

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**OTİZMDE MİKRORNA'LAR İLE İLİŞKİLİ HEDEF
GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Tuğba TOPALOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Elif Funda ŞENER**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**OTİZMDE MİKRORNA'LAR İLE İLİŞKİLİ HEDEF
GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Tuğba TOPALOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Elif Funda ŞENER**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından TYL-2017-5789 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tuğba TOPALOĞLU

İmza:

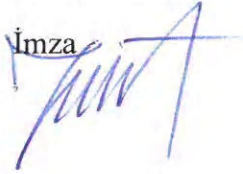


YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Otizmde MikroRNA’lar ile İlişkili Hedef Genlerin Ekspresyonlarının Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans** tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Tuğba TOPALOĞLU

İmza 


Danışman

Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

İmza

Tıbbi Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

İmza 

Doç. Dr. Elif Funda ŞENER danışmanlığında **Tuğba TOPALOĞLU** tarafından hazırlanan “**Otizmde MikroRNA’lar ile İlişkili Hedef Genlerin Ekspresyonlarının Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / /

(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır.)

JÜRİ:

Danışman: **Doç. Dr. Elif Funda ŞENER**

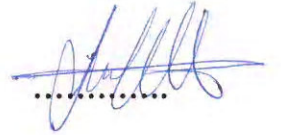
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye: **Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ**

(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye: **Yrd. Doç. Dr. Züleyha DOĞANYİĞİT**

(Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)




ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... / /

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen, hem kişisel hem de akademik olarak gelişebilmem için yoğun çaba sarfeden, tez çalışmam süresince her türlü sıkıntıda yanına koştüğüm ve tezimin her aşamasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım danışmanım, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e teşekkür ederim.

Öğrencinin her halinden anlayan ve samimiyetle yardımına koşan, ikinci bir danışman gibi her zaman yanımda olan ve beni destekleyen değerli hocam Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye teşekkür ederim.

Fikir ve laboratuvar tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Zuhale HAMURCU'ya teşekkür ederim.

Tezim için gerekli hastaları temin etmemde bana destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Didem Behice ÖZTOP, Yrd. Doç. Dr. Sevgi ÖZMEN ve Yrd. Doç. Dr. Esra DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Bu tezin deney aşamasında çok büyük emeği olan Bio. Mustafa AKKUŞ'a, yüksek lisans öğrenimim süresince edindiğim laboratuvar tecrübelerimde büyük emeğe sahip olan Uzm. Bio. Kezban KORKMAZ BAYRAMOV ve Sağlık Teknikeri Fatma DAL'a teşekkür ederim.

İlkokuldan bugüne kadar bütün okul hayatım boyunca benim üzerimde emeği olan öğretmenlerime teşekkür ederim.

Tanıştığımız ilk günden beri 'Sen kesinlikle genetik araştırmalar yapmalısın' diyerek beni genetik çalışmalara yönlendiren ve manevi desteğini sürekli hissettiren emekli Prof. Dr. Gönül GÜLTEKİN hocama teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini sürekli yanımda gördüğüm çok değerli aileme, tez savunma jüri üyelerime, çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tuğba TOPALOĞLU

Kayseri, Aralık 2017

OTİZMDE MİKRORNA’LAR İLE İLİŞKİLİ HEDEF GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Tuğba TOPALOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2017

Danışman: Doç. Dr. Elif Funda ŞENER

ÖZET

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), kompleks davranış fenotipi ile teşhis edilen, etiyolojik ve klinik olarak heterojen nörogelişimsel bozuklukların bir grubudur. Klinik bulguların heterojenlik göstermesi hastalık altında yatan mekanizmaların açıklanmasını zorlaştırmaktadır. Klinik araştırmalar genetik ve çevresel faktörlerin otizmin gelişiminde temel bir rol oynadığını göstermiştir. MikroRNA (miRNA)’lar, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde gen ekspresyonunun düzenleyicileridir. Son yıllarda yapılan çalışmaların bazıları otizmlili bireylerde miRNA ekspresyon paternlerinin değişimine odaklanmıştır. Her bir miRNA tarafından yönlendirilen çoklu mRNA hedeflerinin translasyonel kontrolündeki anormallikler OSB’lilerde gözlenen fenotip farklılıklarına yol açabilir. Bu tez çalışmasında, DSM-IV ve DSM-V tanı kriterlerine göre OSB tanısı konulan 50 hasta ile 50 sağlıklı kontrolde, miRNA’ların (miR-3613-3p, miR-19a-3p) hedefinde olan ve otizmde aday gen olarak gösterilen genlerin (*POGZ*, *PTEN*) ekspresyonlarını araştırdık. Araştırmanın sonucunda *POGZ* geninin hasta bireylerde kontrollere göre daha fazla eksprese olduğu ve bu genin ekspresyonunun hasta erkeklerde anlamlı olduğu bulundu. *PTEN* gen ekspresyonunun ise hastalarda kontrollere göre daha az olduğu ve istatistiksel açıdan anlamsız olduğu tespit edildi. Ayrıca bilişsel geriliğe sahip hastalar ve bu genlerin ekspresyonunun ilişkisi de araştırılmış olup, bu sonuçlar anlamsız olarak rapor edildi. Sonuç olarak daha fazla hasta sayısı ile miRNA’ların hedefinde olabilecek diğer olası aday genlerin de araştırılmasını ve çıkan sonuçların otizmin farklı klinik bulgularıyla karşılaştırılmasını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Otizm, Otizm Spektrum Bozukluğu, miRNA, *PTEN*, *POGZ*

INVESTIGATION OF TARGET GENE EXPRESSIONS ASSOCIATED WITH MICRORNA'S IN AUTISM

Tuğba TOPALOĞLU

Erciyes University, Health Sciences Institute

Medical Biology Department Master Thesis, December 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elif Funda ŞENER

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of etiologically and clinically heterogeneous neurodevelopmental disorders diagnosed by the complex behavioral phenotype. The heterogeneity of clinical findings makes it difficult to explain the mechanisms underlying the disease. Clinical trials have shown that genetic and environmental factors play a fundamental role in the development of autism. MicroRNAs (miRNAs) are regulators of gene expression in transcriptional and post-transcriptional levels. Some of the recent studies have focused on the modulation of miRNA expression patterns in autistic individuals. Abnormalities in the translational control of multiple miRNA targets directed by each miRNA may lead to phenotype differences observed in ASDs. In this thesis, we investigated the expression of genes (*POGZ*, *PTEN*) which are shown as candidate genes in autism and targeted miRNAs (miR-3613-3p, miR-19a-3p) in 50 patients with ASD diagnosis according to DSM-IV and DSM-V diagnostic criteria and 50 healthy controls. As a result of the study, it was found that the *POGZ* gene was more exaggerated in patients than controls and the expression of this gene was significant in the sick men. *PTEN* gene expression was found to be lower in patients than controls and statistically insignificant. In addition, the relationship between the expression of these genes and patients with cognitive deficits has been investigated, and these results have been reported as meaningless. As a result, we recommend that to investigate other possible candidate genes which may be the target of miRNAs in larger numbers of patients and compare the results with different clinical manifestations.

Key Words: Autism, Autism Spectrum Disorders, miRNA, *PTEN*, *POGZ*

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI	3
2.1.1.Tanımı ve Tarihçesi	3
2.1.2.Otizm	4
2.1.3.Asperger Sendromu	4
2.1.4.Başka Türli Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar.....	5
2.2. OTİZMDE EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR	5
2.3.OTİZM KLİNİĞİNDE GÖRÜLEN FENOTİPLER	6
2.4.OTİZM GENETİĞİ.....	7
2.4.1. Kromozom Analizleri	8
2.4.2.Bağlantı ve İlişki Çalışmaları.....	8
2.4.3.Kopya Sayısı Değişimleri (CNV).....	9
2.4.4.Moleküler Genetik Çalışmalar	11
2.5. ADAY GEN YAKLAŞIMI: OTİZMDE ADAY GENLER	12
2.6. OTİZMDE ÇEVRE ETKİLEŞİMLERİ.....	13
2.7. EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN OTİZME ETKİSİ	14
2.8. MikroRNA (miRNA).....	15
2.8.1. miRNA'nın Genomik Organizasyonu, Biogenezi ve Fonksiyonu	18
2.8.2. Otizmde miRNA Çalışmaları.....	21
2.9. Araştırdığımız Genler Hakkında Genel Bilgi.....	26

2.9.1. <i>POGZ</i> (Pogo Transposable Element Derived with ZNF Domain).....	26
2.9.2. <i>PTEN</i> (Phosphatase and Tensin Homolog).....	27
3.GEREÇ veYÖNTEM.....	31
3.1.Tezde Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	33
3.3.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları.....	33
3.3.1. KandanTotal RNA İzolasyonu	34
3.3.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi.....	35
3.3.3. Kantitatif Real-Time PCR ile <i>POGZ</i> ve <i>PTEN</i> Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması.....	36
3.4.Rölatif Kantitasyon	37
3.5. İstatistiksel Analiz	38
4.BULGULAR	39
4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	39
4.2. OSB Tanısı Konulan Hastalarda Real-Time PCR Analiz Sonuçları.....	41
4.2.1. <i>POGZ</i> Geni Ekspresyon Sonuçları.....	41
4.2.2. <i>PTEN</i> Geni Ekspresyon Sonuçları	41
4.3. Otizmlili Hastalar ve Kontrollerdeki <i>POGZ</i> ve <i>PTEN</i> Genlerinin Ekspresyon Sonuçları.....	43
4.4. ID ve <i>POGZ</i> Ekspresyonu İlişkisi.....	46
4.5. ID ve <i>PTEN</i> Ekspresyonu İlişkisi	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
6.KAYNAKLAR	53
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AKT	: Akt Murine Thymoma Viral Oncogene
APA	: Amerikan Psikiyatri Derneği
AS	: Asperger Sendromu
CARS	: The childhood Autism Rating Scale/ Çocukluk Otizmi Değerlendirme Ölçeği
CNV	: Kopya Sayısı Değişimleri
cDNA	: Komplementer DNA
CHD8	: Kromodomain Helikaz DNA bağlayan Protein 8
DGCR8	: DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8
Drosha	: RNAaz III enzimi
DSM	: The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders / Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistik El Kitabı
DSM-III	: Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistik El Kitabı III
DSM-IV	: Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistik El Kitabı IV
DSM-V	: Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistik El Kitabı V
DZ	: Dizigotik İkizler
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GTP	: Guanozin Trifosfat
GWAS	: Geniş Genom İlişki Çalışmaları
ID	: Intellectual Disability/Bilişsel Gerilik
IQ	: Intelligence Quotient/Zeka Derecesi
miRNA	: MikroRNA
ml	: Mililitre
MZ	: Monozigotik İkizler
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
OSB	: Otizm Spektrum Bozukluğu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POGZ	: Pogo Transposable Element-Kökenli Protein Kodlayan Gen
PP2A	: Protein fosfataz 2
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
PI3K	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase

PIP3	: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
Pre-miRNA	: Prekürsör miRNA
pri-miRNA	: Primer miRNA
RISC	: RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi
RT	: Reverse Transcriptase
RNA	: Ribonükleik asit
qRT-PCR	: Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
µl	: Mikrolitre
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism/Tek Nükleotid Polimorfizmi
Trizol	: Total RNA Isolation Reagent
TSC	: Tübero Skleroz Kompleks
TSC1	: Tübero Skleroz Kompleks 1
TSC2	: Tübero Skleroz Kompleks 2
YGB	: Yaygın gelişimsel bozukluklar
YGB-BTA	: Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar
<i>β-ACTIN</i>	: Aktin Beta
XPO5	: Exportin 5
3'UTR	: 3' Kodlanmayan Bölge

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Otizmde Etiyolojik Faktörler	8
Tablo 2.2. OSB'deki Belli Başlı Aday Genlerin Listesi	12
Tablo 2.3. OSB'de miRNA Çalışmaları.....	24
Tablo 3.1. Cihazlar Listesi.....	32
Tablo 3.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler Listesi.....	33
Tablo 3.3. Otizimli Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme ya da Edilmeme Nedenleri.....	34
Tablo 3.4. cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı	35
Tablo 3.5. cDNA Sentezi için Reaksiyona Eklenen Karışım.....	36
Tablo 3.6. Ekspresyon Çalışması için Hazırlanan Karışım.....	37
Tablo 3.7. LightCycler 480 II Software Programında Ayarlanan Sıcaklıklar ve Süreleri.....	37
Tablo 4. 1. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrollerin Demografisi	39
Tablo 4. 2. Otizimli Hastalardaki Klinik Bulgular	40
Tablo 4. 3. Gruplar Arası Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	43
Tablo 4.4. Hasta Erkekler ve Kontrollerdeki <i>POGZ</i> Gen Ekspresyon Sonuçları.....	44
Tablo 4. 5. Hasta Kızlar ve Kontrollerdeki <i>POGZ</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	44
Tablo 4. 6. Hasta Erkekler ve Kontrollerdeki <i>PTEN</i> Gen Ekspresyon Sonuçları	45
Tablo 4. 7. Hasta Kızlar ve Kontrollerdeki <i>PTEN</i> Gen Ekspresyon Sonuçları.....	46
Tablo 4. 8. <i>POGZ</i> gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin Analizi.....	47
Tablo 4. 9. <i>PTEN</i> gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin Analizi	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	miRNA'nın Biyogenezi.	19
Şekil 2.2.	miRNA'nın Etki Mekanizması.	21
Şekil 2.3.	<i>POGZ</i> Geninin Kromozom Lokalizasyonu	26
Şekil 2.4.	<i>PTEN</i> Protein Yapısı.....	28
Şekil 2.5.	<i>PTEN</i> 'in Temel Fonksiyonu.....	29
Şekil 4.1.	<i>POGZ</i> Geninin Otizm Hasta Grubundaki Ekspresyon Düzeyi	41
Şekil 4.2.	<i>POGZ</i> Geninin Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeyi	41
Şekil 4.3.	<i>PTEN</i> Geninin Otizm Hasta Grubundaki Ekspresyon Düzeyi.....	42
Şekil 4.4.	<i>PTEN</i> Geninin Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeyi	42
Şekil 4.5.	50 Hasta ve 50 Kontrolde <i>PTEN</i> ve <i>POGZ</i> Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.6.	Hasta Erkek ve Hasta Kızlarda <i>POGZ</i> Ekspresyonlarının Kontrollerle Karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.7.	Hasta Erkek ve Hasta Kızlarda <i>PTEN</i> Ekspresyonlarının Kontrollerle Karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.8.	ID'ye sahip olan ve olmayan hastalarda <i>POGZ</i> ve <i>PTEN</i> Ekspresyonlarının Karşılaştırılması.....	47

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), kompleks davranış fenotipi ile teşhis edilen, etiyolojik ve klinik olarak heterojen nörogelişimsel bozuklukların bir grubudur. Otizm ise OSB'nun yaygın bir alt tipidir (1). Bir çocukluk çağı hastalığı olarak otizmin; tekrarlayan davranış ve/veya kısıtlanmış ilgiler, karşılıklı bozulmuş sosyal iletişim ve etkileşimle karakterize edilen 3 çekirdek semptomu vardır (2). Bunlar bilişsel, duyuşsal ve sinirsel davranışlardır. Erkeklerde kızlara göre 3-4 kat daha fazla görülür ve kızlarda otizm erkeklere göre daha ağır seyreder. Karmaşık bir nörogelişimsel bozukluk olarak, otizmin fenotipi ve şiddeti, bir hastadan diğerine farklılıklarıyla son derece heterojendir (3-5). Hastalığın karmaşık etiyolojisi aynı ailede bile farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hatta bu hastalık ikiz kardeşlerde bile farklı klinik tablolarla karşımıza çıkmaktadır. Klinik bulguların heterojenite göstermesi hastalık altında yatan mekanizmaların açıklanmasını zorlaştırmaktadır (6). Klinik araştırmalar, genetik ve çevresel faktörlerin otizmin gelişiminde temel bir rol oynadığını göstermiştir (6,7). Erken çocukluk çağında başlayan ve yaşam boyu süren kronik bir hastalık tablosu olarak otizm; karmaşık etiyolojisiyle anlaşılmazlığını sürdürürken, bu hastalara halihazırda etkin bir tedavi yapılamamaktadır. Bugün dünyada rapor edilen otizm insidansında ciddi bir artış vardır. Günümüzde hastalığın prevalansı yaklaşık 1/68 olarak bildirilmiştir (8). Her geçen gün artan prevalansı, bu hastalığın tedavi sürecine hızlı ve etkili çözümler sunacak çalışmaların artması gerektiğini göstermektedir. Konuyla ilgili yapılan son araştırmalar otizmle ilişkili genler ve biyolojik yolların keşfinin, bu hastalığın tedavisinde umut vadeden bir araç olabileceği görüşünü ortaya koymuştur. Bugün, son verilere göre hastalıktan sorumlu tutulabilecek 800 farklı gen (hücre büyüme ve proliferasyonu, sinaptik aktivite ve organizasyon, dendritik morfoloji ve aksogenez, transkripsiyon düzenlenmesi, ubiquitinasyon, kromatin yeniden düzenlenmesi gibi farklı yollar söz konusudur) tanımlanmıştır (9).

miRNA'ların transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenlediği belirlenmiştir. Hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında miRNA'lar rol oynamaktadır (10). Bu küçük kodlanmayan RNA'ların, gelişim esnasında önemli nörolojik işlevleri düzenlemek için devasa bir kapasiteye sahip oldukları da artık bilinmektedir (11).

Son yıllarda yapılan araştırmaların sonucunda, nörolojik fonksiyon bozuklukları ile değişen miRNA profilleri ve hedef genleri arasında yakın bir ilişki bulunmuştur (12). Bu çalışmalar sonucunda anormal miRNA ekspresyonunun hastalık durumunu doğrudan yansıtabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Sağlık ve hastalık durumlarında miRNA'lar gibi küçük protein kodlamayan RNA'ların rolünün belirlenmesine yönelik yapılan biyobelirteç çalışmaları artmıştır. Yapılan literatür incelemesine göre, otistik davranışların sıklığı ve biyolojik dokularda değişen miRNA ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olan yalnızca birkaç çalışma mevcuttur (13). Bu tez çalışmasında DSM-IV ve DSM-V tanı kriterlerine göre OSB tanısı konulan 50 hasta ile 50 sağlıklı kontrol üzerinde araştırma yapıldı. Otizmde aday gen olarak gösterilen ve miRNA'ların (miR-3613-3p, miR-19a-3p) etki ettiğini düşündüğümüz hedef genlerin (*POGZ*, *PTEN*) ekspresyonlarının araştırılması amaçlandı. Ayrıca bu ekspresyonların bilişsel gerilikle ilişkilerinin olup olmadığı da araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUKLARI

2.1.1.Tanımı ve Tarihçesi

OSB, sosyal etkileşim ve iletişim yetersizlikleri, kesilmiş, tekrarlayan stereotipik davranış paternleri ile karakterize olan moleküler ve fenotipik olarak heterojen nörogelişimsel bozuklukların bir grubunu oluşturmaktadır (3,14,15). Bu hastalık, her geçen gün artan yaygınlığı ile üzerinde en çok bilimsel araştırma yapılan bir klinik tanı grubu olma özelliğini taşımaktadır (16). Giderek daha da fazla insanı etkileyemeye başlayan otizm, son derece ciddiye alınması gereken bir bozukluktur (17).

Otizm, merkezi sinir sisteminin gelişimsel bir bozukluğu olup, temel olarak sosyal biliş (kognisyon) etkilemektedir. Sözlü ve sözsüz iletişim bozuklukları, tekrarlayan davranış kalıpları ve sınırlı ilgiden dolayı otizmlili hastaların sosyal ilişkilerinde sorunlar mevcuttur. Klinik belirtilerinin erken çocukluk çağında başlaması ve semptomlarının yaşam boyu sürmesiyle otizm, kronik bir bozukluktur. Yaşla ve olgunlaşma ile otizm semptomların görünüm ve şiddetinde değişiklik görülmektedir. Günümüze kadar bu hastalığın etiyojisi tam olarak saptanamamıştır (1). İlk kez 1943 yılında Amerikalı çocuk psikiyatristi Dr. Leo Kanner, konuyla ilgili 11 olgu sunarak bu durumdan infantil otizm şeklinde söz etmiştir ve ilk kez ‘otistik’ tanımını kullanmıştır (16,18,19). Yapılan tanımlamanın ardından davranışsal olarak değişen sosyal eksiklikler, dil ve iletişim yetersizlikleri ve stereotipik-tekrarlayan davranışlar gibi 3 bulguya dayanarak bu hastalığa tanı konulmaya başlanmıştır (18). Bu grupta tanımlanan olgularda, insanlarla ilişki kurma güçlüğü, ekolali (sesleri tekrar etme), zamirlerin tersten söylenmesi, tekrarlayıcı ve amaçsız davranışlar ve değişime direnç belirtileri bildirilmiştir (19). Kanner’in tanımladığı birçok özellik günümüzde geçerliliğini korumaktadır (1,20).

Kanner otizmi tanımlarken bu hastalığın doğuştan geldiğini düşünmüştür (19). Ancak son yapılan çalışmalar, bu bozuklukta genetik ve çevresel etmenlerin birlikte ya da birbirinden bağımsız etkileşimlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkabildiğini göstermiştir

(6,7). Otizm, 1980’de “infantil otizm”, 1987’de “otistik bozukluk” ve günümüzde ise genellikle “otizm” ya da şemsiye terim “Otizm Spektrum Bozukluğu” olarak yeniden adlandırılmıştır (21).

2.1.2.Otizm

Otizm şiddetli davranışsal bir sendromdur ve büyük ölçüde kalıtılan bir bozukluktan ortaya çıkan çeşitli fenotipik semptomları içerisinde barındırmaktadır. OSB’nin kesin nedeni bilinmezliğini sürdürmesine rağmen, genetik değişimler/kalıtılabilirlik temel katkıda bulunan faktörlerden biridir (22). Otizmlı çocukların beyni olgunlaşmadan uzun süre önce semptomların ortaya çıkması bu hastalığın bir gelişim bozukluğu olduğunu açık bir şekilde desteklemektedir. Otistik fenotip heterojenken, sosyal ve dil becerilerindeki anomaliler hastalığın merkezinde bulunmaktadır (23).

