

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK (BD) OLGULARINDA
CALHM1 (KALSİYUM HOMEOSTAZ
DÜZENLEYİCİ FAKTÖR) GENİNİN SNP
(MUTASYON/POLİMORFİZM) LER YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

DUYGU (AYBAY) ARSLANTAŞ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2009970163

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİPOLAR BOZUKLUK (BD) OLGULARINDA
CALHM1 (KALSİYUM HOMEOSTAZ
DÜZENLEYİCİ FAKTÖR) GENİNİN SNP
(MUTASYON/POLİMORFİZM) LER YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

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

DUYGU (AYBAY) ARSLANTAŞ

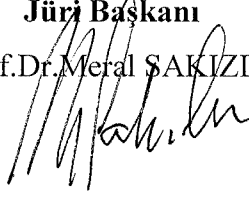
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. MERAL SAKIZLI

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2009970163

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

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Duygu (Aybay) ARSLANTAŞ “Bipolar Bozukluk (BD)
Olgularında CALHM1(kalsiyum homeostaz düzenleyici faktör) geninin
SNP(Mutasyon/Polimorfizm) ler Yönünden İncelenmesi” isimli yüksek lisans tezini
26.12.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Meral SAKIZLI



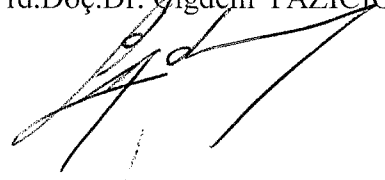
Jüri Üyesi

Prof.Dr. Zeliha TUNCA



Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr. Gıgdem YAZICIOĞLU



Jüri Üyesi(yedek)

Prof.Dr. Ayşegül ÖZERDEM

Jüri Üyesi(yedek)

Doç.Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Bipolar Bozukluk	6
2.1.1 Bipolar Bozukluğun Tarihçesi	6
2.1.2. Etiyolojisi	7
2.1.2.1. Genetik Etkenler	7
2.1.2.1.1.Aday Gen Çalışmaları	8
2.1.2.1.2. Genom Çapındaki İlişkilendirme Çalışmaları (GWASs)	9
2.1.2.2. Çevresel Etkenler	10
2.1.3. Epidemiyoloji	11
2.1.4. Tanı	11
2.1.4.1. Majör Depresif Epizot	14
2.1.4.2.Manik Epizot	16
2.1.4.3. Mikst Epizot	17
2.1.4.4. Hipomanik Epizot	17
2.1.4.5. Bipolar Bozukluk	18
2.1.4.6. Bipolar I Bozukluğu	20
2.1.4.7. Bipolar II Bozukluğu	20
2.1.4.8. Siklotimik Bozukluk	21
2.1.4.9. Başka Türli Adlandırılamayan Bipolar Bozukluk	21
2.2. CALHM1 (Kalsiyum Homeostaz Düzenleyici Faktör 1) Geni	22
2.2.1 CALHM1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi	22
2.2.2. CALHM1 Proteininin Yapısı ve İşlevi	23
2.2.3. CALHM1 iyon kanalının kalsiyum sinyal yolağındaki rolü	28

3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmanın Tipi	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	30
3.4. Çalışma Materyali	30
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	31
3.6. Veri Toplama Araçları	31
3.6.1 Bilgi toplama	31
3.6.2. Kullanılan Cihazlar	31
3.6.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri	32
3.6.4. Araştırmamız Kapsamında Hizmet Alımı	32
3.6.5. Uygulanan Yöntemler	32
3.6.5.1. Denek Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı	32
3.6.5.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	33
3.6.5.3. Genomik DNA' nın Saflığının ve Miktarının Ölçülmesi	34
3.6.5.4. Genomik DNA' nın Agaroz Jel Elektroföresi	34
3.6.5.5. CALHM1 Gen Dizisinin Veri tabanlarından Tespiti	34
3.6.5.6. Oligonükleotidler (Primerler)' in Tasarlanması	34
3.6.5.7. Oligonükleotidler (Primerler)' in Hazırlanması	35
3.6.5.8. PCR İçin Reaksiyon Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri	35
3.6.5.9. PCR Optimizasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroföresi	37
3.6.5.10. PCR Ürünlerini Kontrolü ve Görüntülenmesi	38
3.6.5.11. DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları	38
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	39
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	40
3.8.1. DNA Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi	40
3.8.2. İstatistiksel Analizler	40
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	40
3.10. Etik Kurul Onayı	40
4. BULGULAR	41
4.1 Çalışma gruplarının oluşturulması	41

4.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonuna Ait Bulgular	42
4.3. PCR Optimizasyon Deneylerine İlişkin Bulgular	44
4.4. DNA Dizi Analizi Verilerine Ait Bulgular	44
4.5. Ayrıntılarıyla Hasta, Kontrol ve Akraba Grubundaki Bireylerin CALHM1 geninde saptanan SNP'ler	45
4.6. İstatistiki Değerlendirmeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular	46
4.6.1 rs2986018 SNP	53
4.6.2. rs4918016 SNP	55
4.6.3. rs2986017 SNP	57
4.6.4. 360G>GA SNP	59
4.6.5 362G>GA SNP	60
4.6.6 389G>GA SNP	62
4.6.7. 661T>TA SNP	63
4.6.8 126C>CA SNP	65
4.6.9. 529C>CA SNP	67
4.6.10. 449C>CA SNP	68
4.6.11. 457C>CA SNP	70
4.6.12. rs41287502 SNP	71
4.6.13 rs2986016 SNP	73
4.6.14 rs729211 SNP	75
4.6.15 3555G>GA SNP	77
4.7 Çalışmada saptanan SNP'lerin minör allel frekansları	79
<u>5. TARTIŞMA</u>	80
<u>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	83
<u>7. KAYNAKLAR</u>	84
<u>8. EKLER</u>	90
EK 1 : CALHM 1 sekansı, eksonları, primerlerin oturduğu bölgeler, protein kodlayan bölgeler	90
EK 2: Etik Kurul Onayı	93
EK 3 : GENETİK ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU	94
EK 4: ÖZGEÇMİŞ	95

