyasal çalışmalara, patolojik incelemelere ve fonksiyonel nörogörüntülemelere rağmen şizofreninin patogenezi net olarak aydınlatılamamıştır.

Dexras1, *RASD1* geni tarafından kodlanan ras süper ailesine mensup küçük bir GTPazdır. Dexras1 proteini glutaminerjik post sinaptik terminalde oluşan Dexras1-NOS1AP-NOS1 üçlü kompleksinin bir bileşenidir. NOS1, NMDAR aracılı kalsiyum akışı ile aktive olur ve nitrik oksit üretilir. Oluşan NO Dexras1'in S-Nitrozilasyonunu sağlar. S-Nitrozilasyon sonrası aktive olan Dexras1 hücre içinde işlevlerini gerçekleştirir. Dexras1, Gαi proteinlerini aktive ederek adenil siklazı ve dolayısıyla ERK/MAPK/CREB sinyal yolaklarını inhibe eder. Dexras1 gerek daha önce şizofreni ile ilişkisi gösterilmiş NOS1, NOS1AP ve NMDAR ile olan yakın ilişkisi, gerekse rol aldığı hücre içi sinyal yolakları ile şizofreni etiyolojisinde rol oynama potansiyeli olan bir proteindir.

Bu çalışmada şizofreni tanılı 200 hastaya ait DNA materyalinde *RASD1* tüm gen (promoter, 5'UTR, her iki ekzon, intron ve 3'UTR bölgesi) dizi analizi yapılmıştır. Olguların %87'sinde *RASD1* geninde en az bir varyant saptanmıştır. Bir tanesi 5'UTR, bir tanesi intronik bölge, bir tanesi 2. ekzon ve altı tanesi 3'UTR bölgesinde olmak üzere toplam 9 farklı varyant tespit edilmiştir. Bu dokuz varyantın sekiz tanesi dbSNP veri tabanında daha önce tanımlanmış değişiklikler olup, 3'UTR bölgesinde yer alan NM_016084.4:c*32G>A değişikliği ilk kez bu çalışmada tanımlanmıştır. Yapılan in-siliko analizler sonucunda bu varyantlar şizofreni ile ilişkilendirilememiştir.

Anahtar kelimeler: *RASD1*, Dexras1, şizofreni, dizi analizi, *NOS1*, *NOS1AP*, NMDAR

SUMMARY

Investigation of *RASD1* Gene Mutations in Schizophrenia Patients

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder characterized by recurrent psychotic attacks. The incidence of schizophrenia in the population is reported as about 1%. Currently, there are no biological markers routinely used in the diagnosis of schizophrenia, so the diagnosis is based on clinical assessments. Despite numerous anatomical and histochemical/pathological examinations of post-mortem brain tissues and functional neuroimaging studies, pathogenesis of schizophrenia is still unknown.

Dexras1 (Dexamethasone-induced Ras-related protein 1) is a small GTPase encoded by the *RASD1* gene and belongs to the ras superfamily. The Dexras1 is a component of the Dexras1-NOS1AP-NOS1 ternary complex in the glutaminergic post-synaptic terminal. NOS1 is activated by NMDAR-mediated calcium influx so that nitric oxide is produced. Dexras1 is activated by S-Nitrosylation caused by NO. Active Dexras1 inhibits adenylyl cyclase through Gαi activation; as a result of this interaction ERK/MAPK and CREB signal pathways are indirectly inhibited. Dexras1 has a potential role in the etiology of schizophrenia with its close interactions with NOS1, NOS1AP and NMDAR which were previously shown to be associated with schizophrenia, as well as its functions in intracellular signaling pathways.