Birçok araştırmacı OSB’yi, yüksek fonksiyonlu otizm (yüksek kognitif fonksiyona dayanan, zeka bölümü 70 puandan yüksek olanlar), düşük fonksiyonlu otizm (kognitif fonksiyonda azalma olmayan ya da olan OSB), sendromik OSB, sendromik olmayan OSB ve diğerleri olarak alt tiplerine kategorize etmiştir. Sendromik olmayan OSB, klinik bir durumu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Burada OSB birinci derece teşhis edilmektedir ve gelişimsel anomaliler ya da malformasyonların kombinasyonu ile karakterize edilen çok fazla kompleks bozukluğun bir parçası değildir. Diğer yandan sendromik otizmde, tipik olarak hastalığın altında yatan genetik bir sendrom görülmektedir. Sendromik olan otizmlı bireylerde Angelman Sendromu, Frajil X Sendromu, Rett Sendromu gibi otistik semptomların önemli bir alt tipi gelişmektedir (9). Otizm tanısı konan çocukların %70’inde mental retardasyon (zeka geriliği) olduğu bildirilmektedir ve bu nedenle otizm sıklıkla zeka geriliğinin bir tipi olarak gösterilmektedir (23). Bilişsel geriliğin eşlik ettiği OSB’li çocukların çoğu yaşam boyu sosyal ve eğitim desteğine büyük ölçüde ihtiyaç duymaktadır (24).

2.1.3.Asperger Sendromu

Asperger Sendromu (AS), kısıtlı ilgi alanı ve tekrarlayıcı hareketlerin yanı sıra sosyal alanda da belirgin zorluklarla karakterize olan yaygın gelişimsel bozukluklardan biridir (25). AS, OSB’nin bir parçasıdır ancak, 3 yaşından önce gelişimsel bozukluk belirgin değildir, erken dönem dil gelişiminde otizmde görülen gecikme ve sapmalara rastlanmaz ve bilişsel işlevlerde otizme göre daha az bozulma olduğu bilinmektedir (25, 26).

2.1.4.Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluklar

YGB-BTA' da, otizme benzer gelişimsel ve davranışsal sorunlarla karakterize olmakla birlikte, bilişsel ve iletişim becerileri, otizmi olan çocuklardan daha iyidir ve bilgiç konuşma gibi AS'yi düşündüren bulgular içermemektedir (26,27). Ayrıca YGB-BTA otizme göre 1,5 kat daha sık görülmektedir (26).

2.2. OTİZMDE EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Otizm uzun yıllar nadir bir hastalık olarak bilinmekteydi. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar bu hastalığın nadir olmadığını gündeme getirmiştir. 40 yılı aşkın bir süre zarfında, OSB prevalansı bölgesel farklılıklar olmakla birlikte dünya çapında hızlı bir şekilde artış göstermektedir (28). Otizm, 1980'lerde her 10,000 çocuktan 4-5'inde görülürken, 1990'larda yapılan çalışmada her 10,000 çocukta 30-60 otizm vakasının varlığı şaşırtıcı bir artışı rapor etmiştir (29). Hong Kong'ta yapılan epidemiyolojik çalışmalarda 1999 yılında 229, 2005 yılında ise 651 otizm vakası olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda otizm vakalarının görülme sıklığında alarm veren bir artış olduğu belirtilmiştir (30). Otizmin yaygınlık oranları son 10 yılda önemli ölçüde artmıştır (3, 31). Amerika Birleşik Devletleri'nin 'Hastalıkları Kontrol Merkezi' (Center for Disease Control) tarafından 2006 yılında otizmin her 150 çocukta bir görüldüğü rapor edilmiştir. 2011 yılında Güney Kore'de yapılan kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmada 7-12 yaş arası 55 bin çocuğun değerlendirilmesi sonucu OSB prevalansı %2.64 olarak saptanmıştır. 2012 yılında yapılan çalışmada ise bu hastalığın her 88 çocuktan birinde görüldüğü bildirilmiştir (16). Yayınlanan son raporlarda, Amerika Birleşik Devletleri'nde otizmin her 68 çocuktan birinde görüldüğü bildirilmektedir ve bu hastalığın prevalansı her geçen gün artmaktadır. Günümüzde yapılan epidemiyolojik çalışmalar OSB'nin sıklığının %1'in üzerinde olduğunu rapor etmiştir (32). Giderek artan prevalansı bu hastalığın ciddiye alınması gerektiğini göstermektedir. Kısa bir zaman diliminde çok hızlı artan görülme sıklığı otizmin gelecekte aile üyeleri üzerine ağır bir yük getireceği aşikardır.

Otizmin artan prevalansının kısmen toplum bilincinin ve tanılmal uygulamaların artmasından dolayı olduğu düşünülmektedir (9,33). Otizmin görülme riski açısından sosyal sınıflar arasında ise hiçbir farklılık gözlenmemektedir (34). Ülkemizde otistik bozukluğun yaygınlığına ilişkin kapsamlı bir tarama yapılmadığı için henüz yeterli

bilimsel veri bulunmamaktadır (16). Türkiye’de otistik bozukluğun sıklığının dünya geneline yakın olduğu tahmin edilmektedir (34).

2.3.OTİZM KLİNİĞİNDE GÖRÜLEN FENOTİPLER

Otizm kliniğinde fenotipik tabloya bakıldığında, bu tablonun tıpkı hastalığın genetik etiyolojisi gibi aşırı derecede karmaşık olduğu görülmektedir. Otizmde aynı klinik bulguları olan birden fazla hastanın bulunduğu aileler azdır (14). OSB, kompleks davranış fenotipi ile teşhis edilmekte olup, etiyolojik ve klinik olarak son derece heterojen bir bozukluktur (33). Tek bir tanısal kategori olarak, OSB’liler, kısıtlanmış ilgi ve stereotipik davranışlarda olduğu gibi, sosyal etkileşim ve sözlü olmayan iletişimde yaygın eksiklikler göstermektedir (22). Çoğu vakada, OSB semptomları ilk kez çocukluğun erken dönemlerinde tanımlanır (33). Otizmin belirtileri 6-12 ay öncesi çok fark edilebilir düzeyde olmayabilir, ancak olguların önemli bir kesiminde bu yaş diliminden sonra belirtiler dikkat çekmeye başlar (16). Bu bozukluk genellikle 3 yaş civarında teşhis edilir (35) ve erkek bireylerde kızlardan 4 kat daha fazla görülmektedir (18). OSB’liler davranışsal ve emosyonel (duygusal) kontrol problemlerine sahiptirler (36). OSB’li çocuklar sıklıkla günlük rutinlerine bağlı, belirli konularla zihinlerini meşgul eden ve dokunma ya da sesler gibi duyuşal girişlere karşı aşırı duyarlıdırlar (33). Otizm temel olarak sosyal kognisyonu etkileyen bir hastalıktır (18). Otizmlili çocuklarda görülen zeka geriliği nedeniyle, bu çocuklar insanlarla ilişki kurmada ve arkadaş edinmede zorlanabilmektedir. Sosyal etkileşimde isteksizlik ya da ilişkilerden kaçınma ortaya çıkabilir. Zeka geriliği olan çocuklar, insan ilişkilerine zararlı olabilecek yollarla da iletişim kurmaktadır (37,38). Örneğin; uygunsuz yüz ifadesi ve vücut teması, sözel ifade zayıflığı, uygunsuz yorumlar gibi. Otistik bozukluğa sahip bireylerde öğrenme sorunları da gözlenmektedir (39). Otizm tanısı konan çocukların %70’inde zeka geriliği olduğu bildirilmektedir (23). Ancak otistik bireylerin bir kısmında zeka derecesi (IQ) 70 ve üzerinde ölçülmüştür (23,37,38). Buradan anlaşılabileceği üzere otistik özelliğe sahip bireylerin hepsinde bilişsel işlevlerde azalma görülmemektedir. OSB erkeklerde daha yaygın görülürken, kızlarda daha ağır seyrettiği ve daha fazla mental retardasyonun eşlik ettiği bilinmektedir (16).

OSB’li bireyler aynı zamanda bilişsel gerilik (ID), epilepsi, motor kontrol zorlukları, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, tikler, anksiyete, uyku bozuklukları, depresyon

ya da sindirim sistemi problemlerini içeren diğer psikiyatrik ve tıbbi hastalıklardan acı çekebilirler (32,34).

Otizmin bazı genetik hastalıklar ile ilişkili olduğu görülmüştür. Otistik bireylerde (%10-15); Frajil X Sendromu, Rett Sendromu, Tübero Skleroz, Angelman Sendromu gibi sendromlar ve çeşitli kromozomal anormallikler görülmektedir (1). Frajil X Sendromu'ndan sorumlu gen *FMRI*'dir ve otizmlili hastaların %7-8'inde görülmektedir. Bu sendromda bilişsel gerilik en önemli bulgudur. Rett Sendromu ise, 6 ve 18 aylar arasında kız bebeklerde otistik benzeri davranışsal semptomları göstermiş olan nöroregresif bir bozukluktur. Tübero Skleroz; deri, retina, kalp, böbrek, beyin tümörleri ve nöbetlere sebep olan otozomal dominant bir sendromdur. Hastaların yaklaşık %50-60'ı mental retardasyona sahiptir ve hastaların %40-80'i otizm benzeri davranışlara sahiptir. Angelman Sendromu, şiddetli mental retardasyon, epilepsi ve otistik benzeri davranışsal özelliklere sebep olmaktadır (23).

2.4.OTİZM GENETİĞİ

Genetik faktörlerin rol oynadığı hastalıklar, genetik materyalin etkilenme şekline bağlı olarak; kromozomal hastalıklar, tek-gen hastalıkları ve multifaktöriyel hastalıklar olmak üzere üç grup altında değerlendirilmektedir (40). Multifaktöriyel hastalıklar, genetik bozukluklar ile çevresel olumsuzlukların etkileşimi, birden fazla genetik bozukluğun birlikteliği veya birden fazla genetik bozukluk ile çevresel etkilerin bir araya gelmesi sonucu oluşmaktadır. Bu grup hastalıklarda düzenli bir kalıtım görülmezken, hasta bir bireyin bulunduğu bir ailede ikinci bir bireyin hasta olma riski genel popülasyona göre artış göstermektedir (41).

Otizm multifaktöriyel özelliğe sahip olan psikiyatrik bir hastalıktır. Psikiyatrik hastalıkların yaygın etiyojisi, polimorfizmler, gen delesyonları ya da insersiyonlar gibi genetik faktörler ile stres gibi çevresel faktörleri içermektedir (42). OSB, genetik ve fenotipik kompleksliği ile nörogelişimsel bozuklukların geniş bir spektrumunu kapsamaktadır. OSB'nin özel fenotipini açıklamak için sebep olan genetik değişimleri tanımlamak amacıyla yoğun çabalar harcanmıştır (22). Otizm genetiğini araştırmak için ikiz çalışmaları, aile çalışmaları, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmaları yapılmıştır (2). Genom taramaları, bağlantı analizi ve aday gen yaklaşımları ile otizmle ilgili kromozom bölgeleri ve genler bulunmuştur (34). OSB patogenezinin tek bir genin sorumlu olmadığı artık bilinmektedir (22). Yapılan çalışmalara rağmen OSB'li

bireylerin %15'inden fazlasında özel bir genetik etiyoloji tahmin edilmekte olup, vakaların çoğu halen çözümlenmemiştir (43). Bu durum ise Mendeliyen genetiğin ötesindeki genetik mekanizmaların (epigenetik mekanizmalar) da katkısı olabileceğini düşündürmektedir (9). Otizme neden olan etiyolojik faktörler Tablo 2.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Otizmde Etiyolojik Faktörler (1).

1. Genetik Hastalıklar
2. Natal Faktörler
3. Nöroanatomik Faktörler
4. Nörokimyasal Faktörler
5. İmmün Faktörler
6. Genetik Faktörler
7. Çevre Faktörleri

2.4.1. Kromozom Analizleri

Sitogenetik anomaliler, OSB'li bireylerde hemen hemen her kromozomda bulunmuştur (22). Otistik olgularda hem sayısal hem de yapısal çok sayıda kromozom anomalisi bildirilmiştir (1). OSB vakalarının yaklaşık olarak %15'inin ya gen mutasyonları ya da kromozomal yeniden düzenlemeler gibi bilinen bir genetik sebebe sahip oldukları tespit edilmiştir (22). Günümüze kadar, otizme sebep olduğu bilinen en yaygın sitogenetik anomali 15q11-q13 kromozomal bölgesinin duplikasyon ya da triplikasyonudur. Ayrıca kromozom 2'nin uzun kolunun distal kısmının delesyonları (2q37 delesyonları), otizme sebep olarak gösterilmiştir. Son zamanlarda 22q11.2 delesyonlu bireylerin patolojisini inceleyen çalışmalar, OSB'lilerin önemli bir kısmının bu delesyona sahip olduklarını göstermiştir. 22q13.3 delesyonları da OSB'li bireylerde tanımlanmıştır (44).

2.4.2. Bağlantı ve İlişki Çalışmaları

Otizme neden olabilecek kromozomal bölge ve lokusların tespit edilebilmesi için başlatılan ilk çalışmalar bağlantı ve ilişki çalışmaları şeklindeydi (34). 1980'lerden 2000'lere kadar, otizme yatkınlık sağlayan genetik varyasyonların tanımlanması

çoğunlukla, multiple etkilenen aile üyeleri ile geniş ailelerin bağlantı analizlerine dayanmaktaydı (9). Bağlantı ve ilişki çalışmaları ile belirli kromozom bölgelerinde (2, 3, 7, 11, 15, 17, X kromozomları) anlamlı sonuçlar bulunmuştur (34).

Gerçekleştirilen aile ve ikiz çalışmaları hastalığın etiyolojisinde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığını göstermiştir ve hastalığın kalıtılabilirliğinin %90'ın üzerinde olduğu belirlenmiştir (9, 32). Aile ve ikiz çalışmaları, tekrarlama riskinin kardeşlerde %2-3, dizigotik (DZ) ikizlerde %1-10, monozigotik (MZ) ikizlerde %82-92 konkordans (konkordans: ikizlerden biri hastalığa yakalandığında, diğerrinin de hastalığa yakalanma riskini ifade etmek için kullanılan bir terimdir) oranı ile otizmi 'en fazla genetik' nöropsikiyatrik hastalık olarak tanımlamıştır (18). Bilindiği üzere MZ ikizler genlerin tümünü, DZ ikizler ise genlerin yarısını paylaşmaktadırlar. MZ ikizlerde konkordans oranı %100'e ulaştığı zaman olayın tamamen genetik olduğu kabul edilmektedir (1). Otistik çocukların kardeşlerinde otizm görülme riskinin sağlıklı bireylerin kardeşlerinden 30-150 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir (34). Erken epidemiyolojik çalışmalar, OSB'li bir çocuğa sahip olma riskinin OSB'li bir çocuğa zaten sahip ailelerde önemli ölçüde daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Buna ek olarak, sosyal eksiklikler ve tekrarlayan davranışlar gibi otistik semptomların, multipleks otistik ailelerde agresyon gösterdiği bildirilmiştir. Benzer bir şekilde, sosyal ve kognitif eksiklikler için bu konkordans aynı sırayı takip etmekte olup, monozigotik> dizigotik> genel populasyon sırasını takip etmektedir (22). Konkordans oranlarında çok büyük farklılıklar olması ve kardeşlerdeki tekrarlama riskinin toplum riskine göre oldukça yüksek olması otizmde genetik etkiyi büyük ölçüde yansıtmaktadır. Ayrıca otizmde MZ konkordans oranının %100 olmaması ve de MZ ikizlerde DZ ikizlere göre konkordans oranının çok yüksek olması, hastalığın etiyolojisinde kalıtsal ve çevresel faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir (1). Yapılan aile çalışmaları ile de otizmin genetik bir hastalık olduğu kanıtlanmıştır. İkinci ve üçüncü derece akrabalarda hastalık hızının ciddi düşüş göstermesi bu bozukluktan sorumlu gen lokuslarının birbirleriyle etkileşim içinde olduklarının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bugüne kadar yapılan bağlantı veya ilişki çalışmalarında otizmden sorumlu tek bir major gen belirlenememiştir (34).

2.4.3. Kopya Sayısı Değişimleri (CNV)

İnsan genomunda en yaygın bulunan yapısal varyasyonlar kopya sayısı değişiklikleridir. CNV'lerin, kompleks nörogelişimsel bozuklukların patofizyolojisine katkı sağladıkları

bilinmektedir (9,24). Son zamanlarda, geniş genom ilişki çalışmaları (GWAS) ile birçok gen ve kromozom lokusu üzerinde OSB riski ile ilişkili birçok mutasyon ve varyasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar ve varyasyonlar arasında bir çift allelin sadece birinde bulunan delesyon ya da duplikasyona sahip nadir SNP (Single Nucleotide Polymorphism/Tek Nükleotit Polimorfizmleri)'ler ile *de novo* kopya sayısı varyasyonları (CNV) tespit edilmiştir. *De novo* CNV'lerin nedeni bilinmeyen OSB vakalarının %5-10'una katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. Bu mutasyon ve varyasyonların biyolojik rollerinin tanımlanması OSB patogenezinin altında yatan mekanizmaları tanımlamak ve klinik tedavileri geliştirmek için gereklidir (35).

Kromozomal mikroyarray ile tespit edilen submikroskobik kromozomal anomalileri arasında 16p11.2 bölgesinde mevcut CNV'ler OSB'de rapor edilmiştir (43). Günümüzde totalde 2000 CNV lokusundan daha fazlası otizmle ilişkilendirilmiştir (9, 22).

CNV'ler, ya delesyonla ya da duplikasyonla genomun yapısını değiştirebilir (24). Delesyon ve duplikasyonları içeren CNV'ler, OSB'li vakaların %8-20'si ile ilişkili bulunmuştur (22). CNV'ler *de novo* olabilir ya da kalıtım yoluyla edinilmiş olabilir (24). *De novo* ya da kalıtılan CNV'ler idiyopatik OSB vakalarının %10-20'sinden daha fazlasına karşılık gelmektedir (22). Otizmlili bireyler, kontroller ve etkilenmemiş aile üyeleriyle karşılaştırıldığında, *de novo* CNV yükünün otizmlili bireylerde 3-5 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (9). Ayrıca simpleks ailelerde *de novo* CNV'lerin multipleks ailelerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (24). CNV'lerin çoğu bireylere özgüdür ve etkilenen kardeşler her zaman aynı spesifik varyasyonları paylaşmamaktadır (45). Bazı bireylerde tek bir *de novo* mutasyon otizme sebep olmak için yeterli olabilecektir. Bazı bireyler için ise yaygın risk allellerinin çoğu (>1000)'nün birikmesi ile otizm riski artacaktır. Dolayısıyla, OSB genetik alt yapısındaki birçok genetik formun koleksiyonu olabilir (32).

Otizme yatkınlık sağlayan çoğu genetik varyant ve CNV'ler aynı zamanda diğer nörolojik ve davranışsal bozukluklara yatkınlıkta rol oynadığı tespit edilmiştir. Etkilenmiş bireyler aynı genetik varyantı taşıırken, bu bireylerde farklı klinik bozukluklar gözlenmektedir (9). Bu varyasyonların fenotipe nasıl yansıdığı tahmin edilememektedir.

2.4.4. Moleküler Genetik Çalışmalar

OSB'nin heterojen doğası üzerine, klasik genetik çalışmalar OSB için uygun aday genleri tanımlamada tam olarak başarılı olamamıştır (14). Moleküler teknolojilerdeki ilerlemeler sayesinde genomik dengesizliklerin tespitinde çözümler önemli ölçüde artmıştır. Moleküler genetik çalışmaları, hastaların yaklaşık olarak %10-25'inde sık görülmeyen ve genetik geçiş gösteren mutasyonları taşıyan 100'den fazla OSB risk genlerini tanımlamıştır (32). Sporadik otizmlili hastalarda tanımlanan tekrarlayan *de novo* fonksiyon kaybı mutasyonlarının bu hastalığın etiyolojisinde anahtar bir rol oynadığını desteklemiştir (46).

Genetik varyantlar ve kromozomal anomalilerin büyük çoğunluğu OSB ile ilişkilendirilmiştir. Bu varyantlar nadir fakat yüksek bir şekilde geçiş göstermeye eğilimlidir. Bazı vakalarda düşük penetranslı yaygın varyantlar da rapor edilmiştir. Ancak genetik varyantların ve kromozom anomalilerinin hiçbirisi popülasyonda OSB insidansını açıklamamaktadır. Genetik epidemiyolojik çalışmalar OSB'nin basit bir hastalık olmadığını birçok gen yollarını içeren semptomlara sahip olduğunu göstermiştir (33).

Otizm etiyolojisinde nadir varyantların ve yaygın genetik varyantların her ikisinin de rolü olduğuna dair kanıtlar vardır. Daha çok son zamanlarda (tüm ekzom sekanslama ve kromozom mikroyarray teknolojisinin yaygın kullanılması gibi) moleküler tanı teknolojisi alanında başlıca ilerlemeler ile genetik mimarinin oldukça heterojen olduğunu destekleyen yüzlerce OSB yatkınlık kromozom bölgesi ve genleri tanımlanmıştır (9). Daha fazla OSB risk genlerini tanımlayabilmek için, tüm ekzom ve genom çalışmaları gerçekleştirilmiştir (32). Yeni nesil sekans çalışmaları ile *de novo* mutasyonların OSB riskine büyük ölçüde katkı sağladığı gösterilmiştir (35). Özellikle bu bozukluğun etiyolojisinde genlerdeki olası *de novo* fonksiyon kaybı mutasyonları anahtar bir rol oynamaktadır (46).

Günümüze kadar OSB'ye sebep olan ve yatkınlık sağlayan genlerin binlercesi, kopya sayısı varyantları, bağlantı bölgeleri ve mikroRNA (miRNA)'lar OSB ile ilişkilendirilmiştir ve bu durum açık bir şekilde OSB'nin alt yapısı karmaşık olan bir genetik bozukluk olduğunu göstermektedir (22).