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Bipolar Bozuklukla İlgili En çok Çalışılmış Aday Genler	8
Tablo 2. DSM-IV-TR' ye Göre Duygudurum Bozuklukları Sınıflandırılması	12
Tablo 3. ICD-10'a Göre Duygudurum Bozuklukları Sınıflandırılması	13
Tablo 4. DSM-IV-TR' ye Göre Majör Depresif Epizotun Tanı Kriterleri	14
Tablo 5. DSM-IV-TR' ye Göre Manik Epizotun Tanı Kriterleri	16
Tablo 6. DSM-IV-TR' ye Göre Mikst Epizotun Tanı Kriterleri	17
Tablo 7. DSM-IV-TR' ye Göre Hipomanik Epizotun Tanı Kriterleri	17
Tablo 8. ICD 10'a Göre Bipolar Bozukluğun Alt Tipleri	18
Tablo 9. DSM-IV-TR'e Göre Bipolar Bozukluğun Alt Tipleri	19
Tablo 10. DSM-IV-TR ve ICD-10'a Göre Bipolar I Bozukluğunun Tanı Kriterleri	20
Tablo 11. DSM-IV-TR' ye Göre Bipolar II Bozukluğunun Tanı Kriterleri	20
Tablo 12. DSM-IV-TR' ye Göre Siklotimik Bozukluğun Tanı Kriterleri	21
Tablo 13. DSM-IV-TR'ye Göre Başka Türü Adlandırılmayan BPB Sınıflandırması	21
Tablo 14. CALHM1 Proteininin Potansiyel Domeynleri	25
Tablo 15. Araştırmada Kullanılan Cihazlar	31
Tablo 16. Araştırmada Kullanılan Sarf Malzemeleri	32
Tablo 17. Genomik DNA İzolasyon Aşamaları	33
Tablo 18. CALHM1 Geninin 1. Eksonu İçin Termal Cycler PCR Basamakları	35
Tablo 19. CALHM1 Geninin 2. Eksonu İçin Termal Cycler PCR Basamakları	36
Tablo 20. Ekson 1 İçin Optimize Edilmiş PCR Komponentleri	36
Tablo 21. Ekson 2 İçin Optimize Edilmiş PCR Komponentleri	37
Tablo 22. Araştırmanın Planı ve Takvimi	39
Tablo 23. Çalışmanın Sağlıklı Kontrol Bireylerine Ait Kodlar ve Bireylerin Cinsiyetleri.....	41
Tablo 24. Çalışmanın Bipolar Bozukluk Hastalarına Ait Kodlar ve Hastaların Cinsiyetleri	41
Tablo 25. Çalışmanın Birinci Derece Akraba Bireylerine Ait Kodlar ve Bireylerin Cinsiyetleri	42
Tablo 26. DNA Örneklerinin Pikodrop Ölçüm Değerleri	43

Tablo 27. CALHM1 Geninin 1. ve 2. Eksonundaki SNP'ler, Bu SNP'lerin Hasta, Kontrol ve Akraba Grubunda Homozigot ve Heterozigot Dağılımı	45
Tablo 28. Hasta ve Kontrol Grubunda CALHM1 Geninde Bulunan SNP'lerin Allel ve Genotip Frekansları ve Bipolar Bozuklukla Olan İlişki Analizlerinin Sonucu	46
Tablo 29. Çalışma Grubundaki SNP'lerin Hardy-Weinberg Dağılımları	51
Tablo 30. Bipolar Bozukluk Hastaları ve Bu Hastaların Birinci Derece Akrabalarının Bulunan SNP'ler Yönünden Karşılaştırılması	52
Tablo 31. Çalışmada Saptanan SNP'lerin Hesaplanan ve 1000 Genom Projesinde Farklı Popülasyonlar İçin Gösterilen Minör Allel Frekansları	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Bipolar bozukluğa ilişkin yaygın gelişim yolakları	10
Şekil 2. CALHM1 geninin transkripsiyon varyantı	22
Şekil 3. CALHM1'in 10. Kromozomdaki yerleşimi	23
Şekil 4. CALHM1 proteinini kodlayan nükleotid sekansı ve CALHM1 proteininin aminoasit sekansı	24
Şekil 5. CALHM1 proteini üç boyutlu yapısı	26
Şekil 6. CALHM1'in tat alma duyusundaki rolü	27
Şekil 7. Kalsiyum sinyal yolağı ve bu yolakta CALHM1'in yeri	28
Şekil 8. DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	42
Şekil 9. CALHM1 geninin 1. (800bp) ve 2. eksonuna (674bp) ait PCR ürünlerinin Agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 10. heterozigot rs2986018 SNP taşıyan sekans	53
Şekil 11. Homozigot referans sekansı	54
Şekil 12. Homozigot rs2986018 SNP taşıyan sekans	54
Şekil 13. Heterozigot rs4918016 SNP'ni taşıyan sekans	55
Şekil 14. Homozigot rs4918016 SNP'ni taşıyan sekans	56
Şekil 15. Homozigot referans sekansı	56
Şekil 16. Heterozigot rs2986017 SNP'ni taşıyan sekans	57
Şekil 17. Homozigot referans sekans	58
Şekil 18. Homozigot rs2986017 SNP'ni taşıyan sekans.....	58
Şekil 19. Heterozigot 360G>GA SNP'ni taşıyan sekans	59
Şekil 20. Homozigot referans sekans	60
Şekil 21. Heterozigot 362G>GA SNP'ni taşıyan sekans	61
Şekil 22. Homozigot referans sekans	61
Şekil 23. Heterozigot 389G>GA SNP'ni taşıyan sekans	62
Şekil 24. Homozigot referans sekans	63
Şekil 25. Homozigot 661T>TA SNP'ni içeren sekans	64
Şekil 26. Heterozigot 661T>TA SNP'ni içeren sekans	64
Şekil 27. Homozigot referans sekans	65