In this study; we performed sequence analysis (promoter, 5'UTR, both exons, intron and 3'UTR) of *RASD1* in DNA sample of 200 schizophrenia patients and nine variants in different regions of the gene were found. At least one variant was detected in 87% of cases. Distribution of these variants was as follows: one in 5'UTR, one in the intronic region, one in exon 2 and six in the 3'UTR. While eight of nine variants was defined in the dbSNP database; NM_016084.4:c*32G>A variant, located in 3'UTR, was described in this study for the first time. None of the variants detected in this study was found to be associated with schizophrenia by in-silico analysis.

Anahtar kelimeler: *RASD1*, Dexras1, schizophrenia, sequence analysis, *NOS1*, *NOS1AP*, NMDA

KAYNAKLAR

ABEL, K. M., DRAKE, R. & GOLDSTEIN, J. M. 2010. Sex differences in schizophrenia. *International Review of Psychiatry,* 22**,** 417-428.

ANDREASEN, N. C. 1982. Negative symptoms in schizophrenia: definition and reliability. *Archives of General Psychiatry,* 39**,** 784-788.

ASSOCIATION, A. P. 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*, American Psychiatric Pub.

BOURQUE, F., VAN DER VEN, E. & MALLA, A. 2011. A meta-analysis of the risk for psychotic disorders among first-and second-generation immigrants. *Psychological medicine,* 41**,** 897-910.

BRZUSTOWICZ, L. M. 2008. NOS1AP in schizophrenia. *Current psychiatry reports,* 10**,** 158-163.

BUTLER, M. G., MCGUIRE, A. B., MASOUD, H. & MANZARDO, A. M. 2016. Currently recognized genes for schizophrenia: High-resolution chromosome ideogram representation. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics,* 171**,** 181-202.

CANDEMIR, E., KOLLERT, L., WEIßFLOG, L., GEIS, M., MÜLLER, A., POST, A. M., HARRO, J., REIF, A. & FREUDENBERG, F. 2016. Interaction of NOS1AP with the NOS-I PDZ domain: Implications for schizophrenia-related alterations in dendritic morphology. *European Neuropsychopharmacology,* 26**,** 741-755.

CARDNO, A. G., MARSHALL, E. J., COID, B., MACDONALD, A. M., RIBCHESTER, T. R., DAVIES, N. J., VENTURI, P., JONES, L. A., LEWIS, S. W. & SHAM, P. C. 1999. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Archives of general psychiatry,* 56**,** 162-168.

CARLSON, G., LIN, R., CHEN, Y., BROOKSHIRE, B., WHITE, R., LUCKI, I., SIEGEL, S. & KIM, S. 2016. Dexras1 a unique ras-GTPase interacts with NMDA receptor activity and provides a novel dissociation between anxiety, working memory and sensory gating. *Neuroscience,* 322**,** 408-415.

CHEN, Y., KHAN, R. S., CWANGER, A., SONG, Y., STEENSTRA, C., BANG, S., CHEAH, J. H., DUNAIEF, J., SHINDLER, K. S. & SNYDER, S. H. 2013.

Dexras1, a small GTPase, is required for glutamate-NMDA neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience,* 33**,** 3582-3587.

CHENG, H. Y. & OBRIETAN, K. 2006. Dexras1: shaping the responsiveness of the circadian clock. *Semin Cell Dev Biol,* 17**,** 345-51.

CLARKE, M. C., HARLEY, M. & CANNON, M. 2006. The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin,* 32**,** 3-8.

COURTNEY, M. J., LI, L.-L. & LAI, Y. Y. 2014. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling. *Frontiers in cellular neuroscience,* 8**,** 252.

COX, A. D. & DER, C. J. 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases,* 1**,** 2-27.

COYLE, J. T. 2012. NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. *Schizophrenia bulletin,* 38**,** 920-926.

DI FORTI, M., MORGAN, C., DAZZAN, P., PARIANTE, C., MONDELLI, V., MARQUES, T. R., HANDLEY, R., LUZI, S., RUSSO, M. & PAPARELLI, A. 2009. High-potency cannabis and the risk of psychosis. *The British Journal of Psychiatry,* 195**,** 488-491.