2.5. ADAY GEN YAKLAŞIMI: OTİZMDE ADAY GENLER

Bir hastalık geninin tanımlanması, bize o genin fonksiyonu ile ilgili hücresel mekanizmalar hakkında bilgi vermektedir ve hastalığın oluşumunu anlamamıza olanak sağlamaktadır (47). Aday genler, araştırılacak hastalık için hem işlevsel hem de fizyolojik olarak anlamlılıkları olduğuna dair kanıtlar elde edilmiş olan genlerdir (48). OSB'deki belli başlı aday genlerin listesi tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. OSB'deki Belli Başlı Aday Genlerin Listesi (9,24,34).

Kromozom Lokasyonu	Aday Genler
Kromozom 1	<i>BCL9, ASH1L, POGZ</i>
Kromozom 2	<i>NRXN1, SCN7A, SCN2A, TBR1</i>
Kromozom 3	<i>GAT1, OXTR, CNTN3, CNTN4, SLC9A9, D1A1, SETD5, FOXP1</i>
Kromozom 4	<i>ANK2</i>
Kromozom 6	<i>PARK2, ARID1B, SYNGAP1</i>
Kromozom 7	<i>FOXP2, WNT2, RELN, HOXA1, HOXB1, MET, EN2, AUTS2</i>
Kromozom 8	<i>DEFA2</i>
Kromozom 9	<i>TSC1, EHMT1</i>
Kromozom 10	<i>PTEN, ANKRD2</i>
Kromozom 11	<i>HRAS, BDNF, SUV420H1</i>
Kromozom 12	<i>GRIN2B</i>
Kromozom 14	<i>CHD8</i>
Kromozom 15	<i>RORA, GABRB3, GABRA5, GABRG3, UBE3A, ATP10C, CHRNA7</i>
Kromozom 16	<i>A2BP1, MVP, TSC2, USP7</i>
Kromozom 17	<i>5-HTT, PSD95, NF1, RAI1</i>
Kromozom 18	<i>ASXL3</i>
Kromozom 20	<i>ADNP</i>
Kromozom 21	<i>DYRK1A</i>
Kromozom 22	<i>SHANK3, PI4KA, SNAP29, TBX1, SLC7A4, SLC25A1, HIC2, UBE2L3, YPEL1, MAPK1</i>
Kromozom X	<i>MECP2, NLGN3, NLGN4, SLC9A6, FMRI, SMCX, CDKL5</i>

Bir hastalığın etiyolojisiyle ilgili olan birden fazla gen bulunabilir. Bu aday genlerin bulunduğu lokuslarda vaka ve kontroller genotipler açısından karşılaştırılır. Bağlantı analizi sonucunda belirlenen alanda birden fazla gen bulunma ihtimali yüksektir. Bu genlerden biri veya daha fazlası hastalıkla ilgili olabilir veya hastalık geni olabilir. Bu gen de dolayısıyla aday gen olarak adlandırılır (49).

OSB, poligenik doğaya ve klinik heterojeniteye sahip bir bozukluktur (50). Bu bozukluğun büyük ölçüde genetik orjinli olduğu artık bilinmektedir (14).

OSB'nin sebeplerini aydınlatmak için, yatkınlık lokusları ve aday genlerin yüzlercesinin keşfedilmemiş olması zorluk teşkil etmektedir (50). Otizmde genler esas bir rol oynar (11). OSB ile ilişkili aday genlerin nöronal farklılaşma ve migrasyonda rol oynadıkları bilinmektedir (35). Otizmde duyarlı genlerin saptanması altta yatan patofizyolojinin anlaşılmasına önemli ipuçları sağlayacaktır (14). Bu nedenle çalışmaların çoğu OSB'ye sebep olan genleri ve OSB patogeneze etkisi olan çoklu genleri tanımlamak için gerçekleştirilmiştir (22).

OSB patogenezinin tek bir genin sorumlu olmadığı artık bilinmektedir (22). OSB hastaları arasındaki klinik semptomların farklılığı otizm etiyolojisinde farklı genlerin varlığını yansıtmaktadır. Otizm patogenezinde nöropeptid, nörotrofin, sinaptik plastisite ve nöroimmünite ile ilişkili olan genlerin büyük rolü olduğu düşünülmektedir (34). Bu bozukluk muhtemelen, bu genler arasındaki etkileşimi ve birçok geni içeren bir bozukluktur (35).

Bugüne kadar otizmde yapılan aday gen çalışmaları genomik varyasyonların çok azını yakalayabilmiş ve genlerin fonksiyonları hakkında detaylı bilgiler elde edilememiştir.

2.6. OTİZMDE ÇEVRE ETKİLEŞİMLERİ

Son yıllarda kompleks kalıtımın aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, araştırmacıların çevresel faktörleri göz ardı etmeden genetik araştırmalara önem vermeleri gerektiğini göstermiştir. Çevresel faktörlerin, epigenetik mekanizmalar aracılığıyla DNA sekansında değişim olmaksızın gen ekspresyonunun kalitesini etkileyebileceği düşünülmektedir (29). Belirli çevresel faktörlere maruz kalmanın OSB riskini artırdığı desteklenmiştir. Hamilelik esnasında teratojenik maddelerin alımı (örneğin thalidomide, valproik asit ve misoprostol), hamileliğin erken aşamalarında sigara kullanımı, ileri anne-baba yaşı, çocukluk çağında belirli çevresel kimyasallara ya da ağır metallere

maruz kalma gibi nedenlerin OSB gelişen çocuklar arasında riski artırdığı rapor edilmiştir (9,35). Ayrıca hamilelik döneminde ilaç kullanımı, fetüste %46 otizm riski ile ilişkilendirilmiştir (29). Çevre kirliliği, aşılar gibi çevresel risk faktörlerinin, otizm prevalansının artışına katkısı olabileceği tartışılmaktadır (16,29). Geç yaşta baba olmanın toplumlarda artması, yardımcı teknolojilerle bebek sahibi olmanın sıklaşması gibi faktörler akla yatkın görünmektedir ancak bu bilgilerin araştırmalarla kesinleşmesi gerekmektedir. Çevresel faktörlerin otizm etiyojisi üzerine etkilerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (9,35).

2.7. EPIGENETİK DEĞİŞİMLERİN OTİZME ETKİSİ

Epigenetik kavramı, ilk defa 1950'li yıllarda Conrad Waddington tarafından önerilmiştir (48). Bu kavram, gen ifadesinin çeşitli mekanizmalarla (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA'lar ve uzun kodlanmayan RNA'lar) özellikle maruz kalınan çevresel etkenlere yanıt olarak değişikliğe uğratılabildiğini anlatmaktadır (51). Epigenetik etki, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesini değiştirmektedir. DNA metilasyonu, histon değişiklikleri ve kodlanmayan RNA moleküllerinin promotor metilasyonlarını içeren 3 ana mekanizma epigenetik etkinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (52). Bu mekanizmalar; transkript stabilitesini, DNA katlanmasını, nükleozom pozisyonunu, kromatin yoğunlaşmasını ve son olarak çekirdek organizasyonunu etkiler. İşbirliği içerisinde olan bu faktörler bir genin sessiz veya aktive durumda olmasını ve hangi dokuda ne zaman eksprese edileceklerini belirlemektedir (48).

Epigenetik faktörler gelişim döneminde gen fonksiyonunun açılıp/kapanması gibi veya ekspresyonunun düzenlenmesindeki değişiklikler şeklinde etki yapabilir (34).

Gen düzenleme bölgelerindeki hipermetilasyon veya hipometilasyon gibi epigenetik modifikasyonlar gen ekspresyonlarını etkileyebilmektedir. Pek çok çevresel faktör (antibiyotikler, kimyasallar gibi) CpG adalarının metilasyonunu etkilemektedir (53). Ayrıca, metil-CpG bağlayıcı proteinler olan MeCP2 and MBD2'nin mutasyonlarının Rett Sendromu ve OSB'ye yol açtığı tespit edilmiştir (48,49). Bunlara ek olarak, OSB'nin etiyojisinde en sık gözlenen kromozomal düzensizlik olan 15q11–13 duplikasyonunda, etkilenmiş gen GABA'nın farklı metilasyonları görülmektedir. Epigenetik modifikasyonlar OSB'nin fenotipik değişiklikleri ile sonuçlanabilmektedir (29,50). Bütün bu sonuçlar epigenetik düzenlemenin önemine işaret etmektedirler.

Epigenetik mekanizmalar son yıllarda OSB gibi çeşitli nörogelişimsel anomalilerin patogeneze potansiyel bir katkı sağlayıcı olarak tanımlanmıştır. Genetik ve çevresel faktörlerin çoğunun psikiyatrik bozukluğun gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Çevresel faktörler, epigenetik mekanizmaları düzenleyerek beyin plastisitesi ve davranışın kaderini değiştirmek için kişinin genomu ile etkileşebilir (42). Artan nörobilimsel kanıtlar yaygın OSB patolojisinde beyinde epigenetik düzenlemelerin gerçekleştiğini bildirmektedir ve merkezi sinir sisteminin gelişimini için epigenetik mekanizmalarının anlaşılmasının önemini desteklemektedir (54,55).

miRNA'ların, hedef genlerinin mRNA yıkımı ya da translasyonel baskılama gibi 2 temel mekanizma aracılığıyla hedef genlerinin ifade düzeylerini değiştirdiği bilinmektedir (56). Bu iki mekanizma ile miRNA'lar gen ekspresyonunu kontrol ederler ve böylelikle de protein ekspresyonu post-transkripsiyonel olarak düzenlenir (57).

Epigenetik mekanizmalarla değişikliğe uğratılmış gen ifadesi yaşam boyu sürebilir ve hatta kalıtılabilir. Beyinde sabit ve uzun süreli epigenetik değişimlerin bazı psikiyatrik bozuklukların nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (51).

2.8. MikroRNA (miRNA)

Kodlanmayan miRNA'lar, *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve arkadaşları tarafından ilk kez 1993 yılında tanımlanmıştır (58). miRNA'lar, 19-25 nükleotid uzunluğunda olan, mRNA yıkımına veya translasyonel inhibisyona neden olarak gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahip epigenetik bir mekanizmadır (59). miRNA'ların çeşitli mekanizmalar aracılığıyla temel hücresel işlevleri düzenledikleri bilinmektedir (11,12, 60). miRNA gibi, post-transkripsiyonel mekanizmalar geniş ölçüde DNA kodunu değiştirmeksizin gen ekspresyonunu etkilemektedir (61). Nörogelişimde, nöroplastisitede ve diğer temel nörobiyolojik işlevlerde miRNA'lar kritik rol oynamaktadır (3). Tüm bu nedenlerle kodlanmayan RNA'lar arasında global dikkati en fazla miRNA'lar çekmiştir (62).

En son miRBase versiyonu (v21, Kasım 2017) insanda 1881 prekürsör ve 2588 olgun miRNA'nın bulunduğunu belirtmektedir (63). İnsan mRNA'sının yaklaşık olarak üçte ikisinin bu miRNA'lar tarafından düzenlendiği (33) ve düzenlenen bütün genlerin %60'ın üzerinde olduğu tahmin edilmiştir (64). Bu çok büyük bir sayı olup, üretilen her 100 proteinden 60'ının translasyonunda miRNA'ların olaya dahil olduğu anlamına gelmektedir (64).

Hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde miRNA'ların bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında rol oynadığı bilinmektedir (10,12,33,56,64). Tek bir miRNA, farklı fonksiyonları olan yaklaşık 200 hedef gene bağlanabilmektedir ve tek bir hücredeki yüzlerce fonksiyonu düzenleyebilmektedir (10,61).

Genomda saklı bulunan genetik bilgilerin bir kısmı sırasıyla önce mRNA'ya sonra da proteine dönüştürülürler. Proteinler işlevsel açıdan önemli moleküllerdir. miRNA'lar protein kodlamazlar ancak hücresel işleyişte çok önemli düzenleme basamaklarına katılırlar. Bu küçük kodlanmayan RNA'lar, protein translasyonunu değiştirmek ve/veya mRNA'nın ekspresyon seviyelerini düzenlemek için hedef transkriptlerde sekansa özel bölgelere bağlanırlar (65). miRNA sekansları farklı türler arasında özeldir ve çeşitli dokularda tespit edilmiştir (12). Hedef bölgeye bağlanan bu miRNA'ların, mRNA yıkımı ya da translasyonel baskılama aracılığıyla genin susturulmasını etkileyebileceği bilinmektedir (10,14). mRNA'nın kararlılığının bozulması, gen ekspresyonunda değişikliklere neden olarak hücresel işlevlerde bozulmalara yol açabilir (14).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, miRNA fonksiyon bozukluklarının insan hastalıklarının patogeneğinde kritik bir öneme sahip olabileceği gösterilmeye başlanmıştır (60, 66). Bu araştırmaların sonucunda bazı miRNA'ların hedef genlerinin değişen ekspresyonlarının, nörolojik fonksiyon bozuklukları ile yakın bir şekilde ilişkili olduğu desteklenmiştir (12). miRNA ekspresyonu, hem fizyolojik hem de patolojik hastalıklarda dokuya özgü davranışta epigenetik olarak değiştirilir ve bu değişim oldukça kompleks olup dinamik bir süreçtir (67). Epigenetik analizler genetik analizlerden çok daha karmaşıktır. Örneğin benzer genetik kodlar bireylerin bütün hücrelerinde aynıdır ancak epigenetik kodlar dokuya özgüdür ve yaşam boyu dinamiktir (52). Bu nedenle miRNA'ların ekspresyon profili doku-hücre spesifik özellik göstermektedir. Anormal miRNA ekspresyonu hastalık durumunu direk olarak yansıtabilmektedir (68). Son zamanlarda, sağlık ve hastalık durumlarında miRNA'lar gibi küçük protein kodlamayan RNA'ların rolünün belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar artmıştır.

Tek bir miRNA ve patojenik bir protein arasındaki bu ilişkide komplekslik vardır (12). Her bir miRNA tarafından yönlendirilen çoklu mRNA hedeflerinin translasyonel kontrolündeki anormallikler OSB'lilerde gözlenen fenotip farklılıklarına yol açabilir (24,31). Bu yüzden tek bir miRNA'dan ziyade çoklu miRNA kombinasyonlarını analiz

etme, kompleks hastalıklarda teşhisin spesifitesini ve duyarlılığını artırabilir (12). Belirli patolojik hastalıklarda olduğu gibi, çoğu miRNA yetişkin sinir sisteminde oldukça fazla eksprese edilirler. miRNA'ların bu ekspresyonları, sadece her özel beyin bölgesi ve hücre tipinde değil, aynı zamanda dinlenme ya da aktif durumlardaki şartlarda ya da aşırı uyarı durumlarında da yoğun kontrol altındadır. miRNA aktivitelerini temel alan gen düzenleme ağları bilhassa beyin fonksiyonunda önemli olabilir (69). Nöropsikiyatrik bozuklukların ölüm sonrası (post-mortem) nöropatolojisinde birçok miRNA'nın fonksiyonunun bozulduğunu gösteren kanıtlar vardır (56). OSB beyninde rapor edilmiş olan transkripsiyonel değişimlerin düzenlenmesinde miRNA'ların önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür (64).

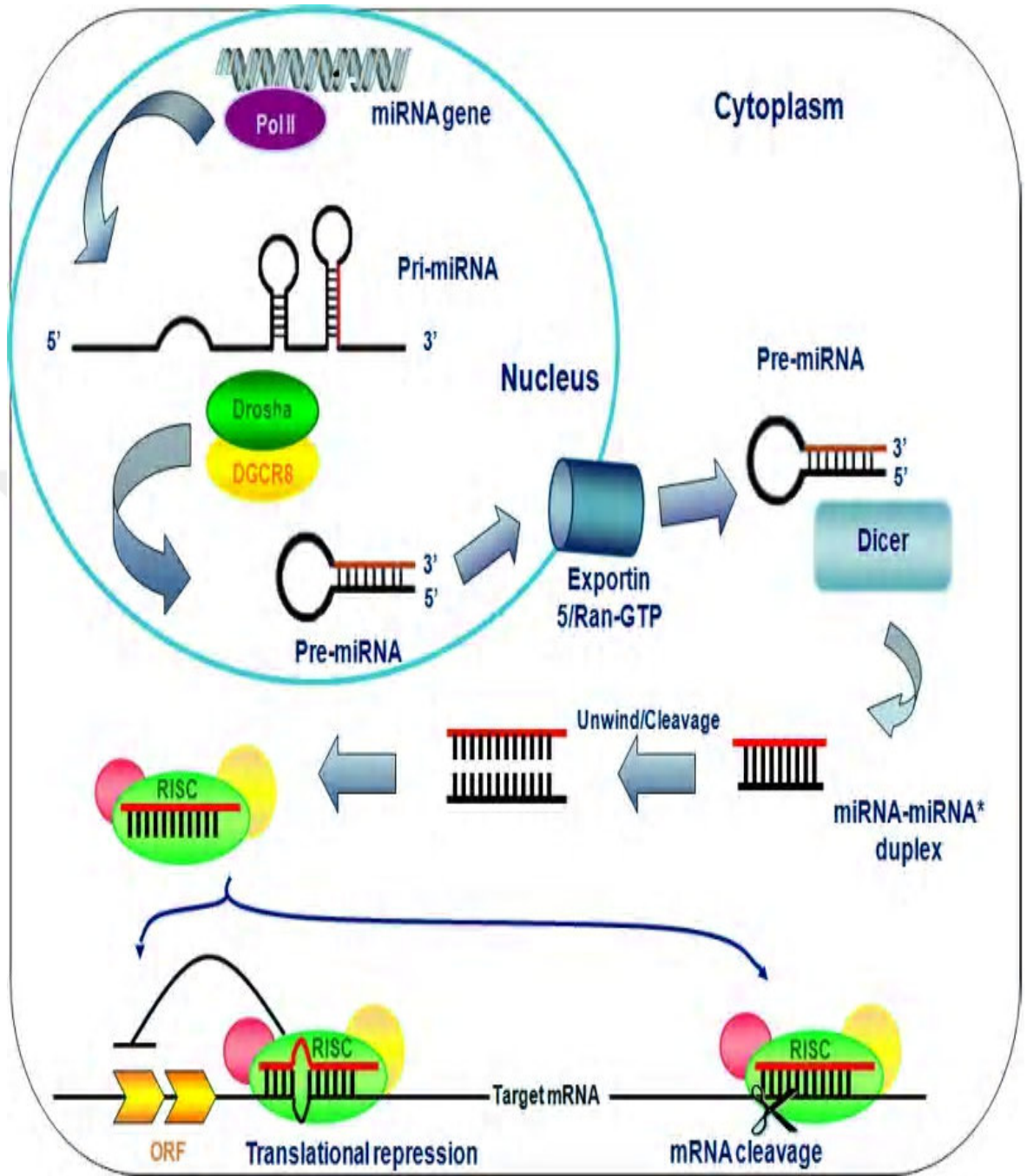
miRNA'ların öncelikle, sadece hücre ve dokularda eksprese oldukları bilinmekteydi. Fakat son yapılan araştırmalarla serum, plazma, tükürük, ürin, memedeki süt, seminal plazma, gözyaşı, amniyotik sıvı, kolostrum (ağız sütü), bronşial lavaj, serebrospinal sıvı, peritoneal sıvı ve plevral sıvı gibi hücre dışı vücut sıvılarında da tespit edilmiştir ve aşırı derecede stabil olduğu görülmüştür (12). miRNA'lar kan dolaşımında da saptanabilmektedir (10). Farklı hücre yerleşimleri ve bağlanma bölgeleri ile miRNA'ların, gen ekspresyonunda yeni fonksiyonları destekleyebileceği düşünülmüştür (62). Hücrel ve sirküle olan miRNA'ların değişen ekspresyonları, sağlıklı kontrollerle karşılaştırılan otistik bireylerde gözlenmiştir (12). Beynin miRNA'larının ekspresyonları, çocukluk çağı boyunca farkedilir bir şekilde değişkenlik gösterdiği ve beyin bölgeleri arasında da çeşitlendiği bilinmektedir. Nöronlar ve glia, miRNA'ların bol kaynaklarıdır ve bunlar kan beyin bariyerinden geçebilir. miRNA'ların hücre dışı stabilitesi ve kolay ulaşılabilirliği onları biyobelirteç keşfi için ideal bir aday yapar (33). Bu bakımdan literatürde miRNA'ların klinik bir biyobelirteç olarak kullanılmasına ilişkin çalışmalar mevcuttur (14,33,42). miRNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu iyi detaylandırılmış olmasına rağmen, miRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki dinamik etkileşimin aydınlatılmasına henüz yeni başlanmıştır (62). miRNA'lar kantitatif Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak kolay bir şekilde tespit edilebilir. Aynı zamanda miRNA ekspresyonu patolojik süreçler esnasında değişebilir. Sirkülasyonda değişen miRNA ekspresyon profillerinin hastalıklı dokulardaki değişimleri yansıtabileceği göz ardı edilmemelidir. Son yıllarda miRNA'lar otizm kliniğinde yeni teröpatik stratejilerin gelişimi için potansiyel hedefler olarak

düşünülmektedir. Bu potansiyel biyobelirteçleri klinikte etkin bir şekilde uygulamada ise hala çeşitli zorluklar vardır (12).

2.8.1. miRNA'nın Genomik Organizasyonu, Biyogenezi ve Fonksiyonu

miRNA'ların kromozomal yerleşimleri, kendi gen ifadelerini ve fonksiyonlarını etkilemektedir. İnsan genomundaki miRNA'lar, kromozomlar üzerinde tek veya kümelenmiş olarak lokalize olmuştur. miRNA genlerinin genom boyunca bulunduğu rapor edilmiştir (56). miRNA'lar genler arası (intergenik), gen içi (intragenik), intron (intronik) ya da ekzonlardaki (ekzonik) yerleşimlerine göre sınıflandırılmaktadır (70). Memeli miRNA'larının %70'i intronlarda ve çoğunluğu protein kodlayan genlerde yer alır. Geriye kalan miRNA'lar kodlama yapmayan transkripsiyon ünitelerinde eşit oranlarda ekzonik ve intronik bölgelerde bulunmaktadır (71).