Şekil 28. Heterozigot 126C>CA SNP taşıyan sekans	66
Şekil 29. Homozigot referans sekans	66
Şekil 30. Heterozigot 529C>CA SNP'ni taşıyan sekans	67
Şekil 31. Homozigot referans sekans	68
Şekil 32. Heterozigot 449C>CA SNP'ni taşıyan sekans	69
Şekil 33. Homozigot referans sekans	69
Şekil 34. Heterozigot 457C>CA SNP'ni taşıyan sekans	70
Şekil 35. Homozigot referans sekans	71
Şekil 36. Heterozigot rs41287502 SNP'ni taşıyan sekans	72
Şekil 37. Homozigot referans sekans	72
Şekil 38. Homozigot referans sekans	73
Şekil 39. Heterozigot rs2986016 SNP'ni taşıyan sekans	74
Şekil 40. Homozigot rs2986016 SNP'ni taşıyan sekans	74
Şekil 41. Homozigot rs729211 SNP'ni taşıyan sekans	75
Şekil 42. Heterozigot rs729211 SNP'ni taşıyan sekans	76
Şekil 43. Homozigot referans sekans	76
Şekil 44. Heterozigot 3555G>GA SNP'ni taşıyan sekans	77
Şekil 45. Homozigot referans sekans	78

KISALTMALAR

SNP.....	Single nucleotide polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
bp	Base pair (Nükleotid çifti)
PCR.....	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
aa.....	Amino asit
TBE-Buffer.....	Tris-Borik asit EDTA tamponu
TE-Buffer.....	Tris-EDTA tamponu
dNTP.....	Deoksiribonukleozid trifosfat
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
ICD-10.....	Tenth Revision of the International Classification of Diseases
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV
GWAS	Genom Çapındaki İlişkilendirme Çalışmaları

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisansım boyunca bana olan inancını yitirmeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Meral Sakızlı 'ya çok teşekkür ediyorum. Kendisi uzun süren yüksek lisansım boyunca beni hep destekleyen ve her zaman kapısını bana sonuna kadar açan bir danışman olmuştur.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda tanıdığım tüm hocalarıma da bana olan katkılarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Ailem bana bugüne dek her konuda destek olmuştur. Onlara ne kadar teşekkür etsem azdır. Babamla ve annemle gurur duyuyorum. Bu tezle yüksek lisansımı bitirdiğimde diplomamı babama vereceğim, çünkü eğitime çok önem veren babam yüksek lisansı bitirmeme en çok sevinecek kişidir.

Canım eşime de teşekkür etmem gerekiyor, çünkü eşim bugüne kadar hep yanımdaydı. Kendisi benim her zaman yükselmemi isteyen ve her zaman mutlu olmamı arzulayan bir insandır. Buradan eşime beni en çok mutlu eden şeyin kendisi olduğunu ve bir hayatı benimle paylaşmayı seçtiği için benim bundan daha mutlu olamayacağımı söylemek istiyorum.

Bir de tezimi yazarken fikirlerine başvurduğum tüm arkadaşlarıma bilimsel bilgilerini benimle paylaşmaktan sakınmadıkları için teşekkür ediyorum. Yolumu aydınlatan insanların olması çok güzel.

BİPOLAR BOZUKLUK (BD) OLGULARINDA CALHM1 (KALSİYUM HOMEOSTAZ DÜZENLEYİCİ FAKTÖR) GENİNİN SNP (MUTASYON/POLİMORFİZM) LER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Duygu ARSLANTAŞ

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

ÖZET

Bipolar bozukluk, mani/hipomani ve depresyon dönemleri ile seyreden ve genetik geçiş gösterebilen psikiyatrik bir hastalıktır. Toplumda % 1,3 oranında görülmektedir. Bipolar bozukluk tip I toplumda kadınlarda ve erkeklerde aynı sıklıkla görülür. Bipolar bozukluk tip II erkeklere kıyasla kadınlarda daha yaygın görülür. Hastalığın etiyolojisi henüz net olarak gösterilememiştir.

Amacımız bipolar bozukluğa neden olabileceğini düşündüğümüz CALHM1 (kalsiyum homeostaz düzenleyici faktör 1) genini mutasyon ve polimorfizmler yönünden araştırmak ve eğer varsa, hastalıkla ilişkilerini yorumlamaktır.

Hipotezimiz, ‘Endoplazmik retikulum zarında ve hücre membranında bulunan ve hücrelerde kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan CALHM1 gen ürününün işlevini etkileyebilecek mutasyon veya polimorfizmlerin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceği’ şeklindedir.

Ekson 1 için DSM-IV-TR bipolar bozukluk tanı kriterlerine uygun olarak tanı konmuş 40 hasta, onların 10 birinci derece akrabası ve 39 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Ekson 2 için 40 hasta, onların 10 birinci derece akrabası ve 38 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Her birinden alınan kanlardan DNA izolasyonu yapıldı. Bu örneklerde PCR yöntemi ile CALHM1 geninin birinci ve ikinci eksonu amplifiye edilerek DNA dizi analizi yapıldı. Bu eksonlardaki SNP’ler Mutation Surveyor V4.0.9 programı ile incelendi. İstatistiksel analiz SHEsis programı kullanılarak yapıldı.