ERHARDT, S., OLSSON, S. K. & ENGBERG, G. 2009. Pharmacological manipulation of kynurenic acid. *CNS drugs,* 23**,** 91-101.

FANG, M., JAFFREY, S. R., SAWA, A., YE, K., LUO, X. & SNYDER, S. H. 2000. Dexras1: AG protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron,* 28**,** 183-193.

FREUDENBERG, F., ALTTOA, A. & REIF, A. 2015. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. *Genes, Brain and Behavior,* 14**,** 46-63.

GOITRE, L., TRAPANI, E., TRABALZINI, L. & RETTA, S. F. 2014. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Ras Signaling.* Springer.

GOLDMAN-RAKIC, P. S., CASTNER, S. A., SVENSSON, T. H., SIEVER, L. J. & WILLIAMS, G. V. 2004. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology,* 174**,** 3-16.

GONZALEZ-BURGOS, G., HASHIMOTO, T. & LEWIS, D. A. 2010. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Current psychiatry reports,* 12**,** 335-344.

GRAHAM, T., QIAO, Z. & DORIN, R. 2004. Dexras1 inhibits adenylyl cyclase. *Biochemical and biophysical research communications,* 316**,** 307-312.

GRAHAM, T. E., PROSSNITZ, E. R. & DORIN, R. I. 2002. Dexras1/AGS-1 inhibits signal transduction from the Gi-coupled formyl peptide receptor to Erk-1/2 MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry,* 277**,** 10876-10882.

GREENWOOD, M. P., GREENWOOD, M., MECAWI, A. S., ANTUNES-RODRIGUES, J., PATON, J. F. & MURPHY, D. 2016. Rasd1, a small G protein with a big role in the hypothalamic response to neuronal activation. *Molecular brain,* 9**,** 1.

HARRISON, L. M. & LAHOSTE, G. J. 2013. The role of Rhes, Ras homolog enriched in striatum, in neurodegenerative processes. *Experimental cell research,* 319**,** 2310-2315.

KAHN, R. S., SOMMER, I. E., MURRAY, R. M., MEYER-LINDENBERG, A., WEINBERGER, D. R., CANNON, T. D., O'DONOVAN, M., CORRELL, C. U., KANE, J. M., VAN OS, J. & INSEL, T. R. 2015. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers,* 1**,** 15067.

KEMPPAINEN, R. J. & BEHREND, E. N. 1998. Dexamethasone rapidly induces a novel ras superfamily member-related gene in AtT-20 cells. *Journal of Biological Chemistry,* 273**,** 3129-3131.

KEMPPAINEN, R. J., COX, E., BEHREND, E. N., BROGAN, M. D. & AMMONS, J. M. 2003. Identification of a glucocorticoid response element in the 3′-flanking region of the human Dexras1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression,* 1627**,** 85-89.

KHANDAKER, G. M., COUSINS, L., DEAKIN, J., LENNOX, B. R., YOLKEN, R. & JONES, P. B. 2015. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *The Lancet Psychiatry,* 2**,** 258-270.

KRABBENDAM, L. & VAN OS, J. 2005. Schizophrenia and urbanicity: a major environmental influence—conditional on genetic risk. *Schizophrenia bulletin,* 31**,** 795-799.

LIEBERMAN, J. A., PERKINS, D., BELGER, A., CHAKOS, M., JARSKOG, F., BOTEVA, K. & GILMORE, J. 2001. The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biol Psychiatry,* 50**,** 884-97.

MENA, A., RUIZ-SALAS, J. C., PUENTES, A., DORADO, I., RUIZ-VEGUILLA, M. & DE LA CASA, L. G. 2016. Reduced prepulse inhibition as a biomarker of schizophrenia. *Frontiers in behavioral neuroscience,* 10**,** 202.