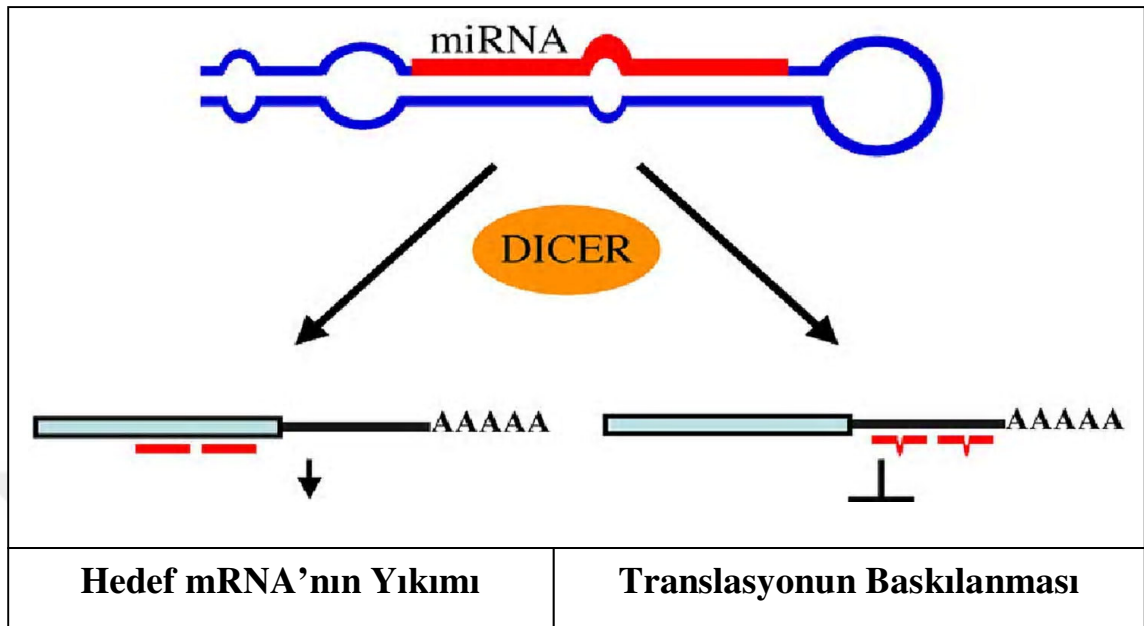
miRNA'ların biyolojik oluşum süreci, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi işlemler sonucunda meydana gelmektedir (72). Şekil 2.1.'de miRNA'nın biyogenezi gösterilmektedir.



Şekil 2.1. miRNA'nın Biyogenezi. **miRNA:** mikroRNA, **pri-miRNA:** primer miRNA, **Drosha:** RNAaz III enzimi, **DGCR8:** DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, **Pre-miRNA:** Prekürsör miRNA, **XPO5:** Exportin 5, **GTP:** guanozin trifosfat, **Dicer:** RNAaz III enzimi, **RISC:** RNA indüklenmiş susturma kompleksi (73).

Hücre içerisindeki gen susturma kompleksi olan RNA ile indüklenen susturma kompleksini (RISC; RNA-induced silencing complex) aktive edecek özelliğe ulaşabilmek için mi-RNA'lar birtakım aşamalardan geçerler (65). miRNA genlerinin büyük çoğunluğu RNA polimeraz II (pol II), birkaçı ise RNA polimeraz III (pol III) tarafından transkribe edilir (57). miRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II-III aracılığıyla transkripsiyon ile başlamaktadır (56). İlk aşamada, RNA bağımlı RNA polimeraz II-III, kalıp olarak endojen veya ekzojen kaynaklı bir RNA'yı kullanarak çift zincirli RNA molekülünü sentez eder (65). Bu yapı intron bölgelerinden saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşir ve primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılır (57,65).

Bu pri-miRNA'lar, olgun miRNA dizisini içeren uzun bir miRNA'dır ve mRNA'lara benzer şekilde 5' uçlarında 7 metil guanozin ve 3' uçlarında ise poli adenozin taşır (72). Saç tokası yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü Di-George Sendromu'nda kritik bölge 8 (DGCR8)'den oluşan bir mikroişlemci tarafından kesilir. Mikroişlemci komplekste DGCR8 RNA yapısını tanıırken, Drosha katalitik bir alt birim gibi fonksiyon göstermektedir. Drosha çift iplikli ilmek yapısını pri-miRNA'dan ayırarak 60-70 nükleotid uzunluğunda prekürsör miRNA'nın (pre-miRNA) oluşmasına neden olur. Oluşan pre-miRNA, nükleer transport kompleksi olan Exportin 5 ve Ran-GTP tarafından nükleus porlarından sitoplazmaya taşınır ve burada Dicer (bir RNAaz III enzimi) saç tokası sonunda bulunan döngüyü yaklaşık 21-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli bir miRNA'ya keser. Olgun diziye kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RISC) ile Argonaute'a yüklenir. RISC kompleksi olgun miRNA ve hedef mRNA'yı bir araya getirmek için gereklidir. Ayrılmış miRNA dubleksinin sadece kılavuz zinciri RISC kompleksine girebilir. Kılavuz zinciri dışındaki miRNA zinciri ve prekürsör yapının geri kalanı degrade olur. miRNA'nın dahil olduğu RISC kompleksi, hedefi olan mRNA'ya yönelir. Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3'-UTR bölgesi ile olgun miRNA'nın 5'ucundaki 2-8. nükleotidlerinin yer aldığı çekirdek dizi aracılığıyla etkileşir (72). miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi ya da tam eşleniklik göstererek bağlanabilirler. Eğer tam bir eşleşme gerçekleşirse RISC hedef mRNA'ları degrade eder, şayet kısmi eşleşme gerçekleşecek olursa hedef mRNA translasyonel olarak baskılanmış olur (70,71). Şekil 2.2.'de miRNA'ların etki mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.2. miRNA'nın Etki Mekanizması. miRNA'lar hedef genlerini 2 temel mekanizma aracılığıyla düzenler. Bunlardan birincisi hedef mRNA'nın yıkımı olup diğer mekanizma ise translasyonel baskılamadır (74).

2.8.2. Otizmde miRNA Çalışmaları

OSB'li bireyler, sosyal davranış ve iletişimde kesintiler ile stereotipik davranışlara sahiptir. Bu bozukluğun genetik etiyojisi halen bilinmezliğini sürdürmektedir. miRNA'lar, ekspresyon seviyesinde değişiklikler yaparak OSB riskine katkıda bulunabilirler (75).

Literatürde OSB'de mikroRNA'ların rolünü araştıran sadece birkaç çalışma vardır (3, 33). Tablo 2.3'te OSB'li hastaların çeşitli biyolojik örneklerinden gerçekleştirilen miRNA çalışmaları gösterilmiştir. Hicks et al. (33) tarafından miRNA ekspresyonları, OSB hastalarının post-mortem serebellumunda ilk kez incelenmiştir. OSB'li insan hastaların post-mortem beyin dokusunu inceleyen 4 çalışmada, kontrollerle karşılaştırıldığında ekspresyon farklılığı gösteren 91 miRNA tanımlanmıştır (33).

Abu-Elneel et al. (76) tarafından otizmlili hastaların post-mortem serebellar korteksinde miRNA'lar ve onların beyne özgü hedeflerinin değişmiş ekspresyonları ilk kez gözlemlenmiştir. Bu çalışmada OSB'li 13 yetişkinin serebellar kortekslerinde farklı ekspresyonları olan 28 miRNA tanımlanmıştır ve bunların 7 tanesinin *SHANK3*

transkriptini hedeflediği bilinmektedir. *SHANK3* OSB'lilerde patofizyolojik hedeflerden sadece birisidir (76).

Schumann et al. (75) tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada 10 (5 erkek, 5 kız) OSB'li ve 8 (6 erkek, 2 kız) kontrolün post-mortem temporal korteksinde toplam 54 miRNA'nın ekspresyonu incelenmiştir. Cinsiyet olarak farklılaşan miRNA'ların miR-219 ve miR-338 olduğunu ve bunların oligodendrosit farklılıklarını geliştirdiğini, miR-125'in nöronal farklılaşmada rolü olduğunu, miR-488'in ise anksiyetede gösterildiğini rapor etmişlerdir. Önceki miRNA çalışmaları göz önüne alındığında her iki cinsiyette varsayılan miRNA hedeflerinin önemli ölçüde sinir sistemi ve immün sistem yollarında yer aldığı belirlenmiştir. Yaygın yollarda bile, bu özel miRNA'ların ekspresyonları sıklıkla erkek ve kadın bireylerde farklıdır. Yapılan bu çalışmayla OSB'lilerin beyinde de cinsiyetler arasında miRNA ekspresyonlarının farklılık gösterdiği desteklenmiştir. OSB'li kızların, OSB'li erkeklerle karşılaştırıldığında genel olarak daha fazla bozulan miRNA ekspresyonu gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma akla şu soruyu getirmektedir: acaba otizmin erkeklerde kızlara göre daha fazla görülmesinde belirli miRNA'ların ekspresyonu mu sebep olmaktadır? Gelecekte otizmde cinsiyete ve kişiye özgü farmakolojik tedavide bu durumun netleştirilmesi önem taşımaktadır (75).

Yetişkin beyinde miRNA ekspresyon profillerini çalışan bir araştırmada miRNA'ların çoğunun hipokampus ve kortekte özel olarak eksprese edildiğini göstermiştir. Bu çalışma ile sinaptik plastisite ve hafızanın oluşumunda miRNA'nın önemli olabileceği vurgulanmıştır (57).

Otistik bireylerin beyinlerinin bazı bölgelerinde az sayıda miRNA'da fonksiyon kaybı olduğu rapor edilmiştir. miR-188, miR-181b ve miR-137'nin otizmde farklı bir şekilde eksprese oldukları doğrulanmıştır. miR-137 için varsayılan bağlanma bölgelerini içeren en az 250 otizmle ilişkili gen, otizmlili çocukların bazı beyin bölgelerinde gösterilmiştir (11).

miR-124 ve miR-9'un nörogenezde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların baskılanmasının nöronların sayısını azalttığı, aşırı ekspresyonlarının ise astrosit sayısını azalttığı tespit edilmiştir (77).

Yapılan bir başka çalışmada, otizmlili hastaların periferik kanlarında farklı şekilde eksprese olan miRNA'lar, mikroarray analizleriyle tanımlanmıştır. Çalışmanın

sonucunda anormal bir şekilde eksprese olan miR-34'ün otizmin erkeklerde daha fazla görülmesini açıklayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Anormal bir şekilde eksprese olan miR-103a-3p'nin ise OSB'de gözlenen anormal ubiquitin bağlı protein yıkımına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür (3).

Vachev et al. (78) OSB'li çocukların periferik kanlarında miRNA let-7b-3p ve let-7d-3p'nin ekspresyonlarının azaldığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar, tam kan gibi vücut sıvılarında var olan miRNA'ların kullanışlı bir klinik biyobelirteç olabileceği görüşünü desteklemişlerdir (78).

Yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar, OSB ile nörolojik olarak ilgili miRNA'ların serum ekspresyon profillerini incelemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre serum miRNA'ların bir dizisinin OSB için olası girişimşel olmayan bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceği desteklenmiştir (14). OSB'li hastaların lenfoblastoid hücre kültürlerinde miRNA'ların ekspresyonları belirlenmiştir (79).

Nguyen et al. (80) 8 OSB vakası ve 6 kontrolde burun mukozal kök hücresinde bulunan toplam 667 miRNA'nın ekspresyonunu çalışmışlardır. Bu çalışmayla OSB'de fonksiyonu bozulan miRNA'ların olduğu gösterilmiştir (80). Shen et al. (81) tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise 11 miRNA otizm için biyobelirteç olarak gösterilmiştir ve bu miRNA'ların 8 tanesinin (%72.2) önceki çalışmalara göre OSB örneklerinde önemli ölçüde anormal bir şekilde değiştiği belirtilmiştir (81). Hicks et al. (33) ise 24 OSB'li ve 21 kontrolden tükürük örnekleri toplayarak, tükürükte bulunan toplam 246 miRNA'yı tespit etmişlerdir. Kontrollerle karşılaştırılan OSB gruplarında 14 miRNA'nın farklı bir şekilde eksprese olduğu belirtilmiştir. Bu 14 miRNA (miR-7-5p, miR-140-3p, miR-335-3p, miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-30e-5p, miR-32-5p, miR-2467-5p, miR-628-5p, miR-218-5p, miR-191-5p, miR-127-3p, miR-28-5p, miR-3529-3p) OSB'nin biyobelirteçleri olarak gösterilmiştir (33). Wu et al. (84) OSB hastalarının post-mortem beyinlerinde miRNA ekspresyon profillerini araştırmış ve çalışmalarının sonucunda OSB patofizyolojisinde miRNA'ların fonksiyonunu doğrulamışlardır. Farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen başka çalışmalarda ise miRNA'lardaki CNV ve SNP'lerin OSB ile korele oldukları rapor edilmiştir (31,81).

Yapılan bir çalışmada OSB hastalarının serumunda sirküle olan miRNAların farklılaşmış ekspresyon gösterip göstermediğini tespit etmek amaçlanmıştır. OSB'li hastalar ve sağlıklı kontrollerin serumunda 42 miRNA'nın ekspresyon seviyesi analiz

edilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrollerle karşılaştırıldığında OSB’li hastalarda 11 miRNA’nın daha fazla eksprese edildiği rapor edilmiştir ve 29 miRNA’nın ekspresyonu kısmen daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar serumda değişken bir şekilde eksprese olan miRNA’ların OSB’nin moleküler yolağında bulunabileceğini göstermiştir (12).

Tablo 2.3. OSB’de miRNA Çalışmaları.

Hastalık	Çalışılan Vaka Sayısı	Çalışılan Biyolojik Örnek	Çalışma Yöntemi ve Totalde Çalışılan miRNA Sayısı	Anlamlı Bulunan miRNA’lar	Referans
OSB	13 OSB 13 Kontrol	Post-mortem Serebellar Korteks	qRT-PCR 377 miRNA	miR-106b(↑) miR-140(↑) miR-146b(↑) miR-15a(↓) miR-15b(↓) miR-23a(↓) miR-27a(↓) miR-93(↓)	Abu-Elneel et al, 2008 (76)
OSB	6 OSB 6 Kontrol	Lenfoblastoid Hücre Hattı	Mikroarray qRT-PCR 150 miRNA	miR-132(↑) miR-146a(↑) miR-146b(↑) miR-92(↓) miR-320(↓)	Talebizadeh et al, 2008 (82)
OSB	14 OSB 14 Sağlıklı Kardeş (3’ü MZ)	Lenfoblastoid Hücre Hattı	Mikroarray qRT-PCR 1237 miRNA	miR-106b(↑) miR-132(↑) miR-199b(↑) miR-219(↑) miR-23a(↓) miR-30e(↓) miR-93(↓) miR-103(↓)	Sarachana et al, 2010 (79)
OSB	30 OSB 25 Kontrol	Tam Kan	Mikroarray 1898 miRNA	miR-486-3p (↑,↓)	Popov et al, 2012 (83)
OSB	30 OSB 25 Kontrol	Periferal Kan	Mikroarray 1898 miRNA	miR-let-7b-3p (↓) miR-let-7d-3p (↓)	Vachev et al, 2013 (78)
OSB	28 OSB 28 Kontrol	Post-mortem Serebellar Korteks	RNA-seq qRT-PCR 699 miRNA	miR-10a-5p(↑) miR-21-3p(↑) miR-23a-3p(↑) miR-155-5p(↑) miR-335-3p(↑)	Wu et al, 2016 (84)
OSB	55 OSB 55 Kontrol	Serum	PCR Array qRT-PCR 125 miRNA	miR-19b-3p (↑) miR-195-5p(↑) miR-130a-3p(↑) miR-101-3p(↑) miR-106b-5p(↑) miR-151a-3p(↓) miR-181b-5p(↓)	Vasu MM et

				miR-328(↓) miR320a(↓) miR-433(↓) miR-489(↓) miR-572(↓) miR-663a (↓)	al, 2014 (14)
OSB	10 OSB 8 Kontrol	Post-mortem Beyin	Mikroarray 1733 miRNA	miR-1(↑) miR-4753-5p(↑) miR-664-3p(↑) miR-4709-3p(↑) miR-297(↓) miR-4742-3p(↓)	Ander BP et al, 2015 (64)
	20 OSB 22 Sağlıklı Kardeş	Lenfoblastoid Hücre Hattı	Mikroarray qRT-PCR 708 miRNA	miR-10a(↑) mir-199b-5p(↑) miR-338-3p(↑)	Seno et al, 2011 (85)
OSB	12 OSB 12 Kontrol	Post-mortem Beyin	Yeni nesil sekanslama qRT-PCR 23 miRNA	miR-142-5p(↑) miR-142-3p(↑) miR-451a(↑) miR-144-3p(↑) miR-21-5p(↑)	Mor et al, 2015 (86)
OSB	5 OSB + 5 Kontrol (Mikroarray) 15 OSB + 15 Kontrol (qRT- PCR)	Periferal Kan	Mikroarray qRT-PCR 2578 miRNA	miR-494(↑) miR-451a (↓) miR-195-5p(↓) miR-15a-5p(↓) miR-15b-5p(↓) miR-92a-3p(↓) miR-103(↓)	Huang et al, 2015 (3)
OSB	24 OSB 21 Kontrol	Tükürük	RNA-seq 246 miRNA	miR-7-5p(↑) miR-140-3p(↑) miR-335-3p(↑) miR-23a-3p(↓) miR-27a-3p(↓) miR-30e-5p(↓)	Hicks et al, 2016 (33)
OSB	8 OSB 6 Kontrol	Burun Mukozal Kök Hücre + Deri Fibroblastı	Mikroarray qRT-PCR 667 miRNA	miR-146a(↑)	Nguyen LS et al, 2016 (80)
OSB	10 OSB 8 Kontrol	Beyin	Mikroarray 58 miRNA	miR-338(↓) miR-219(↓) miR-125(↑) miR-448(↓)	Schumann et al, 2017 (75)

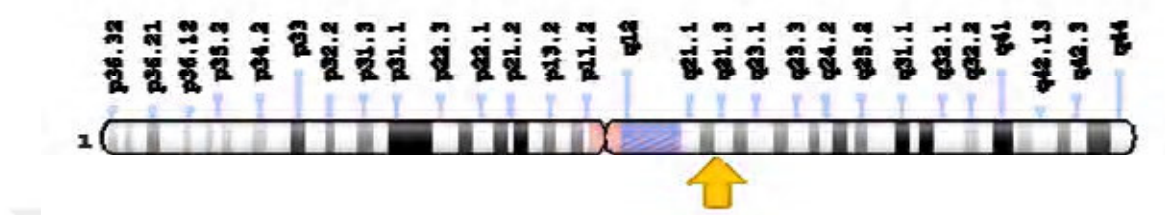
(↑): Artma

(↓): Azalma

2.9. Araştırdığımız Genler Hakkında Genel Bilgi

2.9.1. *POGZ* (Pogo Transposable Element Derived with ZNF Domain)

POGZ, OSB'yi etkileyen çinko parmak domain ile pogo transposable element-kökenli protein kodlayan genidir (28). Şekil 2.3.'te *POGZ* geninin 1. kromozomdaki yerleşimi gösterilmektedir.



Şekil 2.3. *POGZ* Geninin Kromozom Lokalizasyonu (88)

POGZ insan fetal beyinde oldukça fazla eksprese edilir (88). *POGZ* eksikliği, mitozu, beyin gelişimi ve fonksiyon bozukluklarını etkileyebilir (89). Kromatin düzenlenmesi, hücrel fonksiyon ve gen ekspresyonunda *POGZ*'nin temel bir rol oynadığı bilinmektedir. Kromatin-ilişkili mekanizmalardaki bozukluklar patolojik etkilere sebep olabilir (46). *CHD8* geninin allelik varyantları OSB ile ilişkilendirilmiştir. *POGZ*'nin, kromatin değiştiren bir *CHD8* ile kombinasyonunda insan gelişimi esnasında gen ekspresyonu ve kromatin yapısını düzenlediği bilinmektedir. Bu durumda sporadik OSB'de fonksiyon kaybı mutasyonlarının fazla olduğu görülmektedir. Bu bulgular, hem *POGZ* hem de *CHD8*'in güçlü bir şekilde OSB riski ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. *POGZ* mutasyonlu hastalar daha düşük IQ skoru göstermektedir. Yapılan çalışmalarla araştırmacılar, *POGZ* genindeki *de novo* mutasyonların OSB ve ID ile ilişkili olabileceğini düşünmektedirler (55,90). Kesintiye uğramış *de novo* mutasyonların biyolojik önemini anlamak için, *POGZ* ve *CHD8*'in transkripsiyonel hedeflerini tanımlamak önemlidir (46). Matsumura et al. (46) OSB ile ilişkili *POGZ de novo* mutasyonların, *POGZ*'nin DNA bağlama aktivitesini zayıflattığını rapor etmişlerdir. Bu sonuç, OSB ve kromatin yeniden modelleme arasındaki bu moleküler bağı anlamaya büyük ölçüde katkı sağlayabilir. Yizhou et al. (89) tarafından yapılan bir başka çalışmada, mikrosefalisi olan ve gelişimsel bozukluğa sahip benzer fenotipte 7 hastada tüm ekzom sekanslama ile *POGZ*'de *de novo* fonksiyon kaybı mutasyonları bulunmuştur. Fukai et al. (88) trio (anne-baba-çocuk üçlüsünü içeren) temelli tüm ekzom sekanslama ile *POGZ* geninde yeni bir mutasyon tanımlamışlardır. Bu

çalışmayla ilk kez sentromerde protein B benzeri DNA bağlama domaininde *de novo* yanlış anlamlı mutasyon rapor edilmiştir. Çalışmanın sonucunda *POGZ* geninde fonksiyon kaybı ya da patojenik yanlış anlamlı mutasyonların OSB'ye sebep olabileceği belirtilmiştir (88).

Stessman et al. (90) nörogelişimsel bozukluklu (primer olarak ID'li) 5,223 bireyin tüm ekzom, tüm genom ya da hedeflenen sekanslaması bilgilerini ve OSB/ID'li 12,041 bireyde bu lokusun hedeflenen sekanslaması ile *POGZ*'de kesintiye uğramış mutasyonlu 25 bireyin moleküler ve klinik bulgularını toplamışlardır. Bu bulgular ile *POGZ* genindeki bozulmanın OSB ve ID ile ilişkilendirildiğini desteklemişlerdir (90).