Gende altı adet tanımlanmış dokuz adet yeni bulunmuş toplam 15 adet SNP saptandı. Bunlardan 360G>GA SNP’nin allel frekansı hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı

fark gösterdi. Çalışmada en sık rastlanılan ve MAF değeri en yüksek olan SNP'ler rs729211 ve rs4918016 idi.

360G>GA SNP proteinde aminoasit değişimine neden olmaktadır. Fakat bu SNP'nin bipolar bozukluklu hastalarda CALHM1 proteininin fonksiyonunu etkilediğini gösterebilmek için örneklem grubunun genişletilmesi şarttır.

Anahtar Sözcükler: Bipolar bozukluk, CALHM1, SNP

**EXAMINATION OF THE GENE CALHM1 (CALCIUM HOMEOSTASIS
MODULATOR FACTOR) IN TERMS OF SNPs (MUTATION/POLYMORPHISM) IN
PATIENTS WITH BIPOLAR DISORDER (BD)**

Duygu ARSLANTAŞ

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

ABSTRACT

Bipolar disorder is a psychiatric disease with the periods of mania/hypomania and depression and showing genetic transition. It has been seen 1,3 % in population. Bipolar disorder type 1 is seen in women and men in same frequencies. Bipolar disorder type 2 is more common in women than men. Etiology of this disorder hasn't been clearly shown yet.

Our aim is to study in terms of mutations and polymorphisms of CALHM1 (calcium homeostasis modulator factor 1) gene which we think can cause bipolar disorder and if possible is to interpret association with disorder.

Our hypothesis is, ‘ Mutation or polymorphisms that might affect the function of CALHM1 gene product which exist in endoplasmic reticulum membrane and cell membrane and plays an important role on modulating calcium homeostasis in cells can be related to bipolar disorder’.

40 patients which have been diagnosed according to bipolar disorder diagnosis criteria of DSM-IV-TR, their 10 first degree-relatives and 39 healthy controls are being taken to study for exon 1. 40 patients, their 10 first degree-relatives and 38 healthy controls are being taken to study for exon 2. DNA isolation was carried out from blood obtained from each subject. DNA sequence analysis was performed being amplified first and second exons of CALHM1 gene by PCR. SNP's located on these exons were examined by Mutation Surveyor V4.0.9 programme. Statistical analysis was carried out by using SHEsis programme.

15 numbers of SNPs including six numbers of identified SNPs and nine numbers of novel SNPs in this gene was determined. Of these SNPs, allele frequency of 360G>GA SNP indicated a significant difference between case and control groups. SNPs which were most frequently seen and had a highest MAF value in this study were rs729211 and rs4918016.

360G>GA SNP causes amino acid alteration in protein. However, sample group must be expanded to show that this SNP affects a function of CALHM1 protein in patients with bipolar disorder.

Keywords: Bipolar disorder, CALHM1, SNP

1. GİRİŞ VE AMAC:

Bipolar bozukluğun içinde yer alan mani ve depresyon terimleri psikiyatrinin ilgilendiği en eski terimlerdenidir. Mani ve depresyon terimlerinin tarihçesi antik Yunan ve Roma dönemleri kadar eskidir. Melankoli ve maninin bağlantısı 2000 yıldır bilinmekte ve araştırılmaktadır [Işık, 2003].

Bipolar bozukluk, mani/hipomani ve depresyon dönemleri ile seyreden ve genetik geçiş gösterebilen psikiyatrik bir hastalıktır [Szczepankiewicz, 2013]. 19.yüzyılda ‘manik depresyon’ olarak bilinmekteydi. Bu hastalık 21. yüzyılda DSM (Mental bozuklukların tanımlanması ve sınıflandırılması el kitabı) ile ‘bipolar duygudurum bozukluğu’ olarak isimlendirilmiştir.

Bipolar bozukluk risk faktörlerinin saptanması, bu risk faktörlerini taşıyan bireylerin erken tanısında, önleyici uygulamaların geliştirilmesinde ve uygulanmasında, uygun tedavilerin geliştirilmesinde ve bipolar bozukluğun gidişatının öngörülebilmesinde önemli bir yer tutar. Hastalığın etiyolojisi genetik etkenler ve çevresel etkenlerden oluşmaktadır. Bipolar bozukluğun insidansı % 1,3’tür [Vega, 2011]. 20’li yaşlarda başlayan ve 40 yaşının üzerinde nadir olarak görülen bu hastalığın başlangıç yaşı cinsiyetler arasında değişim göstermemektedir. 16-25 yaş arasında olan erkek bireylerde bu hastalığın insidansı daha yüksektir. Erişkin bireylerde bu rahatsızlığın kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden daha yüksektir [Kennedy, 2005].

Bu tezde amacımız, bipolar bozuklukta etkili olabileceğini düşündüğümüz ve amiloid-beta prekürsör proteininin işlenmesinde rol oynayan ve kalsiyum kanalını kodlayan CALHM1 (kalsiyum homeostaz düzenleyici faktör 1) geninin bipolar bozukluklu hasta grubu, sağlıklı gönüllü grubu ve birinci derece akraba grubunda mutasyon ve polimorfizmler yönünden araştırılması ve eğer varsa bu mutasyon veya polimorfizmlerin hastalıkla ilişkilendirilmesidir. Hipotezimiz ise ‘Endoplazmik retikulum zarında ve hücre membranında bulunan ve hücrelerde kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan CALHM1 gen ürününün işlevini etkileyebilecek mutasyon veya polimorfizmlerin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceği’ şeklindedir. Araştırmamızın bağımlı değişkeni bipolar bozukluk hastalığıdır. Bağımsız değişkeni CALHM1 gen bölgesindeki analizini yaptığımız SNPl’er’dir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bipolar Bozukluk

Bipolar bozukluk, mani/hipomani ve depresyon dönemleri ile seyreden ve genetik geçiş gösterebilen psikiyatrik bir hastalıktır [Szczepankiewicz, 2013]. Bu hastalık Alman psikiyatrist Emil Kraepelin tarafından ilk defa 19.yüzyılda 'manik depresyon' olarak tanımlanmıştır. 21. yüzyılda DSM (Mental bozuklukların tanımlanması ve sınıflandırılması el kitabı) tarafından 'bipolar duygudurum bozukluğu' olarak tanımlanmıştır.