MILLER, B., MESSIAS, E., MIETTUNEN, J., ALARÄISÄNEN, A., JÄRVELIN, M.-R., KOPONEN, H., RÄSÄNEN, P., ISOHANNI, M. & KIRKPATRICK, B. 2011. Meta-analysis of paternal age and schizophrenia risk in male versus female offspring. *Schizophrenia bulletin,* 37**,** 1039-1047.

MURRAY, C. & LOPEZ, A. 1996. The global burden of disease. 1996. *Genève, OMS***,** 201-246.

NAKAMINE, A., OUCHANOV, L., JIMÉNEZ, P., MANGHI, E. R., ESQUIVEL, M., MONGE, S., FALLAS, M., BURTON, B. K., SZOMJU, B. & ELSEA, S. H. 2008. Duplication of 17 (p11. 2p11. 2) in a male child with autism and severe language delay. *American Journal of Medical Genetics Part A,* 146**,** 636-643.

NUECHTERLEIN, K. H., BARCH, D. M., GOLD, J. M., GOLDBERG, T. E., GREEN, M. F. & HEATON, R. K. 2004. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. *Schizophrenia research,* 72**,** 29-39.

NUSSBAUM, R. L., MCINNES, R. R. & WILLARD, H. F. 2015. *Thompson & Thompson genetics in medicine,* Elsevier Health Sciences.

OWEN, M. J., SAWA, A. & MORTENSEN, P. B. 2016. Schizophrenia. *Lancet,* 388**,** 86-97.

ROJAS, A. M., FUENTES, G., RAUSELL, A. & VALENCIA, A. 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J cell Biol,* 196**,** 189-201.

SCHWARZ, M. J. 2009. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders—relation to drug treatment. *Dialogues Clin Neurosci,* 11**,** 319-32.

SEKAR, A., BIALAS, A. R., DE RIVERA, H., DAVIS, A., HAMMOND, T. R., KAMITAKI, N., TOOLEY, K., PRESUMEY, J., BAUM, M. & VAN DOREN, V. 2016. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature,* 530**,** 177-183.

SEMA, O. & GÖKTALAY, G. 2012. Şizofreni Hastalığının Biyolojik Belirteçlerinden Olan Ön Uyaran Aracılı İnhibisyon Testine (ÖUAİ) Göre Gruplandırılmış Sıçanların Dizosilpin (MK-801)'e Verdikleri Yanıt Farklılıkları. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 2**,** 5-10.

STEFANSSON, H., RUJESCU, D., CICHON, S., PIETILÄINEN, O. P., INGASON, A., STEINBERG, S., FOSSDAL, R., SIGURDSSON, E., SIGMUNDSSON, T. & BUIZER-VOSKAMP, J. E. 2008. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature,* 455**,** 232-236.

THAPLIYAL, A., VERMA, R. & KUMAR, N. 2014. Small G Proteins Dexras1 and RHES and Their Role in Pathophysiological Processes. *International journal of cell biology,* 2014.

WANG, J., JIN, L., ZHU, Y., ZHOU, X., YU, R. & GAO, S. 2016. Research progress in NOS1AP in neurological and psychiatric diseases. *Brain research bulletin,* 125**,** 99-105.

WEBER, H., KLAMER, D., FREUDENBERG, F., KITTEL-SCHNEIDER, S., RIVERO, O., SCHOLZ, C.-J., VOLKERT, J., KOPF, J., HEUPEL, J. & HERTERICH, S. 2014. The genetic contribution of the NO system at the glutamatergic post-synapse to schizophrenia: further evidence and meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology,* 24**,** 65-85.

WENNERBERG, K., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J cell Sci,* 118**,** 843-846.

WHITE, R. S., BHATTACHARYA, A. K., CHEN, Y., BYRD, M., MCMULLEN, M. F., SIEGEL, S. J., CARLSON, G. C. & KIM, S. F. 2016. Lysosomal iron modulates NMDA receptor-mediated excitation via small GTPase, Dexras1. *Molecular brain,* 9**,** 38.