Son çalışmalar ID, şizofreni ve OSB'yi de içine alan çeşitli beyin bozukluklarının riskine *de novo* tek nükleotid varyasyonlarının büyük ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir. Hashimoto et al. (91) OSB'nin 30 sporadik vakasında trio temelli tüm ekzom sekanslamasını gerçekleştirmişler ve *de novo* tek nükleotid varyasyonlu 37 gen tanımlamışlardır. Bu tanımlanan genler içerisinde bulunan *POGZ* OSB'de *de novo* tek nükleotid varyasyonlu gen olarak rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar *POGZ* geninin merkezi sinir sisteminde nöronlarda sinir uzantısı gelişiminin aday düzenleyicileri olabileceğini savunmuşlardır (91).

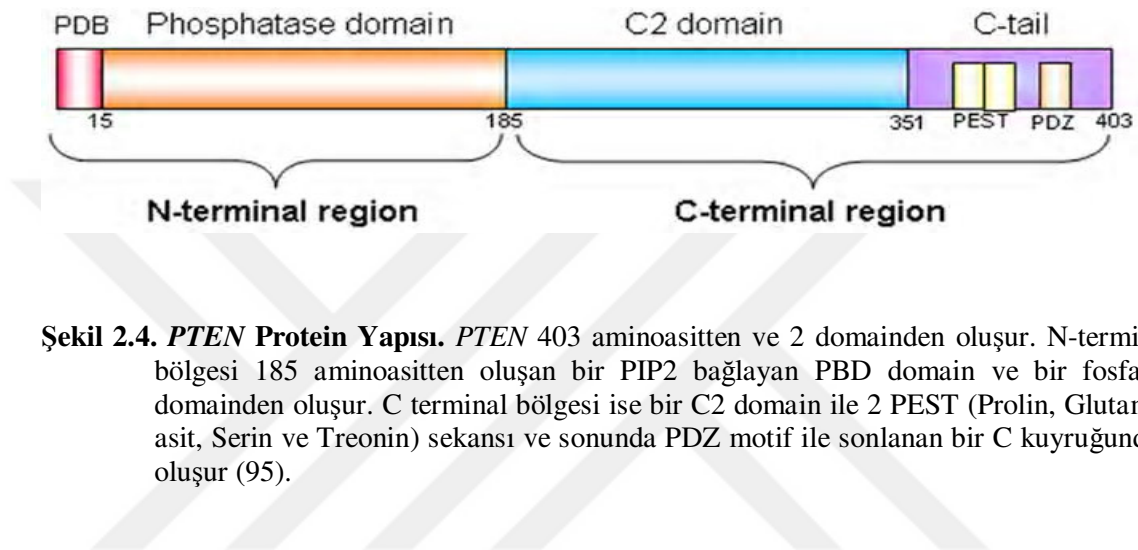
Son zamanlarda *POGZ*'nin, *Drosophila melanogaster*'de normal öğrenme için önemli olduğu bulunmuştur (46). Bilişsel geriliğin eşlik ettiği otizm vakalarıyla ilişkili *de novo* mutasyonların önemi ise bilinmezliğini sürdürmektedir. Tan et al. (28) tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada bilişsel geriliğe sahip otizmlili hastaların *POGZ* geninin kodlanan bölgesinde *de novo* meydana gelen yeni bir çerçeve kayması mutasyonu (c.1277_1278insC) tanımlamışlardır (28). Ancak bu bilinmezliğin anlaşılması için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (46).

Sonuç olarak, otizmlili hastalarda *POGZ* geninin ekspresyonu ile *POGZ*'yi hedefleyen miRNA'ların ilişkisi tam olarak belirlenmemiştir. *POGZ* genindeki bozukluk ve geni hedefleyen miRNA'lara bağlı olarak gendeki ekspresyon değişiklikleri, otizmlili çocuklarda gözlenen fenotipik çeşitliliğe sebep olabilir.

2.9.2. *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog)

PTEN (Fosfataz ve tensin homolog), 10. kromozom üzerinde ve 10q23 kromozom bandında lokalize olan tümör baskılayıcı bir gendir (92). *PTEN*, ilk kez 1997 yılında

keşfedilmiştir. Keşfedildiğinden beri hücrel yolaktaki bazı işlevleri bilinmezliğini sürdürmekte olup araştırılmaya devam edilmektedir. *PTEN* geni 9 ekzonu içeren 403 aminoasite sahip 47 kD ağırlığında bir proteini kodlar (93). Şekil 2.4'te *PTEN*'in protein yapısı gösterilmiştir. *PTEN* geninin vücut ve üreme hücrelerindeki mutasyonları çeşitli hastalıklarda gösterilmiştir (94).



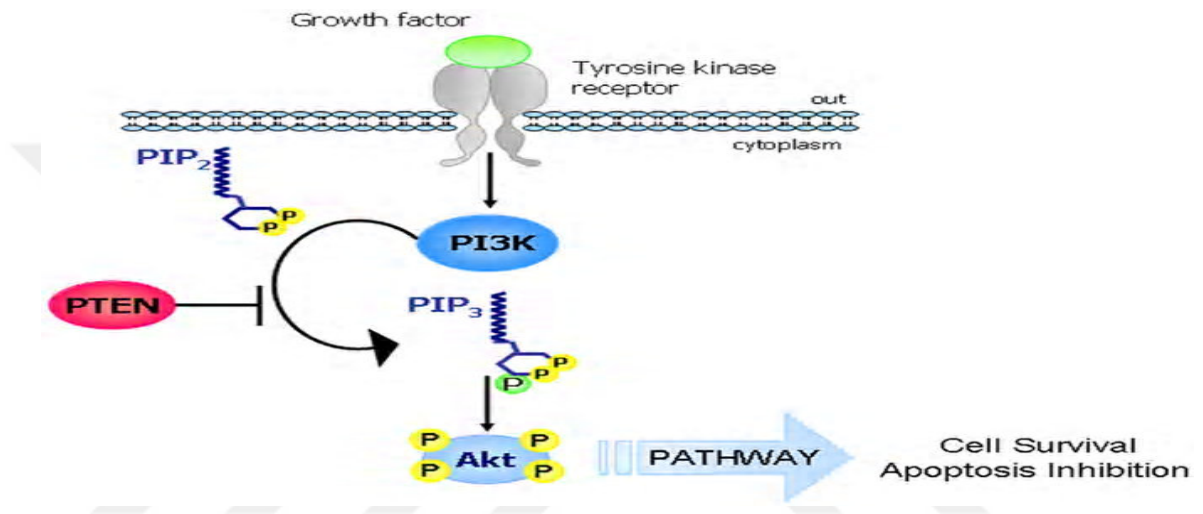
Şekil 2.4. *PTEN* Protein Yapısı. *PTEN* 403 aminoasitten ve 2 domainden oluşur. N-terminal bölgesi 185 aminoasitten oluşan bir PIP2 bağlayan PBD domain ve bir fosfataz domainden oluşur. C terminal bölgesi ise bir C2 domain ile 2 PEST (Prolin, Glutamik asit, Serin ve Treonin) sekansı ve sonunda PDZ motif ile sonlanan bir C kuyruğundan oluşur (95).

Otizmde *PTEN* geninin çeşitli rolleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (93,95,97). Butler et al. (96) tarafından OSB ve makrosefali tanısı almış 18 hastada (yaşları 3-18 arasında değişen 13 erkek ve 5 kız) *PTEN* gen mutasyonu araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda 3 erkek hastanın germline *PTEN* mutasyonu taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir (96).

Pediyatrik hastaların OSB'ye sahip olan klinik bir grubunda %8.3 *PTEN* mutasyonları yaygınlık oranı vardır. Buna ek olarak, gelişimsel bozukluklu ya da mental retardasyonlu hastalar %12.2 ile daha yüksek bir *PTEN* mutasyon yaygınlık oranına sahiptirler (92).

Otizmde kritik bir role sahip olabilen bir aday sinyal yolağı PI3K/Akt/mTOR yolağıdır (92). Bu PI3K/Akt sinyal yolağı aktivitesi hücre büyümesi, hayatta kalma ve proliferasyon için gereklidir (97). Bu nedenle PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağındaki anormallikler beyin tümörleri, otizm ve şizofreni gibi nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara neden olmaktadır (97). mTOR sinyal yolağındaki değişikliklerin OSB'li bireylerin %14'ünde bulunduğu tespit edilmiştir (92). *PTEN* fonksiyonları, PI3K/Akt sinyalini düzenleyerek (94) ve TSC-mTOR'u kontrol ederek otofajinin indüklenmesini

düzenlemektedir. Şekil 2.5'te *PTEN*'in temel fonksiyonu hakkında bilgi verilmektedir. Son dönemde rapor edilen otistik farelerde mTOR'un aktivitesinin yok edildiği bir çalışma, otizmde otofajinin fonksiyonunun bozulabileceğini desteklemektedir (61). *TSC1*'de ya da *TSC2*'deki gen mutasyonu insan Tübero Skleroz Komplekse (TSC)'ye sebep olur ve bu hastaların %25-60'ı OSB ile ilişkili fenotipler gösterebilir. TSC ve OSB fenotipli çocukların kognitif fonksiyonu, otizm olmayanlara göre daha şiddetli azalma göstermektedir (97).



Şekil 2.5. *PTEN*'in Temel Fonksiyonu. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının düzenlenmesidir. Hücre dışı uyarıya cevapta (örneğin insülin, büyüme faktörleri, kemokinlerin varlığı), PI3K tirozin kinaz reseptörler ya da G-protein reseptörleri tarafından aktive edilir ve PIP3 oluşturmak için PIP2 fosforillenir. Bu fosforillenme ile Akt aktifleşir. Bu olay geri dönüşümlüdür. *PTEN* PIP3'ü defosforile ederek PIP2'yi tekrar oluşturabilen bir lipid fosfatazdır. Böylelikle PI3K sinyal yolağı bloke edilir (95).

PTEN geninin delesyonu embriyonik dönemde ölümle sonuçlanmaktadır. Fareler üzerinde *Pten* geninin knock-out edildiği bir çalışma, farelerde otistik benzeri davranışlarda (sosyal davranış, tekrarlayan davranış ve anksiyete, hafıza ve öğrenme eksiklikleri) uzun dönem değişikliklerle sonuçlandığı rapor edilmiştir (92). Ayrıca, *PTEN* genindeki delesyonun sinaptik proteinlerde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda *PTEN* yokluğunun dendrit boyutunu büyük ölçüde artırdığı ve hipokampusta genişlemeye sebep olduğu gösterilmiştir (92).

Farelerde embriyonik nöral kök hücrelerdeki *Pten* geni yok edildiği zaman fare beyninin anormal bir şekilde büyüdüğü tespit edilmiştir. Yapılan diğer analizler sonucunda bu durumun hücre proliferasyonunu artırdığı ve programlanmış hücre

ölümünü azalttığı gösterilmiştir (97). Bağımsız çalışmalar ise beynin lateral ventriküllerin subventriküler zonlarında bulunan olgun nöronal kök hücrelerin *PTEN* tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir (97). Kwon et al. (97) fare hipokampus ve korteksinde ve özellikle post mitotik nöronların bir dizisinde *Pten* ekspresyonunu baskılamıştır. Bu farelerde makrosefali gelişmiştir ve sosyal davranış eksiklikleri, nöbetler, artmış anksiyete ve öğrenme eksikliklerini içeren, insan otizmine benzer olan davranışsal fenotipler olduğu gösterilmiştir (97). Ayrıca protein fosfataz aktivitesine dayanan *Pten* geninin aşırı ekspresyonunun spin yoğunluğunda azalmayla sonuçlandığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalar nöronlarda *PTEN* fonksiyonunun nöronal morfolojiyi ve sinyal iletimini etkilediğini göstermektedir (97).

Normal hücreler genellikle güçlü nükleer *PTEN* ekspresyonu göstermektedir. *PTEN* değişiklikleri, fosfataz aktivitesini değiştirebilen olası post-transkripsiyonel modifikasyonların bir çeşidini içerir (93). *PTEN* mutasyonları ve diğer genetik değişiklikler *PTEN* fonksiyonlarını olumsuz olarak etkilemektedir (93). *PTEN* germline mutasyonları makrosefalinin eşlik ettiği OSB tanısı alan çocukların küçük bir dizisinde (en az %1'i) bulunmuştur (43). OSB'li hastalarda çoğu germline *PTEN* mutasyonları tanımlanmıştır ve bunlar anlamsız mutasyonlar, yanlış anlamlı mutasyonlar ve tek baz insersiyonunu içeren nokta mutasyonlarıdır (98,99). *PTEN* dozajının anahtar düzenleyicileri arasında miRNA'lar ve psödogenler bulunmaktadır ve bunlarda post-transkripsiyonel seviyede *PTEN* ekspresyonunu düzenlemektedir. Transkripsiyonel baskılama ve epigenetik sessizleştirme, post-transkripsiyonel gen düzenlenmesi, post translasyonel modifikasyon ve anormal *PTEN* lokalizasyonu azalmış *PTEN* aktivitesine katkıda bulunabilir. *PTEN* dozajında küçük değişiklikler, insanlarda önemli fenotipik sonuçlara yol açabilir. Fare genetik modellerinde bu durum gösterilmiştir. Bu genin düzenleyici yollarını etkileyen genetik ya da kromozomal değişiklikler, *PTEN* seviyelerinin modüle edilmesiyle klinik sonuçları etkileyebilir (61).

miR-19a ve miR-19b'nin her ikisi de 3'UTR (3'kodlanmayan bölge)'de aynı bağlanma bölgesi aracılığıyla *PTEN*'i hedefler. miR-19'un, hem *PTEN*'i hem de PP2A'yı (Protein Fosfataz 2) baskıladığı bilinmektedir. Bu durum benzer sekans motiflerinin post transkripsiyonel düzenlemesini koordine etmek için fonksiyonel olarak ilişkili genlerin 3'UTR'sinde miR-19a ve miR-19b'nin var olabileceğini desteklemektedir (61). Tüm bu

nedenlerle *PTEN* genindeki mutasyonların OSB kliniğinde gözlenen fenotiplerin bir spektrumuna sebep olabileceği düşünülmektedir (43,98).



3.GEREÇ veYÖNTEM

3.1.Tezde Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Cihazlar Listesi

Aletler	Markası
-20 Buzdolabı	Siemens
-80 derin dondurucu	Binder
+4 Buzdolabı	Siemens
Kantitatif Real-Time PCR cihazı	LightCycler 480 II (Roche, Almanya)
Nano drop	BioSpec-Nano (Shimadzu)
Vorteks	Heidolph
PCR cihazı	LabCycler SensoQuest, Qiagen
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
FMikropipet	Gilson
Perfect spin	PeQlab

3.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal, sarf malzeme ve kitlerin listesi Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler Listesi

Kimyasal Maddeler ve Sarflar Malzemeler	Markası
Trizol	Roche
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
İzopropanol	Merck
Nükleaz Free Water	Qiagen
cDNA Sentez Kiti	Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)
Probe Master Mix Kiti	LightCycler 480 Probes Master Kiti (Roche Diagnostics, Almanya)
Steril eldiven	Beybi
10 µL’lik filtreli pipet ucu	Axygen
100 µL’lik filtreli pipet ucu	Axygen
1000 µL’lik filtreli pipet ucu	Axygen
Plate	LightCycler 480 Sealing Foil, Roche
1,5 ml mikrosantrifüj ependorf tüp	Greiner
0.2 ml PCR tüp	Axygen

Bu tez çalışması; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (2016/491) onaylanmıştır. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-5789 kodlu proje ile desteklenmiştir.

3.3.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Psikiyatri Anabilim Dalı Polikliniği’ ne başvuran DSM-IV ve DSM-V tanı kriterlerine göre otizm tanısı almış veya yeni tanı konulan, ayrıca Childhood Autism Rating Scale (CARS) ölçeğine göre şiddet değerlendirmesi yapılmış olan 2-10 yaş arası 50 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerinin etkilenmemesi için bu çalışmada hastaların otizm ile ilgili herhangi bir ilaç kullanmamış olması ve yeni tanı almış olmasına dikkat

edilmiştir. Ayrıca belirlenen hastalarda otizm eşlik eden herhangi bir sendromik bozukluğun olmaması da göz önüne alınan başka bir husustur. Hastaların çalışmaya dahil edilme ve edilmeme nedenleri Tablo 3.3'te özetlenmiştir. Bu 50 hastanın gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması için 50 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilerek kontrol grubu oluşturulmuştur.

Tablo 3.3. Otizmli Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme ya da Edilmeme Nedenleri

Dahil Edilme Nedenleri	Dahil Edilmeme Nedenleri
1. Otizm tanısının olması	1. Otizm tanısı almamış olanlar
2. İlaç Kullanıyor Olmaması	2. İlaç kullananlar
3. Hastaların 2-10 yaş arası olması	3. Onam vermeyi kabul etmeyenler
4. Sendromik herhangi bir bozukluğu olmayanlar	4. Sendromik herhangi bir bozukluğa sahip olanlar

Çocuk Psikiyatri Polikliniği'nde otizm tanısı almış hasta ve/veya hasta yakınlarından gerekli onay alındıktan sonra hastalar ve sağlıklı kontrollerin kan örnekleri EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid) içeren 2 mililitre (ml)'lik vakumlu steril tüpler içerisine alınmıştır ve deneysel çalışmalar başlatılmıştır.

Otizmli hastalar ve bu hastalarla yaş ve cinsiyet açısından uyumlu sağlıklı bireylerden toplanan kan örnekleri GENKÖK Genom birimine gönderilmiştir. Genetik çalışmaların tamamı bu birimde gerçekleştirilmiştir. Toplanan bu kanların total RNA izolasyonu ve elde edilen bu RNA'lardan da komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Bu cDNA'lardan Real-Time PCR cihazı kullanılarak *POGZ* ve *PTEN* genlerinin ekspresyonları araştırılmıştır.

3.3.1. Kandan Total RNA İzolasyonu

1. Hastalar, sağlıklı kardeşleri ve sağlıklı kontrollerden alınan 2 ml periferik kan örneklerinden TRIzol ile (Roche, Almanya) RNA izolasyonu yapıldı.

2. 500 µl kana 500 µl trizol eklenerek vortekslendi ve buz üzerine alındı.

3. 200 µl kloroform eklenip vortekslenildi ve tekrar buza alındı.

4. 12000 rpm'de 30dk santrifüj edildi. Aköz faz yeni tüpe alındı. 1:1 oranında izopropanol eklenip alt-üst edildi ve bir gece -20 °C'de bekletildi.

5. 14000 rpm 30dk +4°C'de santrifüj edildi.

6. Tüpe 1 ml %70'lik etanol doldurulup yıkama başlatıldı. 14000 rpm 5 dk santrifüj edildi.

7. Supernatant atıldı. 500 µl distile su eklenip vortekslenildi ve 25 µl 5M NaCl eklendi. Daha sonra tüplere 1ml absolute etanol eklendi ve tüpler alt-üst edildi. -20°C'de bir gece bekletildi.

8. 14000 rpm 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp tüplerin ağzı ters çevrilerek kurutuldu.

9. 1 ml %70'lik etanol tüplere dolduruldu. 14000 rpm 5dk santrifüj edildi.

10. Süpernatant atıldı ve etanol uzaklaşsın diye beklendi.

11. 50 µl nükleaz free water ile resüspanse edildi.

12. En son aşamada 1/10 seyreltip nanodropta ölçüm yapıldı. RNA'nın kalitesi ve miktarı BioSpec-Nano (Shimadzu) ile belirlendi.

3.3.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche, Almanya) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Random Hekzamer Primer	1 µL
Anchored-oligo (dT) 18 Primer	1 µL
Distile Su	4,4 µL
RNA	5 µL

cDNA sentezi için yukarıdaki tabloda verilen oranlara göre soğuk blok üzerinde karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan her bir tüpe 6,4 µl dağıtıldı ve üzerine 5 µl RNA ilave edildi. Bu reaksiyon 65°C’de 10 dk inkübe edildikten sonra Tablo 3.5’te verilen oranlarda elde edilen karışımdan her bir tüpe dağıtıldı.

Tablo 3.5. cDNA Sentezi için Reaksiyona Eklenen Karışım

Transcriptor High Fidelity Reaksiyon Tamponu, 5x	4 µL
Protector RNaz İnhibitör 40 U/ µL	0,5 µL
Deoksiribonükleotid Karışım	2 µL
DDT	1 µL
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz Enzimi	1,1 µl
Toplam Karışım	8,6 µl

Her bir tüpe 8,6 µl karışım dağıtıldı. Hazırlanan bu karışım PCR cihazında (LabCycler SensoQuest, Qiagen) 29°C’de 10 dakika, 48°C’de 60 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edilerek cDNA’lar elde edildi. Bütün örneklerden elde edilen cDNA’lar ekspresyon çalışması için 1/40 oranında seyreltilti.

3.3.3. Kantitatif Real-Time PCR ile *POGZ* ve *PTEN* Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması

POGZ ve *PTEN* genlerinin ekspresyon düzeyleri, housekeeping gen olarak β-aktin kullanılarak incelendi. Hibrid prob kullanılarak Kantitatif Real-Time PCR ile yukarıda belirtilen genlerin ekspresyonları rölatif kantitasyonla analiz edildi.

Bu amaçla LightCycler 480 Probes Master Kiti (Roche Diagnostics, Almanya) kullanıldı. Her bir hasta örneği iki kez çalışıldı. Her çalışmaya 2 adet negatif kontrol ve kalibratör konuldu. Her bir örnek için Tablo 3.6’da belirtilen oranlarda karışım hazırlandı.