Bipolar bozuklukta manik, depresif ve karma Epizotlar vardır ve bu Epizotlar birbirini düzensiz olarak takip etmektedir [Gökbulut, 2008]. Bu Epizotların özellikleri genel hatlarıyla şöyledir; Manik Epizotda enerji ve aktiviteler artar. Kişi aşırı öfkeli veya aşırı neşeli olur. Kişinin ruhsal durumuna sinirlilik hakimdir ve kişi her zamankinden farklı davranışlar sergiler. Hasta gücü ve yetenekleri ile ilgili gerçek dışı inanışlara kapılır. Hasta alkol ve bağımlılık yapıcı maddeleri kullanmaya meyillidir. Uykuya normalden daha az ihtiyaç duyar. Konsantrasyon bozukluğu ve fikir uçuşmaları yaşar. Manik evreyi izleyen depresif Epizotda hasta kendini endişeli ve üzgün hisseder. Hastanın ruh hali bu Epizotda kötümserdir. Kendini değersiz hisseder. Günlük aktivitelere ilgisiz kalır. Konsantrasyon bozukluğu yaşar ve karar vermede güçlük çeker. Unutkanlık ve uyku bozukluğu yaşar. Hasta ya aşırı kilo kaybeder ya da aşırı kilo alır. Depresif Epizotda hastalarda hiçbir bedensel rahatsızlığa bağlı olmadan kronik ağrı ve fiziksel şikayetler görülür. Bu evrede intihar girişimleri ve intihar düşünceleri gözlemlenmektedir. Hastalarda manik ve depresif Epizotlar birbirini izlerken hiçbir hastalık belirtisinin olmadığı normal dönemlerin de gözlemlenebileceğini belirtmiştir[Emil Kraepelin].

2.1.1 Bipolar Bozukluğun Tarihçesi

Bipolar rahatsızlığının geçmişi çok eski zamanlara dayanır. Mani ve melankoli en eski terimlerdir ve psikiyatri içinde bu tanımları Homeros döneminde Yunanlılar yapmıştır. 2500 yıl önce bu terimler Hipokrat ve okulu tarafından kavramsallaştırılmıştır. Kapadokyalı Arateus mani ve melankoliyi bir bütün olarak ele almıştır. Arateus bu iki durumu aynı rahatsızlığın parçaları olarak değerlendirmiştir. Bipolar bozukluklar böylelikle ortaya

çıkıştır. Arateus çalışmalarında maninin çok çeşitli bulgulara sahip olduğunu tüm bu formların aynı hastalığa ait olduğunu savunmuştur.

19.yüzyılın başlarında karışık durumlu, hızlı döngülü ve atipik bipolar bozukluk çok iyi bilinmekteydi. 20.yüzyılda psikofarmakolojik devrim ile konuya olan ilgi artmıştı. Emil Kraepelin ve Wilhelm Weygant tarafından 19.yüzyılın sonunda kavramsallaştırılmış karışık (karmaşık) durumlu bipolar bozukluğun yeniden keşfi antidepresanlar ve duygudurum dengeleyiciler hakkındaki tedavilerle ilgili sorunlarla ilişkilendirilmiştir. Farmakolojik devrimin başlamasının üzerinden yarım yüzyıl geçmiştir.

Günümüzde psikiyatri alanında alınan sonuçlar ileri düzeydedir: biyolojik araştırma ve genetik alanında, hastalığın tedavisi ve hastalıktan korunmada, klinik ve prognostik araştırmalarda, psikopatolojik ve diagnostik yaklaşımlarda oldukça ilerleme kaydedilmiştir. Toplumların mental rahatsızlıklara olan bakışı da oldukça farklılaşmıştır. Hastaların hayatları çok daha iyi hale gelmiştir [Marneros, 2005].

2.1.2. Etiyolojisi

Bipolar bozukluk etiyojisinin saptanması, risk faktörlerini taşıyan bireylerin erken tanısında, önleyici uygulamaların geliştirilmesinde ve uygulanmasında, uygun tedavilerin geliştirilmesinde ve bipolar bozukluğun gidişatının öngörülebilmesinde önemli bir yer tutar. Bipolar bozukluğun etiyojisi henüz net olarak gösterilememiş olsa da [Kaplan, 1994], genetik ve çevresel etkenlerin bir arada rol oynadığı düşünülmektedir.

2.1.2.1. Genetik Etkenler

Bipolar bozukluk genetik yönü en çok araştırılan psikiyatrik hastalıklar arasındadır. Günümüzde bipolar bozukluğun genetik yönü ile ilgili olan araştırmalar artmıştır. Aile, ikiz ve evlat edinme araştırmaları bipolar bozukluğun genetik etiyojisine ışık tutmuştur [Dick, 2003].

Günümüzde etkilenmiş genlerin saptanması için gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Geçtiğimiz yıllarda, aday genlerde yapılan bağlantı ve ilişkilendirme çalışmaları en sık kullanılan yöntemlerdi [Niculescu, 2002]. Bipolar bozuklukta birinci derece akrabaların risk oranları genel popülasyonun risk oranına göre yedi

kat fazladır [Sullivan, 2012]. İkizlerde bipolar bozukluğun kalıtımsallık oranı % 85'dir [Bienvenu, 2011]. Monozigot ikizlerde kalıtımsallık oranı % 40-70 arasındadır [Craddock, 1999]. Dizigot ikizlerde bu oran monozigot ikizlere göre daha düşüktür. Bu oranlara bakarak bipolar bozukluğun kalıtımsallığı yüksek olan multifaktöriyel bir hastalık olduğu söylenebilir. Bipolar bozukluğun kalıtımı oldukça karmaşıktır. Günümüze kadar yapılan tüm araştırmalarla, bağlantılı genomik bölgelerin saptanması, hastalıkta etkili genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır [Niculescu, 2002].

Bipolar bozukluk klasik Mendel genetik yasalarıyla kalıtımsal geçiş göstermemektedir. Polimorfik ve multifaktöriyel bir kalıtım ile genetik geçiş göstermektedir. Hastalıktan tek başına sorumlu olan tek bir gen veya SNP tespit edilememiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları birbiri ile tutarsızdır. Günümüzde genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), önceden yapılmış olan hastalığa yatkınlık genleri ile ilgili ilişkilendirme çalışmalarının verilerinin tekrarı ve yeni aday genlerin keşfi için kullanılmaktadır [Szczepankiewicz, 2013].

2.1.2.1.1.Aday Gen Çalışmaları

Aday gen çalışmalarında fonksiyonu bilinen spesifik bir gen seçilir ve bu genin hastalık ile ilişkisi araştırılır. Aday gen çalışmaları şüpheli genleri araştırır, yeni aday genlerin bulunmasına olanak sağlamaz. Aday gen çalışmalarının verilerinin sonuçlarının yorumlanması için aynı çalışmanın başkaları tarafından da tekrarlanabilir olması gereklidir.

Tablo 1. Bipolar bozuklukla ilgili en çok çalışılmış aday genler [Szczepankiewicz, 2013]

Gen sembolü	Gen ismi	Çalışılmış SNP'ler
5-HTT	Serotonin taşıyıcı	956304, rs25528, rs6354, rs6355, rs6353, rs6352, rs1042173, rs1532042 rs1050565, rs2020934, rs2066713, rs2020936, rs2020937, rs2020938, rs2020939, rs140701, rs3794808, rs3813034
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör	Val/Met (rs6265), rs988748-(GT)n-rs6265; rs1519480, rs12273363, rs11030107; rs1519480, rs7127507 rs2030324, rs2883187
COMT	kateşol-Ometiltransferaz	Val/Met rs737865, rs165688, rs165599, rs2097603
DISC1	Şizofreni 1'de	rs1407598, rs1407598, rs1535529, rs3524; rs1538977, rs2492367,

	bozulmuş	rs2812393, rs1322784; rs1538979, rs821577; rs766288, rs3738401, rs2492367, rs6675281, rs12133766, rs1000731, rs7546310 and rs821597; rs2738864(C)-rs16841582(C) A844G, C1348T, C1446T, C1460T, T1595C, C14T, T11870C, G11160A, C11085A, C9481T, G1916A, T2163A, G2304C, C3215T, G65049
DTNBP1	Distrobrevin Bağlayıcı Protein 1	rs2619538; P1757 and P1320; rs3213207, rs1011313, rs2005976, rs760761, rs2619522; P1763
DAOA	D-amino asit oksidaz aktivatör	rs1935058, rs1341402, rs2391191, rs1935062, rs947267, rs954581; M12, rs1341402, M15 (rs2391191), rs1935062, M19 (rs778294), M23, M24; rs746187 (M7), rs3916966 (M13), rs3916972 (M25); rs746187-G and rs3916972-G Meta-analysis
NRG1	Nöroglin1	SNP8NRG221533, SNP8NRG241930, SNP8 NRG243177 (rs6994992) SNP8NRG221533, 478B14-878, 420M9-139, SNP8 NRG243177, D8S1810

Bipolar bozuklukla ilgili en çok çalışılmış ve en tutarlı sonuçları veren aday genler Tablo 1’de gösterildiği gibi SLC6A4/5-HTT (serotonin taşıyıcı), BDNF (Beyinden köken alan nörotrofik faktör), COMT (Katekol-O-metiltransferaz), DISC1 (şizofreni 1’de bozulmuş), DTNBP1 (Distrobrevin Bağlayıcı Protein 1), DAOA (D-amino asit oksidaz aktivatör), ve NRG1 (nöroglin1) dir.

Bipolar bozuklukla ilişkili olduğuna dair veriler elde edilen bazı önemli aday genlerin (DISC1, DTNBP1, DAOA, NRG1) haritalama çalışmaları ile ilk olarak şizofreni ile ilgili daha sonrasında ise bipolar bozuklukla ilgili olduğu gösterilmiştir.