Tablo 3.6. Ekspresyon Çalışması için Hazırlanan Karışım

LightCycler 480 Probes Master (Master Karışım)	10 µl
Prob (RealTime Ready Catalog Assays, Roche)	1 µL
PCR Grade Su	4 µL

Tablodaki miktarlar her çalışma grubundaki hasta sayısına göre hesaplanıp, her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde dağıtıldı. Seyreltilmiş cDNA'lar her kuyucuğa 5'er µL dağıtıldı. Kullanılan plate üzeri şeffaf bir bant ile kapatılarak, kısa süreli santrifüj edildikten sonra, LightCycler 480 II (Roche, Almanya) Kantitatif Real-Time PCR cihazına yüklendi. LightCycler 480 Software açılarak aşağıda verilen Tablo 3.7'deki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 3.7. LightCycler 480 II Software Programında Ayarlanan Sıcaklıklar ve Süreleri

	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Sıcaklık artış/azalış hızı (°C)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4,4	600
Amplifikasyon	45	95	4,4	10
		60	2,2	30
		72	4,4	1
Soğutma	1	40	2,2	30

3.4.Rölatif Kantitasyon

Rölatif kantitasyon yöntemi, hedef genin konsantrasyonunun başka bir referans gene oranlanarak hesaplanması işlemidir. Verilerin normalize edilmesi için kullanılacak referans gen tüm hücrelerde eksprese olan, hücre canlılığı için gerek duyulan, hücresel değişikliklerde ekspresyonu değişmeyen özellikte olmalıdır. Yukarıda bahsi geçen özellikleri taşıyan referans genlere 'housekeeping gen' denilmektedir. Sıklıkla kullanılan referans gen olarak *GAPDH* ve *ACTB* (β-aktin) örnek verilebilir.

Bu çalışmada *POGZ* ve *PTEN* hedef genleri ve β -aktin referans geni ile çalışıldı. Light Cycler 480 II Software programından Ct değerleri elde edildi. Verilerin analizi sırasında delta delta Ct metodu kullanıldı. Her iki gen ayrı ayrı analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasının istatistik sonuçları GraphPad Prism (Versiyon 6.01) programı kullanılarak hesaplandı ve sonuçların grafikleri yine bu programla hazırlandı. Gruplar arası karşılaştırmalar non-parametrik t testi ile değerlendirildi. Verilerin analizinde $p<0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

2-10 yaş arası 39 erkek ve 11 kızdan oluşan 50 otizmlili birey ile hasta grubu oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen hastaların özellikleri tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu çalışma için belirlenen hastaların 7’si akraba evliliği, 23’ü doğumsal anomali ve 19 hastada ID bulgusuna sahipti. Tablo 4.2’de çalışmaya dahil edilen OSB’li hastalar ve bu hastaların sahip oldukları klinik bulgular gösterilmiştir. Bu 50 hastanın gen ekspresyonları açısından karşılaştırılabilmesi için de seçilen hastalarla yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 50 sağlıklı birey kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında *POGZ* ve *PTEN* genlerinin otizmlili hastaların kanlarındaki ifade düzeyleri belirlenmiştir. Aynı zamanda *PTEN* ve *POGZ* genlerinin ifade düzeyleri ile tablo 4.2.’de belirtilen ve bazı hastalarda otizme eşlik eden ID bulgusunun ilişkili olup olmadığı da araştırılmıştır.

Tablo 4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta ve Kontrollerin Demografisi

Demografi	Otizm (n=50)	Kontrol (n=50)
Cinsiyet	39 Erkek ve 11 Kız	39 Erkek ve 11 Kız
Yaş Ortalaması	4,06	3,85
Yaş Aralığı	2-10	1-10

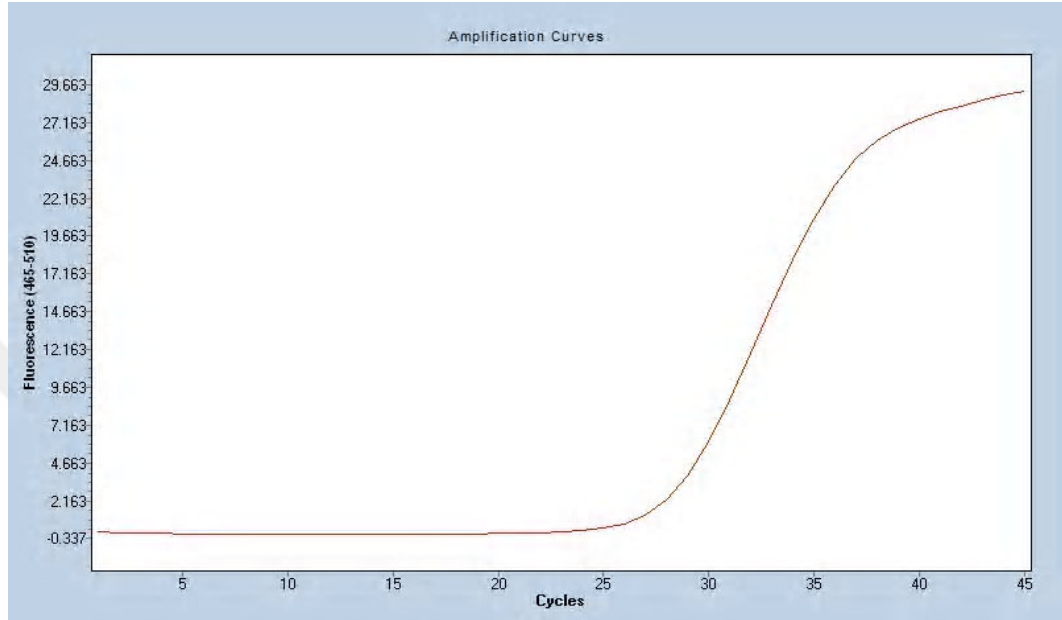
Tablo 4.2. Otizmli Hastalardaki Klinik Bulgular

No	Hastalık Grubu	Cinsiyet	Yaş (Yıl, Ay)	Akraba Evliliği	Doğumsal Anomali	Bilişsel Gerilik
1	OSB	E	2Y 3A	Yok	Yok	Yok
2	OSB	E	5Y6A	Yok	Var	Var
3	OSB	E	3Y	Yok	Var	Yok
4	OSB	K	3Y	Yok	Var	Var
5	OSB	E	6Y	Var	Var	Yok
6	OSB	E	6Y	Yok	Yok	Yok
7	OSB	E	5Y	Yok	Yok	Yok
8	OSB	E	4Y	Yok	Yok	Yok
9	OSB	E	6Y	Yok	Var	Var
10	OSB	K	3Y 5A	Var	Var	Var
11	OSB	E	3Y 5A	Var	Yok	Var
12	OSB	E	2,5Y	Yok	Var	Yok
13	OSB	E	3Y 4A	Yok	Yok	Var
14	OSB	E	3Y	Yok	Yok	Yok
15	OSB	K	3Y	Yok	Yok	Yok
16	OSB	E	9Y	Yok	Yok	Yok
17	OSB	K	9Y	Yok	Yok	Yok
18	OSB	K	3Y 10A	Yok	Yok	Yok
19	OSB	E	9Y	Var	Yok	Yok
20	OSB	E	3,5Y	Yok	Var	Var
21	OSB	E	3Y 7A	Yok	Var	Yok
22	OSB	E	2Y 4A	Yok	Var	Yok
23	OSB	E	2Y 2A	Yok	Var	Yok
24	OSB	E	4Y 3A	Yok	Yok	Var
25	OSB	E	5Y	Yok	Yok	Var
26	OSB	K	3Y	Yok	Yok	Yok
27	OSB	E	4Y	Yok	Var	Yok
28	OSB	E	3Y	Yok	Yok	Var
29	OSB	E	2Y 6A	Yok	Yok	Var
30	OSB	E	2Y	Yok	Yok	Var
31	OSB	K	3Y	Yok	Yok	Yok
32	OSB	E	4Y 2A	Var	Var	Yok
33	OSB	E	4Y 7 A	Yok	Var	Yok
34	OSB	E	3 Y	Yok	Var	Yok
35	OSB	E	4 Y 1A	Yok	Var	Yok
36	OSB	E	4Y 11 A	Yok	Var	Yok
37	OSB	K	3Y	Yok	Var	Yok
38	OSB	E	3Y	Yok	Yok	Yok
39	OSB	E	3Y	Yok	Yok	Yok
40	OSB	E	4Y 4A	Yok	Yok	Var
41	OSB	E	2Y 6A	Yok	Yok	Var
42	OSB	K	3Y 9A	Var	Yok	Var
43	OSB	E	4Y 4A	Yok	Var	Var
44	OSB	E	3Y 4A	Yok	Var	Var
45	OSB	E	3Y 2A	Yok	Var	Yok
46	OSB	E	4Y 1A	Yok	Var	Yok
47	OSB	E	2Y	Yok	Yok	Yok
48	OSB	K	3Y 10A	Yok	Yok	Var
49	OSB	K	9Y	Yok	Yok	Var
50	OSB	E	2Y 6A	Var	Var	Yok

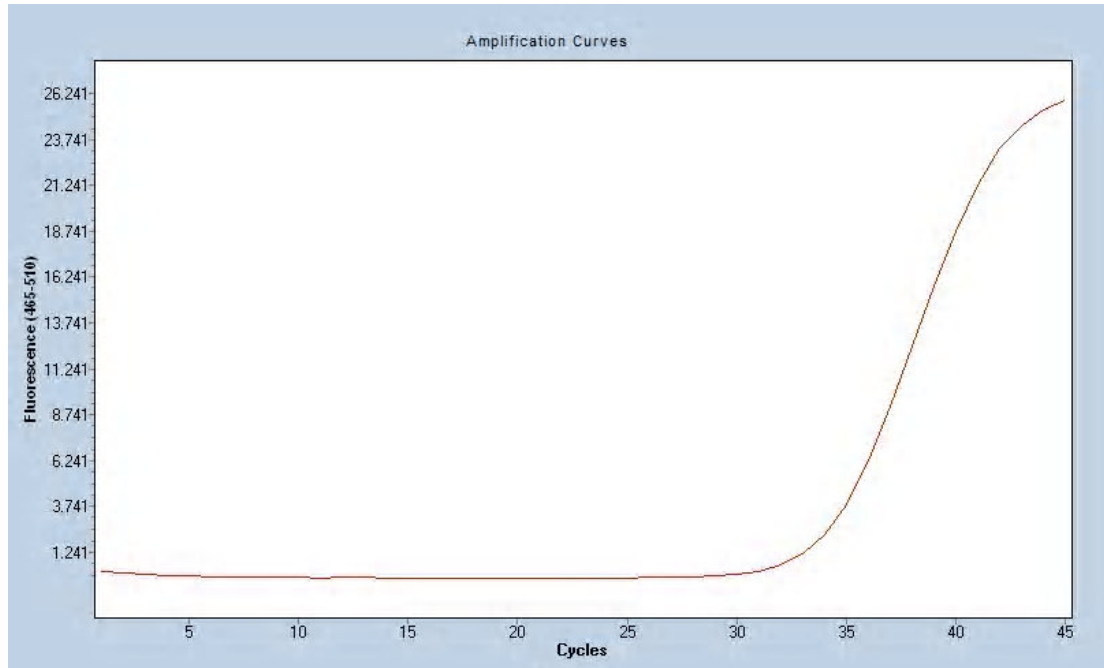
4.2. OSB Tanısı Konulan Hastalarda Real-Time PCR Analiz Sonuçları

4.2.1. *POGZ* Geni Ekspresyon Sonuçları

POGZ geninin RT-PCR cevap eğrileri şekil 4.1’de ve 4.2’de gösterilmektedir.



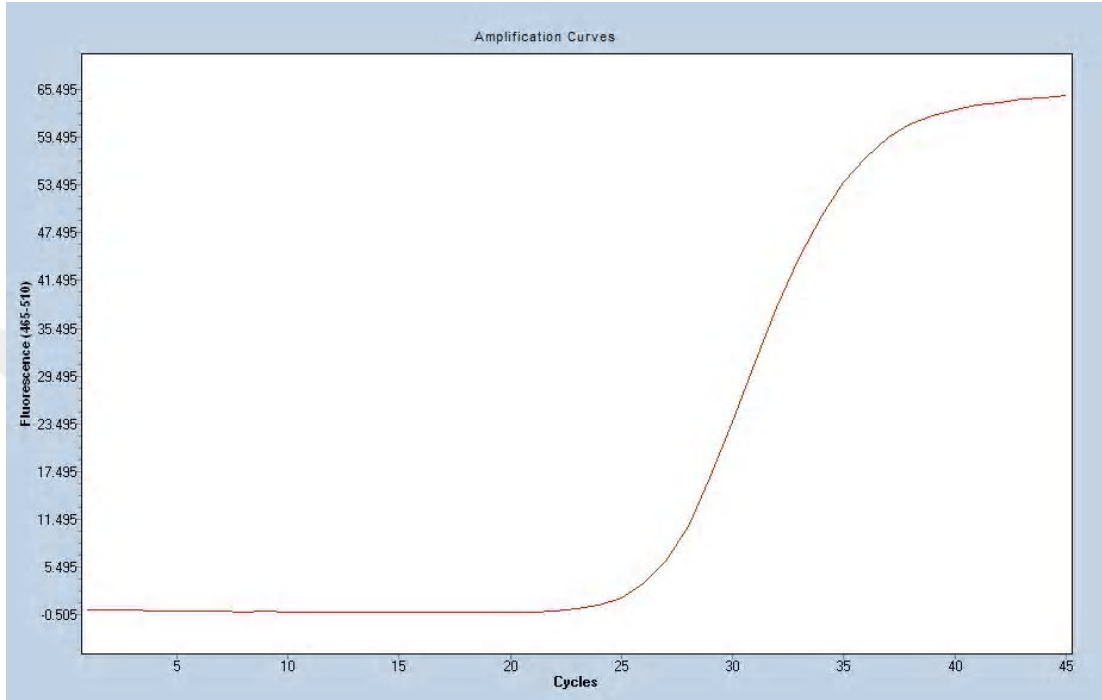
Şekil 4.1. *POGZ* Geninin Otizm Hasta Grubundaki Ekspresyon Düzeyi



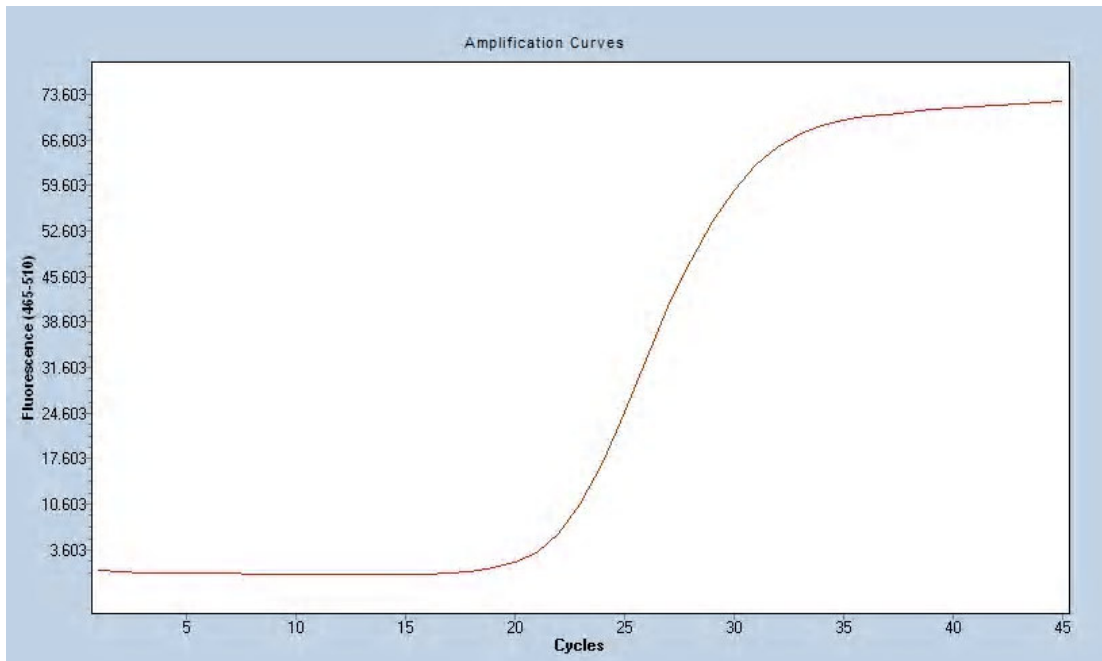
Şekil 4.2. *POGZ* Geninin Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeyi

4.2.2. *PTEN* Geni Ekspresyon Sonuçları

PTEN geninin RT-PCR cevap eğrileri şekil 4.3'te ve 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. *PTEN* Geninin Otizm Hasta Grubundaki Ekspresyon Düzeyi



Şekil 4.4. *PTEN* Geninin Kontrol Grubundaki Ekspresyon Düzeyi

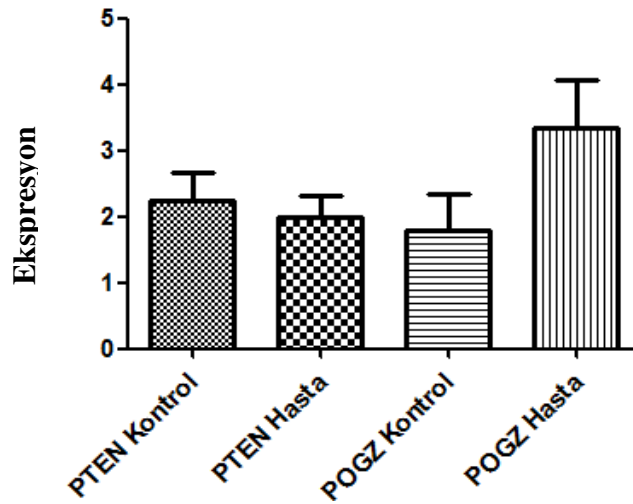
4.3. Otizmli Hastalar ve Kontrollerdeki *POGZ* ve *PTEN* Genlerinin Ekspresyon Sonuçları

Her iki genin ekspresyon sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.0980$, $p=0.6565$). Tablo 4.3 gruplar arası ekspresyon analiz sonuçlarını göstermektedir.

POGZ geni otizmli hastalarda kontrollere göre daha fazla eksprese olurken, *PTEN* geninin otizmli hastalarda kontrollere göre daha az eksprese edildiği tespit edilmiştir. Şekil 4.5'te 50 hasta ve 50 kontrolde *PTEN* ve *POGZ* genlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Gruplar Arası Ekspresyon Analizi Sonuçları

	<i>POGZ</i> Ekspresyonu	<i>PTEN</i> Ekspresyonu
Hasta	3.338 ± 0.7354	1.991 ± 0.32
Kontrol	1.791 ± 0.547	2.23 ± 0.43
p Değeri	0.0980	0.6565



Şekil 4.5. 50 Hasta ve 50 Kontrolde *PTEN* ve *POGZ* Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

POGZ geninin hasta erkeklerde kontrollere göre daha fazla eksprese olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.0002$). Tablo 4.4'te hasta erkekler ve kontrollerdeki *POGZ* gen ekspresyonu sonuçları verilmiştir. Ayrıca şekil 4.5'te de hasta erkekler ve kontrollerdeki *POGZ* ekspresyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

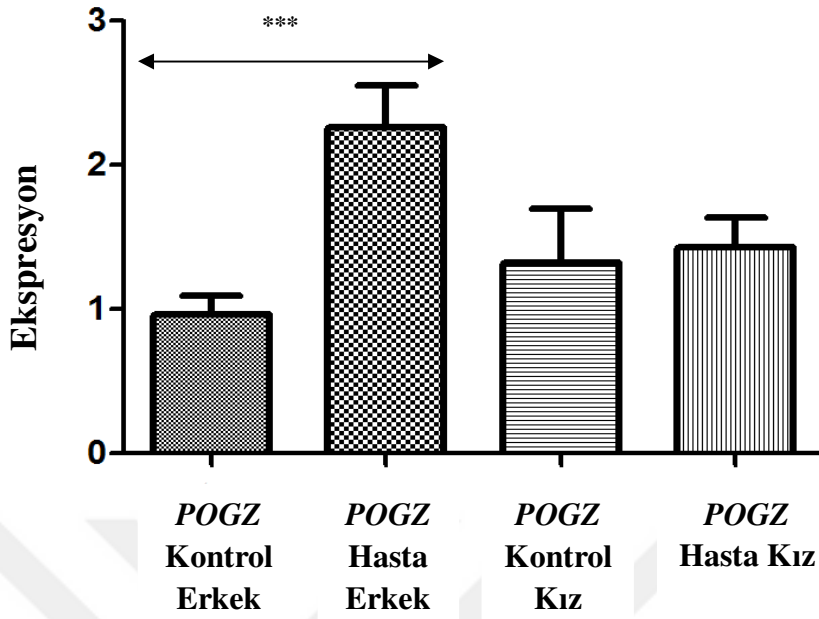
Tablo 4. 4. Hasta Erkekler ve Kontrollerdeki *POGZ* Gen Ekspresyon Sonuçları

Hasta erkek	2.262±0.3
Kontrol	0.9613±0.13
p Değeri	0.0002

POGZ geninin hasta kızlarda kontrollere göre daha fazla eksprese olduğu ve istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur ($p=0.8236$). Tablo 4.5'te hasta kızlar ve kontrollerdeki *POGZ* gen ekspresyonu sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca şekil 4.5'te de hasta kızlar ve kontrollerdeki *POGZ* ekspresyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4. 5. Hasta Kızlar ve Kontrollerdeki *POGZ* Gen Ekspresyon Sonuçları

Hasta kız	1.427±0.21
Kontrol	1.332±0.38
p Değeri	0.8236



Şekil 4.6. Hasta Erkek ve Hasta Kızlarda *POGZ* Ekspresyonlarının Kontrollerle Karşılaştırılması (Hasta erkek, $p=0.0002^{***}$)

PTEN geninin ekspresyonu hasta erkeklerde kontrollere göre daha az eksprese olduğu ve istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0.7513$). Tablo 4.6'da hasta erkekler ve kontrollerdeki *PTEN* gen ekspresyonu sonuçları verilmiştir. Ayrıca şekil 4.5'te de hasta erkekler ve kontrollerdeki *PTEN* ekspresyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