2.1.2.1.2. Genom Çapındaki İlişkilendirme Çalışmaları (GWASs)

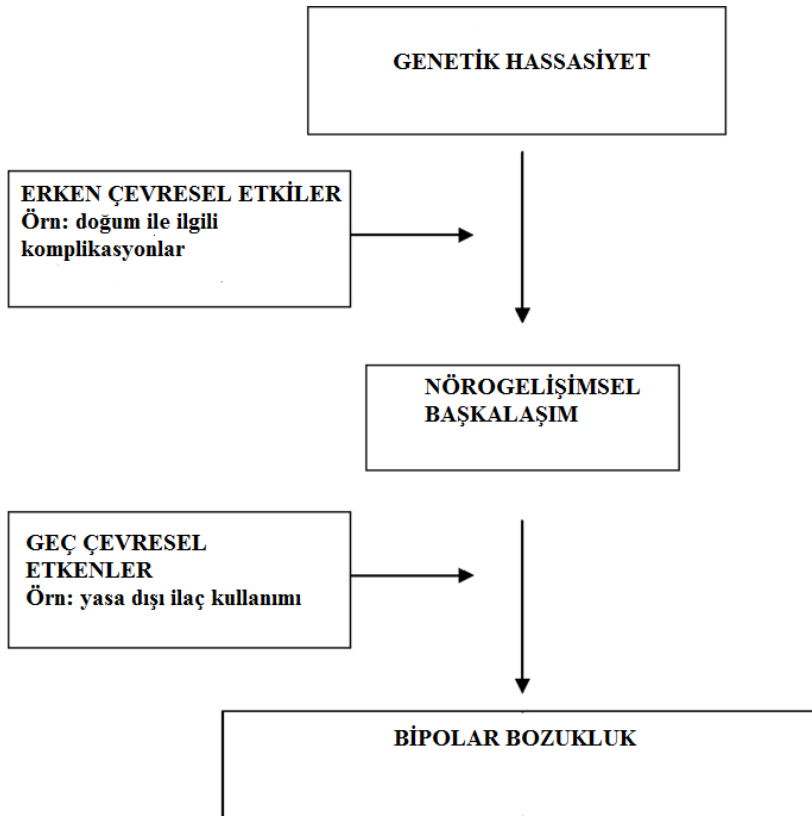
Bu metot eş zamanlı olarak, geniş hasta-kontrol gruplarında genom boyunca yayılmış yüzlerce SNP’nin analizini içerir. Aday gen çalışmalarının aksine tekrarlanabilir sonuçlar verir.

Bugüne kadar bipolar bozuklukla ilgili yapılan genom çapındaki ilişkilendirme çalışmaları şunlardır: WTCCC (Wellcome Trust Case Control Consortium), STEP-BD (Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder), WTCCC + STEP-BD, BiGS (NIMH) (Bipolar Genome Study (National Institute of Mental Health)), NIMH/Pritzker GSK (GlaxoSmithKline) WTCCC, GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group,

German sample, Replication I and II, UK sample, ImmunoChip data + PGC-BD, Bulgarian, Swedish, Norwegian Icelandic, Japanese, Han Chinese [Szczepankiewicz, 2013].

2.1.2.2. Çevresel Etkiler

Bipolar bozuklukta çevresel etkenlerin yeri tam olarak anlaşılmış değildir. Tek yumurta ikizlerinde konkordans tam değildir. Bu, hastalığın etiyolojisinde genetik faktörlerin tek başına rol almadığını çevresel faktörlerin de rolünün önemli olduğunu vurgulamaktadır [Kessing, 2004], [Manning JS, 1998]. Bipolar bozukluğun etiyolojisinde çevresel faktörler erken çevresel faktörler ve geç çevresel faktörler olmak üzere ikiye ayrılır. Çevresel etkiler ile bipolar bozukluğun ilişkisi Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Bipolar bozukluğa ilişkin yaygın gelişim yolları

2.1.3. Epidemiyoloji

Bipolar bozukluk toplumda % 1,3 oranında görülmektedir [Vega, 2011]. Hastalık kadın ve erkekte yirmili yaşlarda başlar. 16 ve 25 yaş arası erkeklerde bipolar bozukluk daha yaygın görülür. Erişkin bireylerde bu hastalık kadınlarda daha yaygın görülmektedir [Kennedy, 2005]. Bipolar bozukluk tip I toplumda kadınlarda ve erkeklerde aynı sıklıkla görülür. Bipolar bozukluk tip II erkeklere kıyasla kadınlarda daha yaygın görülmektedir [Grunze, 2011]. Bipolar tip I bozukluğunun prevalansı % 0,4-1,6 arasındadır [Bräunig, 1998]. Bipolar tip II bozukluğunun prevalansı % 0,5-1,9 arasındadır [Brand, 2010]. Bipolar bozuklukta hastalık süresince erkeklerde mani ve depresif epizot eşittir. Fakat kadınlarda hastalıkta yıllar ilerledikçe depresif epizotun sıklığı artmaktadır [Brand S, 2010].

2.1.4. Tanı

Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından yayınlanan “Psikiyatride Hastalıkların Tanımlanması ve Sınıflandırılması El Kitabı (DSM-IV-TR) “na göre, duygudurum bozukluklarının kapsadığı hastalıklar Tablo 2’de verilmiştir [www.psychiatry.org/ 2013].

Tablo 2. DSM-IV-TR’ ye Göre Duygudurum Bozuklukları Sınıflandırılması [Dursun, 2008]

A. Depresif Bozukluklar
1. Majör Depresif Bozukluk
a. Majör Depresif Bozukluk, Tek Epizot
b. Majör Depresif Epizot, Reküran (Yineleyici)
2. Distimik Bozukluk
3. Başka Türlü Adlandırılmayan Depresif Bozukluk
B. Bipolar Bozukluklar
1. Bipolar I Bozukluğu
a. Bipolar I Bozukluğu, Tek Manik Epizot
b. Bipolar I Bozukluğu, En Son Epizot Hipomanik
c. Bipolar I Bozukluğu, En Son Epizot Manik
d. Bipolar I Bozukluğu, En Son Epizot Mikst
e. Bipolar I Bozukluğu, En Son Epizot Depresif
f. Bipolar I Bozukluğu, En Son Epizot Belirlenmemiş
2. Bipolar II Bozukluğu
3. Siklotimik Bozukluk
4. Başka Türlü Adlandırılmayan Bipolar Bozukluk
C. Diğer Duygudurum Bozuklukları
1. Genel Tıbbi Duruma Bağlı Duygudurum Bozukluğu
2. Madde Kullanımının Yol Açtığı Duygudurum Bozukluğu
3. Başka Türlü Adlandırılmayan Duygudurum Bozukluğu

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan “Hastalıklar ve İlgili Sağlık Problemlerinin Uluslararası İstatistiksel Sınıflandırılması (ICD-10)” na göre duygudurum bozukluklarının sınıflandırılması aşağıdaki Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo3. ICD-10’a Göre Duygudurum Bozuklukları Sınıflandırılması