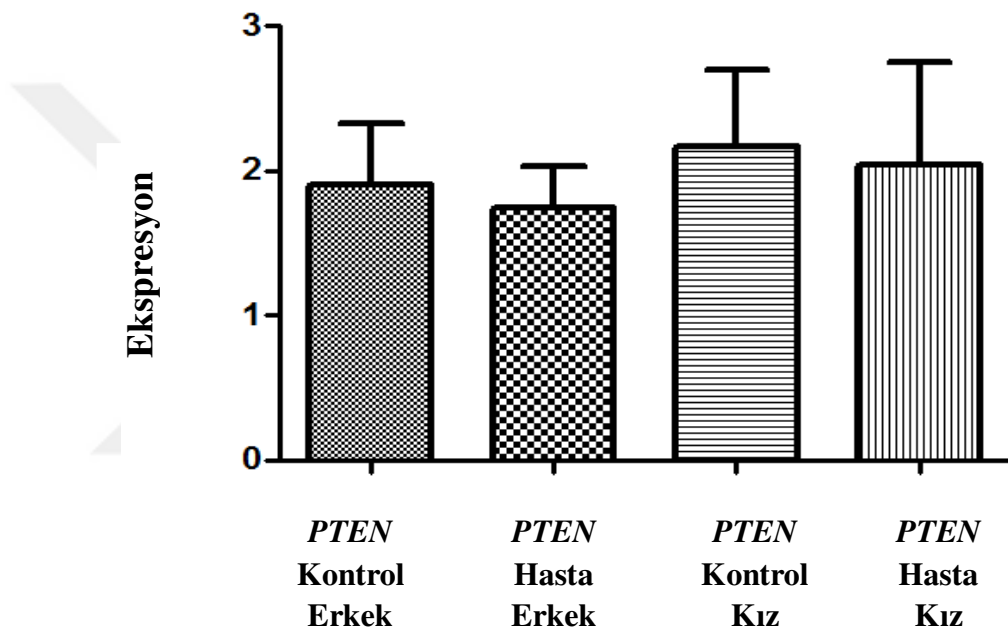
Tablo 4. 6. Hasta Erkekler ve Kontrollerdeki *PTEN* Gen Ekspresyon Sonuçları

Hasta erkek	1.744±0.2935
Kontrol	1.907±0.43
p Değeri	0.7513

PTEN geninin ekspresyonu hasta kızlarda kontrollere göre daha az eksprese olduğu ve istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. ($p=0.8862$). Tablo 4.7'de hasta kızlar ve kontrollerdeki *PTEN* gen ekspresyonu sonuçları verilmiştir. Ayrıca şekil 4.7'de hasta kızlar ve kontrollerdeki *PTEN* ekspresyonlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4. 7. Hasta Kızlar ve Kontrollerdeki *PTEN* Gen Ekspresyon Sonuçları

Hasta kız	2.041±0.70
Kontrol	2.17±0.54
p Değeri	0.8862

**Şekil 4.7.** Hasta Erkek ve Hasta Kızlarda *PTEN* Ekspresyonlarının Kontrollerle Karşılaştırılması

4.4. ID ve *POGZ* Ekspresyonu İlişkisi

Bu tez çalışmasında ID'ye sahip hastalar ve sahip olmayan hastalar, *POGZ* geninin ekspresyonlarının düzeyleri ile ID ilişkisi açısından karşılaştırıldı ve sonuçlar anlamsız olarak rapor edildi ($p=0.6$). Tablo 4.8'de *POGZ* gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin analiz sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca şekil 4.8'de *POGZ* ekspresyonları ve ID ilişkisinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4. 8. *POGZ* gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin Analizi

ID VAR	2.149±0.46
ID YOK	1.903±0.21
p Değeri	0.6

ID: Bilişsel Gerilik

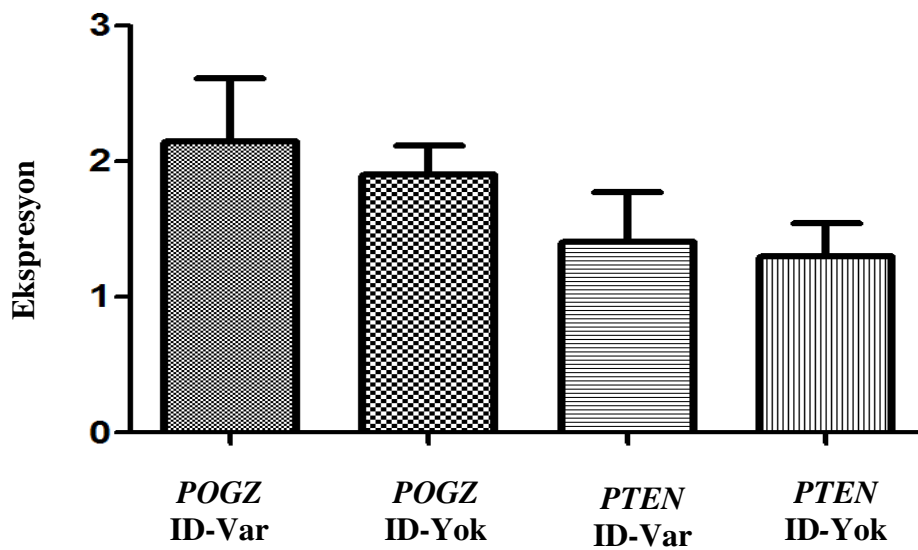
4.5. ID ve *PTEN* Ekspresyonu İlişkisi

Bu tez çalışmasında ID'ye sahip hastalar ve sahip olmayan hastalar, *PTEN* ekspresyonlarının düzeyleri ile ID ilişkileri açısından karşılaştırıldı ve sonuçlar anlamsız olarak rapor edildi. ($p=0.79$). Tablo 4.9'da *PTEN* gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin analiz sonuçları gösterilmiştir. Ayrıca şekil 4.8'de *PTEN* ekspresyonları ve ID ilişkisinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4. 9. *PTEN* gen ekspresyonları ve ID ilişkisinin Analizi

ID VAR	1.408±0.36
ID YOK	1.297±0.25
p Değeri	0.79

ID: Bilişsel Gerilik



Şekil 4.8. ID'ye sahip olan ve olmayan hastalarda *POGZ* ve *PTEN* Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Otizm Spektrum Bozukluğu bir psikiyatrik sendromdur (56). Otizm prevalansı son 10 yılda önemli ölçüde artmıştır. Otizmin yüksek prevalansına rağmen etkin tedaviler henüz tanımlanabilmiş değildir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda farklı genetik belirteçlerin kullanılması, istatistik analizlerin farklı olması, hasta gruplarının farklı olması, tanı kriterlerinin farklılığı, hastalığın genetik heterojenite göstermesi, genlerin zayıf etki göstermesi gibi nedenlerle otizmden sorumlu genler konusunda tam bir fikir birliği sağlayamamıştır (1).

Ülkemizde otizm genetiği konusunda bugüne kadar sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (100). OSB risk genleri, genel popülasyonda kognitif yetenek ve sosyal fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (100). Hastalıkla ilişkili genler ve biyolojik yolların keşfi için otizmde miRNA gen ekspresyon profillerinin anlaşılması umut vadeden bir araçtır (78). miRNA'lar merkezi sinir sisteminin hem gelişim hem de fonksiyonu için kritiktir (101). Her bir miRNA tarafından yönlendirilen çoklu mRNA hedeflerinin translasyonel kontrolündeki anormallikler OSB'lilerde gözlenen fenotip farklılıklarına yol açabilir (31). Bir miRNA'nın birden fazla hedefe bağlanabilme özelliği, bu miRNA'nın birden fazla genin ekspresyonunu düzenleyebilme yeteneğini yansıtmaktadır. Dolayısıyla miRNA'lar, OSB'lilerdeki biyolojik kompleksliğin ve klinik heterojenitenin bir göstergesi olabilirler. miRNA'lar, ekspresyon seviyesinde değişiklikler yaparak OSB riskine katkıda bulunabilirler (75). miRNA'ların işlevsel düzeninin bozulması, anormal gen metilasyonuna ve buna bağlı olarak da otizmle ilişkili bir genin ekspresyonundaki değişikliklere yol açabilir (30,33).

Otizmin bir beyin hastalığı olduğu ve gelişmekte olan beyinde bol miktarda miRNA bulunduğu bilinmektedir (33). miR-124 ve miR-9'un nörogenezde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların fazla eksprese olması astrosit sayısını azalttığı, inhibe olmalarının ise nöronların sayısında azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (77).

OSB'lilerin beyinde miR-142-5p, miR-142-3p, miR-451a, miR-144-3p ve miR-21-5p'nin aşırı derecede eksprese oldukları gösterilmiştir (86). Otizmde ekspresyonu artan bu miRNA'ların sinaps fonksiyonu ve sinyal iletimini etkiledikleri bilinmektedir (67).

Beyin dokusu çalışmalarının sonucunu yorumlamada hastaların yaşı göz önünde bulundurulurken, cinsiyet çoğu zaman nadir düşünülmektedir. OSB; beyin yapısı, genetik ve davranışsal özellikler açısından her iki cinsiyette farklılıklar göstermektedir. Bu durumun bir örneği olarak, kızlar erkeklere göre daha fazla *de novo* CNV ve SNP oranı taşımaktadır ve kızlarda otizm erkeklere göre daha ağır seyretmektedir. Schumann et al. (75) tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, her iki cinsiyeti içeren OSB'li hastaların ve kontrollerin beyinlerinin temporal korteksinde miRNA ekspresyonları mikarray yöntemiyle incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda miR-219 ve miR-338'in her iki cinsiyetin beyin temporal korteksinde farklı ekspresyonları olduğunu ve bu durumun oligodendrosit farklılıklarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. miR-488'in kızlarda anksiyete davranışıyla daha fazla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca nöronal gelişimde rolleri olan miR-125 ile miR-181'in ise cinsiyetler arası ekspresyon farklılıkları gösterebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada OSB'li kızların OSB'li erkeklere göre fonksiyonu bozulan daha fazla miRNA hedef gen ve yollarına sahip oldukları tespit edilmiştir (75). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre miRNA'ların cinsiyete özel bireysel tedavilerde kullanılabilirliği akla yatkın gelmektedir.

Hücrel ve sirküle olan miRNA'ların değişen ekspresyonları, sağlıklı kontrollerle karşılaştırılan otistik bireylerde gözlenmiştir (12). Popov et al. (83) tarafından otizmlili hastaların tam kanında miR-486-3p gen ekspresyon profillemesi araştırılmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, otizmlili çocuklarla kontrol popülasyonu arasındaki miRNA ekspresyon değişimlerini belirlemeyi amaç edinmişlerdir. Çalışmanın sonucunda insan nöronal farklılaşmasında olası rolleri ile beyne özgü ekspresyonu olan miR-486-3p'nin farklı bir şekilde eksprese olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalar otizm hastalarının periferik tam kanında değişen miRNA ekspresyon seviyelerinin altını çizmiştir (3,14,78,83). Yapılan tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlar miRNA'lar ve onların hedefinde olan genlerin otistik fenotipte çeşitliliği artırabileceğini düşündürmektedir.

miRNA aracılı ekspresyon çeşitliliği, otizmin karmaşık etiyolojisini ve onun klinik fenotipteki çeşitliliğini açıklayabilir mi? Başka bir deyişle miRNA'ları ve buna bağlı

olarak hedef gen ekspresyonlarını takip ederek otizme neden olan suçlu ya da suçlulara ulaşmak mümkün olabilir mi? Bu sorulara cevap aramak üzere yapılan bu tezde miRNA'ların hedefinde olan *POGZ* ve *PTEN* genlerinin otistik hasta ve kontrollerin periferik kandaki ekspresyonları araştırıldı. *POGZ* ve *PTEN* ekspresyonlarının otizme eşlik eden ID ile ilişkisinin olup olmadığı da değerlendirildi. Otizmlili hastalarda bu genlerin ekspresyonu ile genleri hedef alan miRNA'ların ilişkisi tam olarak belirlenememiştir. *POGZ* ve *PTEN* genlerini hedefleyen miRNA'lara (sırasıyla miR-3613-3p ve miR-19a-3p) bağlı olarak bu genlerdeki ekspresyon değişiklikleri, otizmlili çocuklarda görülen bazı klinik fenotiplere sebep olabilir.

POGZ ve *PTEN* genleri OSB fenotipinden sorumlu olabilecek aday genler olarak gösterilmektedir (9). *POGZ*, OSB'li hastalarda en çok mutasyona uğrayan genlerden biridir (46). Yizhou et al. (89) tarafından yapılan bir çalışmada mikrosefalisi olan ve gelişimsel bozukluğa sahip benzer fenotipte 7 hastada tüm ekzom sekanslama ile *POGZ*'de *de novo* fonksiyon kaybı mutasyonları bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla *de novo POGZ* mutasyonları sıklıkla bilişsel geriliği olan hastalarda bulunmuştur (46). *POGZ* mutasyonlu hastalar daha düşük IQ skoru göstermektedir. Bu nedenle araştırmacılar *POGZ* genindeki *de novo* mutasyonların OSB ve ID ile ilişkili olabileceğini düşünmektedir (90). Son zamanlarda *Drosophila melanogaster*'de normal öğrenme için *POGZ* geninin önemli olduğu bulunmuştur (46). Bu gendeki defektler ve genin ekspresyon değişiklikleri, otizmlili çocuklarda öğrenme yetersizliklerine sebep olabilir. Hicks et al. (33) tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada *POGZ* genini hedeflediği bilinen miR-3613-3p'nin, OSB'li hastalarda ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan tüm çalışmalar *POGZ* genindeki değişikliklerin otizm fenotipine çeşitlilik kazandıracağını destekler niteliktedir. Yaptığımız araştırmada *POGZ* geninin ekspresyonu incelendi. Bu genin hasta bireylerde kontrollere göre daha fazla eksprese olduğu tespit edildi ($p=0.0980$). Ayrıca cinsiyet bazında da *POGZ* geninin ekspresyon değişiklikleri araştırıldı. Hasta erkeklerde kontrollere göre daha fazla *POGZ* ekspresyonu olduğu ve bu sonucun anlamlı olduğu bulundu ($p=0.0002$). Kız hastalarda ise *POGZ*'nin kontrollere göre daha fazla eksprese olduğu ve anlamlı olmadığı bulundu ($p=0.8236$). Çalışmaya dahil edilen kız hastaların sayısının az olmasından dolayı genin ekspresyonundaki artış anlamlı bulunamamış olabilir. Daha fazla hasta sayısı ile cinsiyet bazında yapılacak araştırmalar, *POGZ* ekspresyonundaki artışın otizme ve otizmin erkeklerde daha fazla görülmesine dair ipuçları verebilir.

10. kromozom üzerinde bulunan ve epigenetik olarak farklı işleyişe sahip olan *PTEN* geni, PI3K/AKT/mTOR yolağının önemli bir düzenleyicisi olarak OSB fenotipindeki çeşitliliğe katkıda bulunabilir (61,92). *PTEN* geni, normal hücre aktiviteleri ve fonksiyonunun sürdürülmesinde kritik bir rol oynamaktadır (102). In vivo ve in vitro gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda nöronlarda *PTEN* geninin kaybının somatik, dendritik ve aksonal aşırı büyüme ile nöronal hipertrofiye yol açtığı gösterilmiştir (99). *PTEN* seviyelerinin post-transkripsiyonel miRNA düzenlemesinin kompleks durumları *PTEN* dozajının geniş bir aralığını oluşturabilir (61). Dolayısıyla aynı tanıyı almış farklı hastalarda farklı klinik fenotiplerin gözlemlenmesi miRNA-bağımlı *PTEN* ekspresyonu dozajı ile ilgili olabilir.

Bu çalışmada genel hasta grubunda kontrollere göre daha az *PTEN* gen ekspresyonunun olduğu ve istatistiksel açıdan anlamsız olduğu tespit edildi ($p=0.6565$). Bu genin ekspresyon değişiklikleri cinsiyet bazında da araştırılmış olup, hasta erkeklerde kontrollere göre daha az *PTEN* ekspresyonu olduğu ve bu sonucun anlamsız olduğu bulundu ($p=0.7513$). Kız hastalarda ise *PTEN*'nin kontrollere göre daha az eksprese olduğu ve anlamsız olduğu bulundu ($p=0.8862$). Çalışmaya dahil edilen hastaların sayısının az olmasından dolayı genin ekspresyonundaki azalış anlamlı bulunamamış olabilir. Hem daha fazla hasta sayısı ile hem de cinsiyet bazında yapılacak araştırmalar, *PTEN* ekspresyonundaki azalışın otizm etiyolojisine nasıl yansıdığına dair daha detaylı bilgi verebilir.

Yapılan çalışmalarda *POGZ* ve *PTEN* genleri ile bazı otizm vakalarına eşlik eden ID arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (46,94,98). Bu tez çalışmasında ID'ye sahip hastalar ve sahip olmayan hastalar, belirtilen genlerin ekspresyonlarının düzeyleri ve ID ile ilişkileri açısından karşılaştırıldı ve sonuçlar anlamsız olarak rapor edildi (*POGZ*/ID var/yok, $p=0.6$; *PTEN*/ID var/yok, $p=0.79$). Çalışılan hasta sayısının az olması, bu ilişkinin anlamsız olarak değerlendirilmesine neden olabilir. Daha fazla hasta sayısı ile ID ve bu genlerin ekspresyon değişikliklerinin yeniden araştırılması faydalı olabilir. Ayrıca bu genlerin ekspresyon değişikliklerinin, otizm kliniğinde gözlenen diğer bulgularla ilişkisi olup olmadığı da araştırılabilir.

miRNA ekspresyonlarındaki anormal değişimlerin, insan hastalıklarının ortaya çıkması ve gelişimiyle ilişkili olduğu artık bilinmektedir (81). Çoğu miRNA'nın metabolik hastalıklar ve kanserde daha fazla eksprese edildiği ve bu miRNA'ların seviyelerindeki

artışın, *PTEN* mRNA ve protein seviyelerinde bir azalma ile korele olduğu bildirilmiştir (100). *PTEN* geninin birden fazla miRNA'nın hedefinde olduğu bilinmektedir (61). Aynı özellik *POGZ* geni ve bu geni hedefleyen diğer miRNA'lar için de geçerlidir. Bir gen birden fazla miRNA'nın hedefinde olabilir ya da bir miRNA birden fazla geni etkileyebilir. Gelecek yıllardaki çalışmalarla bu genleri hedefleyen farklı miRNA'ların keşfedilmesi de olasıdır. *PTEN* ve *POGZ* geni ile onları hedefleyen miRNA'ların tamamının ya da farklı otizm aday genleri ve onları hedefleyen miRNA'ların tamamının ifade düzeylerinin daha fazla otizmlili vaka sayısında belirlenerek karşılaştırılması, klinik çeşitliliğe yönelik daha detaylı bilgi verebilir.

Yeni yapılacak çalışmalarla *PTEN* ve *POGZ* genleri ile onları hedefleyen miRNA'ların ekspresyonlarının daha fazla otizm hastasında araştırılması ve elde edilen sonuçların bu hastalarda belirlenen diğer klinik bulgularla da karşılaştırılması, otizm etiyolojisinde bu genlerle ilgili bilinmezlikleri ortadan kaldırılabilir. Gen ekspresyon seviyelerinde değişikliklere neden olan olasılıklardan biri de şudur: miRNA ekspresyonu dinamik bir işlem olup, beyin bölgeleri içerisinde ve beyin gelişimi boyunca değişkendir (33). Bu değişiklikler özel beyin bölgeleri içerisindeki epigenetik mekanizmalar tarafından ya da genetik mutasyonlar tarafından meydana gelebilir ve bu durum periferik kan örneklerinde tespit edilemeyebilir (97). Aynı zamanda miRNA'ların kandaki profilleri de değişim göstermektedir. Dolayısıyla belirtilen genlerin ekspresyonlarının özel beyin bölgelerinde de çalışılması ve bu tezdeki sonuçlarla karşılaştırılması faydalı olabilir. Bu genleri hedefleyen miRNA'lar klinikte potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilir ve hastalar arasında çeşitlenen klinik fenotipe özgü tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca bu miRNA'ların hedefinde olan ve otizm için yeni aday gen olabilecek diğer genlerin de araştırılması ve bulunması faydalı olacaktır.

6.KAYNAKLAR

1. Yüksel A. Otizm Genetiği. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2005; 36:35-41.
2. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. Behav Brain Res 2013; 251:95-112.
3. Huang F, Long Z, Chen Z, et al. Investigation of gene regulatory networks associated with autism spectrum disorder based on miRNA expression in China. PLoS One 2015; 10(6):e0129052.
4. Eapen V. Genetic basis of autism: Is there a way forward? Curr Opin in Psychiatry. 2011; 24:226-236.
5. Silverman JL, Yang M, Lord C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci 2010;11:490-502.
6. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: Genes, environment and gene-environment interactions. Dialogues Clin Neurosci 2012; 14:281-292.
7. Matsuzaki H, Iwata K, Manabe T, et al. Triggers for autism: Genetic and environmental factors. J Cent Nerv Syst Dis 2012; 4:27-36.
8. Şener EF, Çıkılı Uytun M, Korkmaz Bayramov K, et al. The roles of *CC2D1A* and *HTR1A* gene expressions in autism spectrum disorders. Metab Brain Dis 2016; 31:613-619.
9. Yin J, Schaaf CP. Autism genetics-an overview. Prenat Diagn 2017; 37:14-30.
10. Yaroğlu HY, Görür A, Ayaz L, ve ark. Mersin İlinde Sağlıklı Bireylerde mikroRNA Ekspresyon Profili. Mersin Üniv Sağlık Bil Derg 2011; 4: 25-29.
11. Constantin L. The role of mikroRNAs in cerebellar development and autism spektrum disorder during embryogenesis. Mol Neurobiol 2016; PMID: 27774573.
12. Kichukova TM, Popov NT, Ivanov IS, et al. Profiling of circulating serum microRNAs in children with autism spectrum disorder using stem-loop qRT- PCR assay. Folia Med (Plovdiv) 2017; 59:43-52.
13. Karakuş M, Çebi A. MikroRNA'ların otizmdeki rolü. TAF Prev Med Bull 2016; 15: 6.

14. Mundalil Vasu M, Anitha A, Thanseem I, et al. Serum microRNA profiles in children with autism. *Mol Autism* 2014; 30:5-40.
15. White J, Beck CR, Harel T, et al. *POGZ* truncating alleles cause syndromic intellectual disability. *Genome Med* 2016; 8:3.
16. Motavalli N. Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı ve Takip. Nobel Tıp Kitabevleri 2014:180.
17. Ardhanareeswaran K, Volkmar F. Focus: Autism spectrum disorders. *Yale J of Biol Med* 2015; 88:3-4.
18. Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: Genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci* 2006; 29:349-358.
19. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 1943; 217-250.
20. Volkmar F. Autism and the pervasive developmental disorders. In: *Lewis Child and Adolescent Psychiatry a Comprehensive Textbook*, 4rd Ed. Philadelphia. Lippincot Willsams&Wilkins, 2007: 384-410.
21. Won H, Mah W, Kim E. Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: Focus on neuronal synapses. *Front Mol Neurosci* 2013; 6: 19.
22. Hua R, Wei MP, Zhang C. The complex genetics in autism spectrum disorders. *Sci China Life Sci* 2015; 58:933–945.
23. Rubenstein JL, Merzenich MM. Model of autism: Model of autism increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2003; 2:255-267.
24. Şener EF. Association of copy number variations in autism spectrum disorders: A systematic review. *Chinese Journal of Biology* 2014; ID 713109.
25. American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and Statistical Manual and Mental Disorders –Text Revision*, 4th Ed. Washington D.C., APA, 2000.
26. Soykan DA, Taner DYI. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları, 2007:1030.
27. American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. 4th. American Psychiatric Association, Washington, DC, xxvii, 886 p.
28. Tan B, Zou Y, Zhang Y, et al. A novel *de novo POGZ* mutation in a patient with intellectual disability. *J Hum Genet* 2016; 6:357-359.
29. Karimi P, Kamali E, Mousavi SM, et al. Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci* 2017; 22: 27.

30. Waye MMY, Cheng HY. Genetics and epigenetics of autism: A review. *Psychiatry Clin Neurosci* 2017. doi: 10.1111/pcn.12606.
31. Vaishnavi V, Manikandan M, Tiwary BK, et al. Insights on the functional impact of microRNAs present in autism-associated copy number variants. *PLoS One* 2013; 8(2):e56781.
32. Bourgeron T. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *C R Biol* 2016; 339:300-307.
33. Hicks SD, Middleton FA. A comparative review of mikroRNA expression patterns in autism spektrum disorder. *Front Psychiatry* 2016; 7:176.
34. Şener EF, Özkul Y. Otizmin Genetik Temelleri. *Erciyes Üniv Sağlık Bilimleri Derg isi* 2013; 22: 86-92.
35. Sadakata T, Shinoda Y, Sato A, et al. Mouse models of mutations and variations in autism spectrum disorder-associated genes: Mice expressing Caps2/Cadps2 copy number and alternative splicing variants. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10:6335-6353.
36. Hawi Z, Tong J, Dark C, et al. The role of cadherin genes in five major psychiatric disorders: A literature update. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2017; doi: 10.1002/ajmg.b.32592.
37. Baker E, Richdale A, Short M, et al. An investigation of sleep patterns in adolescents with high-functioning autism spectrum disorder compared with typically developing adolescents. *Dev Neurorehabil.* 2013; 16:155-165.
38. Akçakın M. Follow-up of autistic Children: A Review. *Turk J Child Adolesc Ment Health* 2000; 7: 189-197.
39. Karakaş S. Kognitif Nörobilimler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2010:1232.
40. Pritchard DJ and Korf BR *Medical Genetics at a Glance*. Blackwell Science 2003; Oxford; Malden, MA, 115 p.
41. Strachan T, Read AP and Strachan T. *Human molecular genetics*. 4th. Garland Science, New York 2011; xxv, 781 p. 12.
42. Giridharan VV, Thandavarayan RA, Fries GR, et al. Newer insights into the role of miRNA a tiny genetic tool in psychiatric disorders: Focus on post-traumatic stres disorder. *Transl Psychiatry* 2016; 6:e954.
43. Carter MT, Scherer SW. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: A review. *Clin Genet* 2013; 83:399-407.

44. Martin CL, Ledbetter DH. Autism and cytogenetic abnormalities: Solving autism one chromosome at a time. *Current Psychiatry Reports* 2007; 9:141-147.
45. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet* 2009; 374: 1627-1638.
46. Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, et al. *de novo* *POGZ* mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of *POGZ*. *J Mol Psychiatry* 2016; 4:1.
47. Duru N. İki Nörolojik Kalıtsal Hastalıkta Gen Lokalizasyonu Çalışması. Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler ve Genetik Bölümü, İstanbul 2006: 13-14.
48. Çine N. Çevresel etkiler ve genetik. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics* 2011; 4: 16-25.
49. Boyacıoğlu S. Skolyoz, Körlük ve Araknodaktili Gösteren Geniş Bir Türk Ailesinde Bağlantı Analizi İle Yeni Gen Araştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri 2010: 16-17.
50. Vardarajan BN, Eran A, Jung JY, et al. Haplotype structure enables prioritization of common markers and candidate genes in autism spectrum disorder. *Transl Psychiatry* 2013; 28: 3:e262.
51. Tanrıdağ O. Davranış Nörolojisi: Beyin-Davranış İlişkilerinin Organizasyon Prensipleri, Sendromları ve Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015:329.
52. Abdolmaleky HM, Zhou JR, Thiagalingam S. An update on the epigenetics of psychotic diseases and autism. *Epigenomics* 2015; 7:427-449.
53. Yang Y, Muzny DM and Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013; 369: 1502-1511.
54. Kubota T, Mochizuki K. Epigenetic effect of environmental factors on autism spectrum disorders. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(5). pii: E504.
55. Mastrototaro G, Zaghi M, Sessa A. Epigenetic mistakes in neurodevelopmental disorders. *J Mol Neurosci* 2017; 61:590-602.
56. Geaghan M, Cairns MJ. MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry. *Biol Psychiatry* 2015; 78:231-239.
57. Wang W, Kwon EJ, Tsai LH. MicroRNAs in learning memory and neurological diseases. *Learn Mem* 2012; 19: 359-368.
58. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:126-139.

59. Forero DA, van der Ven K, Callaerts P, et al. miRNA genes and the brain: implications for psychiatric disorders. *Human Mutation* 2010; 31:1195-1204.
60. Xue M, Zhuo Y, Shan B. MicroRNAs, long noncoding RNAs, and their functions in human disease. *Methods Mol Biol* 2017; 1617:1-25.
61. He L. Post-transcriptional regulation of *PTEN* dosage by non-coding RNAs. *Sci Signal*. 2014; 3(146): pe39.
62. Ni WJ, Leng XM. Dynamic miRNA-mRNA paradigms: New faces of miRNAs. *Biochem Biophys Rep* 2015; 4:337-341.
63. www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa (EriřimTarihi: 07.12.2017)
64. Ander BP, Barger N, Stamova B, et al. Atypical miRNA expression in temporal cortex associated with dysregulation of immune, cell cycle, and other pathways in autism spectrum disorders. *Mol Autism* 2015; 19:6-37.
65. Ecevit H, Motor S, İzmirli M. Genden Tedaviye Yeni Yaklaşımlar: Kodlanmayan Nükleik Asitler. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg* 2013; 4.
66. Smalheiser NR, Lugli G, Zhang H, et al. Expression of microRNAs and other small RNAs in prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar Disorder and depressed Subjects. *PLoS One* 2014; 9:e86469.
67. Piletic K, Kunej T. MicroRNA Epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol* 2016; 90:2405-2419.
68. Wang E, Nie Y, Zhao Q, et al. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation. *J Cardiothorac Surg* 2013; 8:165.
69. Beveridge NJ, Tooney PA, Carroll AP, et al. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1156-1168.
70. Çınar İ, Dursun HG. miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi* 2016; 6:64-71.
71. Hitit M, Kurar E, Güzeloğlu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 2015; 10:211-218.
72. Bağcı Ö. MikroRNA'lar (miRNA) ve Kanser. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2014; 40:105-109.
73. Calore F, Fabbri M. MicroRNA's and cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2012; 6 (1).
74. Vella MC, Slack FJ. *C.elegans* microRNAs. *Wormbook* 2005; ISSN: 1551-8507.

75. Schumann CM, Sharp FR, Ander BP, et al. Possible sexually dimorphic role of miRNA and other sncRNA in ASD brain. *Mol Autism* 2017; 8:4.
76. Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS, et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics* 2008; 9:153-161.
77. Rizos E, Siafakas N, Skourti E, et al. miRNAs and their role in the correlation between schizophrenia and cancer. *Mol Med Rep* 2016; 14: 4942-4946.
78. Vachev TI, Nikifirov MI, Krasteva SV, et al. Down regulation of miRNA let-7b-3p and let-7d-3p in the peripheral blood of children with autism spectrum disorder. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2013; 2: 384-388.
79. Sarachana T, Zhou R, Chen G, et al. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med* 2010; 2:23.
80. Nguyen LS, Lepleux M, Makhlouf M, et al. Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Molecular autism*. 2016;7:1.
81. Shen L, Lin Y, Sun Z, et al. Knowledge-guided bioinformatics model for identifying autism spectrum disorder diagnostic microRNA biomarkers. *Sci Rep* 2016; 6:39663.
82. Talebizadeh Z, Butler MG, Theodoro MF. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res* 2008;1(4):240-250.
83. Popov NT, Madjirova NP, Minkov IN, et al. MicroRNA HSA-486-3P gene expression profiling in the whole blood of patients with autism, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2012; 26:3385-3388.
84. Wu YE, Parikshak NN, Belgard TG, et al. Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. *Nat Neurosci* 2016;19:1463-1476.
85. Seno MMG, Hu P, Gwadry FG, et al. Gene and miRNA expression profiles in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2011;1380:85–97.
86. Mor M, Nardone S, Sams DS, et al. Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Molecular Autism* 2015; 6:46.
87. <http://www.genecards.org/> (Erişim Tarihi: 07.12.2017)

88. Fukai R, Hiraki Y, Yofune H, et al. A case of autism spectrum disorder arising from a *de novo* missense mutation in *POGZ*. *Hum Genet* 2015; 60:277-279.
89. Ye Y, Cho MT, Retterer K, et al. *De novo POGZ* mutations are associated with neurodevelopmental disorders and microcephaly. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2015; 1(1):a000455.
90. Stessman HAF, Willemsen MH, Fencikova M, et al. Disruption of *POGZ* is associated with intellectual disability and autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 2016; 98: 541-552.
91. Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, et al. Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *J Hum Genet* 2016; 61:199-206.
92. Lugo JN, Smith GD, Arbuckle EP, et al. Deletions of *PTEN* produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic protein. *Front Mol Neurosci* 2014; 7: 27.
93. Govender D, Chetty R. Gene of the month: *PTEN*. *J Clin Pathol* 2012; 65:601-603.
94. McBride KL, Varga EA, Pastore MT, et al. Confirmation study of *PTEN* mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. *Autism Research* 2010; 3:1–5.
95. Molinari F, Frattini M. Functions and regulation of the *PTEN* gene in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology* 2013; 3:326.
96. Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, et al. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline *PTEN* tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* 2005;42:318–321.
97. Lv Jing-Wen, Cheng Tian-Lin, Qiu Zi-Long, et al. Role of the *PTEN* signaling pathway in autism spectrum disorder. *Neurosci Bull* 2013, 29:773-778.
98. Orrico A, Galli L, Buoni S, et al. Novel *PTEN* mutations in neurodevelopmental disorders and macrocephaly. *Clin Genet* 2009; 75: 195–198.
99. Zhou J, Parada LF. *PTEN* sinyaling in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 2012; 22: 873-879.
100. Özbaran B, Akgün B, Kaçamak D, ve ark. Otizmlı Olgularda Moleküler Karyotipleme Yöntemi ile Genetik Etiyolojinin Aydınlatılması. *Türk Psikiyatri Dergisi* 2016; 27:().

101. Zhang Y, Chen M, Qiu Z, et al. Mir-130a regulates neurite outgrowth and dendritic spine density by targeting *Mecp2*. *Protein Cell* 2016; 7: 489-500.
102. Xu W, Yang Z, Zhou SF, Lu N. Post-translational regulation of phosphatase and tensing homolog (*PTEN*) and its functional impact on cancer behaviors. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8: 1745-1751.
103. Worby CA, Dixon JE. *PTEN*. *Annual Review of Biochemistry* 2014; 83: 641-669.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Otuzinde mikroRNA'lar ile ilişkili hedef genlerin ekspresyonlarının araştırılması.				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU						
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarih	Veriye Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama				
	SİGORTA					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU					
	İLAN					
	YILLIK BİLDİRİM					
	SONUÇ RAPORU					
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ					
DİĞER						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No :	2016/491	Tarih :	23.09.2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlgili	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağır, Dış ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Dış Hek.Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Serkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

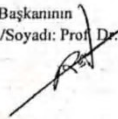
* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Otilimde mikroRNA'lar ile ilişkili hedef genlerin ekspresyonlarının araştırılması.		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	byancaer@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Yrd.Doç.Dr. Elif Funda Şener		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI / SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
FAZ 4		☐		
Gözetimsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma		☒		
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:





ASLI GİBİDİR



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

OTİZMDE MİKRORNA'LAR İLE İLİŞKİLİ HEDEF GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**5**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

issuu.com

İnternet Kaynağı

%**2**

2

sagens.erciyes.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**2**

3

www.ctf.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

**HİTİT, Mustafa, KURAR, Ercan and
GÜZELOĞLU, Aydın. "MikroRNA Biyogenezi",
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2015.**

Yayın

%**1**

5

utf.dergisi.org

İnternet Kaynağı

%**1**

6

dergipark.ulakbim.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

tbgder.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Tortamış and Özkaya, Banu. "Yaygın

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Tuğba TOPALOĞLU

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri: 7 Mart 1989, Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

email: tugbatopaloglubio@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Lisans	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi	2013
Lise	Yabancı Dil Ağırlıklı Kayseri Lisesi	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014- 2016	EÜ-GENKÖK	Öğrenci Stat. (Biyolog)
2012 (1 ay)	EÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Stajyer Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN YAYINLAR

1. **Topaloğlu T**, Şener EF, Canatan H.Nöropsikiyatrik Hastalıklarda Yeni Nesil Sekans Teknolojisinin Kullanımı ve Güncel Yaklaşımlar. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2016; 25: 92-99.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. Şener E.F., Taheri S., Şahin M., Korkmaz K., **Topaloğlu T.** , Şahin F. , et al., "Ağrıya Duyarsızlık İle İlişkili Genlerin Otistik Spektrum Bozukluklarında Araştırılması", 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), ANTALYA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2015, ss.367-368.
2. Şener E.F., Taheri S., Korkmaz K., Öztıp D.B., Zararsız G., **Topaloğlu T.**, et al., "Otizmde ve *PTEN* Geninin İlişkisinin Araştırılması.", 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), ANTALYA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2015, ss.336-336.
3. Şener E.F., Taheri S., Korkmaz K., Öztıp D.B., Zararsız G., **Topaloğlu T.**, et al., "Otizmde Dil ve Konuşma Gelişiminde *FOXP2* Geninin Rolü.", 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), ANTALYA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2015, ss.320-320.
4. Şener E.F., Dana H., **Topaloğlu T.**, Fidan R., Durmuş R., Zararsız G., et al., 'Agresyonla Bağlantılı Olan Tachykının Reseptör 1 (*TACR 1*) Geninin İntihar Eğilimi ile İlişkisi.', XIII. Kognitif Nörobilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İSTANBUL, TÜRKİYE, 19-22 Mayıs 2016, ss.57-59.
5. Şener E.F., Taheri S., Şahin M., **Topaloğlu T.**, Korkmaz Bayramov K., Zararsız G., et al., 'Otistik Spektrum Bozukluğunda *DRD4* Gen Ekspresyonunun Saldırganlık ile İlişkisinin Araştırılması'', 14. Sinir Bilim Kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 26-29 Mayıs 2016, cilt.10, no.1, ss.S42-S43.
6. Şener E.F., Dana H., **Topaloğlu T.**, Zararsız G., Özmen S., "Otistik Spektrum Bozukluklarında Nitrik Oksit Sentetaz 3 Geni Promotor

- Polimorfizmi İlişkisi'', 14. Sinir Bilim Kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 26-29 Mayıs 2016, cilt.10, no.1, ss.S42-S42.
7. Beyaz F., **Topaloğlu T.**, Ergen E., 'Immunohistochemical localization of certain nervous system markers retina of Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*). XIII. Kognitif Nörobilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İSTANBUL, TÜRKİYE, 19-22 Mayıs 2016, ss.60-61.
 8. Karabulut S., Gölgeli A., Korkmaz Bayramov K., Özdemir F., **Topaloğlu T.**, Ergen E., Tufan E., 'Öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun fare hipokampusunda *BDNF* ve miR-182 ekspresyonuna etkisi''. 42.Ulusal Fizyoloji Kongresi, 05-08 Eylül 2016, DÜZCE, TÜRKİYE, ss.127.
 9. Karabulut S., Korkmaz Bayramov K., Özdemir F., Ergen E., **Topaloğlu T.**, Tufan E., Dana H., Yazgan K., Gölgeli A. 'Öğrenme sonrası REM uyku yoksunluğunun fare hipokampal REST ve miR-9 ekspresyonuna etkisi''. 15. Ulusal SinirBilim Kongresi, 07-10 Mayıs 2017, SAKARYA, TÜRKİYE, ss.138.
 10. Bozpolat A., Ünal E., **Topaloğlu T.**, Taheri S., Kaçar Bayram A., Özcan A., Karakükçü M., Özdemir M.A., Per H. 'İnmeli Çocukların Prognozu ve *CDKN2B-AS1*, *HDAC9*, *NINJ2*, *NAA25* Gen Polimorfizimleri ile İlişkisi''. 2. Selim Hematoloji Güncelleme Kongresi, 24-26 Şubat 2017, ANTALYA, TÜRKİYE, ss.47.

KATILDIĞI ULUSAL KONGRE VE WORKSHOPLAR İLE ALDIĞI SERTİFİKALAR

1. **Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu.** THED-ERCİYES-2014. Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi. 26-28 Eylül 2014, Kayseri, Türkiye.
2. **Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.** SBY 000 Deney Hayvanları ve Uygulama Yöntemleri, Erciyes Üniversitesi 2013-2014, Kayseri, Türkiye.
3. **III. Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu.** Erciyes

Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi. 9-13 Mart 2015, Kayseri, Türkiye.

4. **Klinisyenler için Moleküler Genetikte Araştırma Yöntemleri Kursu Teşekkür Belgesi.** Erciyes Üniversitesi, GenKök. 2-6 Şubat 2015, Kayseri, Türkiye.
5. **Moleküler Tanıda Yeni Nesil Dizileme ve Biyoinformatik Analizi Kursu.** Erciyes Üniversitesi, Gen-Era Diagnostik, 2 Haziran 2015, Kayseri, Türkiye.
6. **Uluslararası Katılımlı Laboratuvar Hayvanları Bilimi III. Ulusal Kongresi,** Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinkaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Derneği,T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 26-28 Eylül 2013, Kayseri, Türkiye.Erciyes Üniversitesi. 26-28 Eylül 2013, Kayseri, Türkiye.
7. **1st International Advisory Board Meeting on The Current and Future Prospective in Scientific Research.** Erciyes Üniversitesi, GenKök 1-3 September 2014, Kayseri, Türkiye.
8. **Fourth International Workshop on cAMP Signaling, Protein Kinase A and Phosphodiesterases: from genetics to function and human disease.** Erciyes Üniversitesi, GenKök. 3-5 September 2015, Kayseri, Türkiye.
9. **II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi.** Deneysel Hematoloji Derneği. 16-19 Nisan 2015, Kayseri, Türkiye.
10. **Uluslararası Katılımlı Gevher Nesibe Tıp Günleri 2016 Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları Kongresi.** 11-13 Şubat 2016, Kayseri, Türkiye.
11. **III. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi.** Deneysel Hematoloji Derneği. 5-8 Mayıs 2016, Kayseri, Türkiye.
12. **XIII. Uluslararası Kognitif Nörobilim Kongresi.** Üsküdar Üniversitesi, 19-22 Mayıs 2016, İstanbul, Türkiye.
13. **14. SinirBilim Kongresi,** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara, Türkiye.

ALDIĞI DİĞER SERTİFİKALAR

1. **Kayseri Lisesi Onur Belgesi.** 2003, Kayseri, Türkiye.
2. **TTNET’le Geleceğini Netletleştir Organizasyonu.** İnönü Üniversitesi, 30 Mart 2011, Malatya, Türkiye.
3. **Yüksek Öğrenim Kredi ve Yurtlar Kurumu, Malatya Kız Yurdu Müdürlüğü Teşekkür Belgesi,** 12 Mart 2012, Malatya, Türkiye.

ALDIĞI ULUSAL ÖDÜLLER

1. Taheri S., Şener E.F., Dolu N., Öztop D.B., Arslan K., Beyaz F., Zararsız G., Korkmaz K., Özdemir F., Ergen E., **Topaloğlu T.**, Tufan E., Fidan R., Doğanyiğit Z., Rassaulzadegan M., Özkul Y. **Otistik Fare Modelinin Oluşturulmasında miRNA Profillemesi.** Gevher Nesibe Tıp Ödülleri 2016, Deneysel Tıp Kategorisi. **Birincilik Ödülü.** KAYSERİ, TÜRKİYE.
2. **İnmeli Çocukların Prognozu ve CDKN2B-AS1, HDAC9, NINJ2, NAA25 Gen Polimorfizmleri ile İlişkisi.** Bozpolat A., Ünal E., **Topaloğlu T.**, Taheri S., Kaçar Bayram A., Özcan A., Karakükçü M., Özdemir M.A., Per H. Gevher Nesibe Tıp Ödülleri 2017, Klinik Araştırma Öğretim Elemanı Kategorisi. **Üçüncülük Ödülü.** KAYSERİ, TÜRKİYE.

ALDIĞI ULUSLARARASI ÖDÜLLER

3. Gölge A., Karabulut S., Korkmaz Bayramov K., Özdemir F., **Topaloğlu T.**, Ergen E. “The investigation of effect of post-learning sleep deprivation on hippocampal synaptic plasticity-related genes and microRNA in mice” 29. ECNP kongresi, VIYANA, AVUSTURYA, 17-20 Eylül 2016, CDE Grant ödülü.