[www.who.int/classifications/icd/en/ 2013], [Dursun, 2008]

<u>DUYGUDURUM BOZUKLUKLARI</u>
A. Manik Nöbet
1.Hipomani
2.Psikotik Belirtisiz Mani
3.Psikotik Belirtili Mani
4.Manik Nöbetler, Diğer
5.Manik Nöbet, Tanımlanmamış
B. Bipolar Duygulanım Bozukluğu
1.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Şimdiki Nöbet Hipomanik
2.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Psikotik Belirtisiz Şimdiki Nöbet Manik
3.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Psikotik Belirtili Şimdiki Nöbet Manik
4.Bipolar Duygulanım B, Şimdiki Nöbet Hafif veya Orta Şiddetli Depresyon
5.Bipolar Duygulanım B, Şimdiki Nöbet Psikotik Belirtisiz Ağır Depresyon
6.Bipolar Duygulanım B, Şimdiki Nöbet Psikotik Belirtili Ağır Depresyon
7.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Şimdiki Nöbet Karışık
8.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Su Anda iyilik Döneminde
9.Bipolar Duygulanım Bozuklukları, Diğer
10.Bipolar Duygulanım Bozukluğu, Tanımlanmamış
C. Depresif Nöbet
1.Hafif Depresif Nöbetler
2.Orta Depresif Nöbet
3.Psikotik Belirtisiz Ağır Depresif Nöbet
4.Psikotik Belirtili Ağır Depresif Nöbet
5.Depresif Epizotlar, Diğer
6.Depresif Nöbet, Tanımlanmamış
D. Yineleyen Depresif Bozukluk
1.Yineleyen Depresif Bozukluk, Şimdiki Nöbet Hafif Şiddetli
2.Yineleyen Depresif Bozukluk, Şimdiki Nöbet Orta Şiddetli
3.Yineleyen Depresif Bozukluk, Şimdiki Nöbet Psikotik Belirtisiz Ağır Şiddetli

4.Yineleyen Depresif Bozukluk, Şimdiki Nöbet Psikotik Belirtili Ağır
5.Yineleyici Depresif Bozukluk, iyilik Dönemi
6.Yineleyen Depresif Bozukluklar, Diğer
7.Yineleyen Depresif Bozukluk, Tanımlanmamış
E. İnatçı Duygudurum (duygulanım) Bozuklukları
1.Siklotimi
2.Distimi
3.inatçı Duygudurum (Duygulanım) Bozuklukları, Diğer
4.İnatçı Duygudurum (Duygulanım) Bozuklukları, Tanımlanmamış
F. Duygudurum (Duygulanım) Bozuklukları, Tanımlanmamış

2.1.4.1. Majör Depresif Epizot

Tablo 4. DSM-IV-TR' ye Göre Majör Depresif Epizotun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>MAJÖR DEPRESİF EPİZOT</u>
A. İki haftalık bir dönem sırasında, daha önceki işlevsellik düzeyinde bir değişiklik olması ile birlikte, aşağıdaki semptomlardan beşinin (ya da daha fazlasının) bulunmuş olması; semptomlardan en az birinin ya (1) depresif duygudurum ya da (2) ilgi kaybı ya da artık zevk alamama olması gerekir (açıkça genel tıbbi bir duruma bağlı olan ya da duyguduruma uygun olmayan hezeyan ya da halüsinasyon semptomları katılmaz).
(1) Ya hastanın kendisinin bildirmesi ya da başkalarının gözlemesi ile belirli, hemen her gün, yaklaşık gün boyu süren depresif duygudurum (çocuklarda ve ergenlerde irritabl duygudurum bulunabilir).
(2) Hemen her gün, yaklaşık gün boyu süren, tüm etkinliklere karşı ya da bu etkinliklerin çoğuna karşı ilgide belirgin azalma ya da artık bunlardan eskisi gibi zevk alamıyor olma (ya hastanın kendisinin bildirmesi ya da başkalarınca gözleniyor olması ile belirlendiği üzere).
(3) Perhizde değilken önemli derecede kilo kaybı ya da kilo alımının olması, ya da hemen her gün iştahın azalmış ya da artmış olması (çocuklarda beklenen kilo alımının olmaması).

(4) Hemen her gün insomnia (uykusuzluk) ya da hipersomninin (aşırı uyku) olması.
(5) Hemen her gün psikomotor ajitasyon ya da retardasyonun olması (sadece huzursuzluk ya da ağırlaştığı duygularının olduğunun bildirilmesi yeterli değildir, bunların başkalarınca da gözleniyor olması gerekir).
(6) Hemen her gün yorgunluk, bitkinlik ya da enerji kaybının olması.
(7) Hemen her gün değersizlik, aşırı ya da uygun olmayan suçluluk duygularının (hezeyan düzeyinde olabilir) olması (sadece hasta olmaktan ötürü kendini kınama ya da suçluluk duyma olarak değil).
(8) Hemen her gün düşünme ya da düşüncelerini belirli bir konu üzerinde yoğunlaştırma yetisinde azalma ya da kararsızlık(ya hastanın kendisi söyler ya da başkaları bunu gözlemiştir).
(9) Yineleyen ölüm düşünceleri (sadece ölmekten korkma olarak değil), özgül bir tasarı kurmaksızın yineleyen intihar etme düşünceleri, intihar girişimi ya da intihar etmek üzere özgül bir tasarının olması.
B. Bu semptomlar bir mikst epizotun tanı ölçütlerini karşılamamaktadır.
C. Bu semptomlar klinik açıdan belirgin bir sıkıntıya ya da toplumsal, mesleki alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında bozulmaya neden olur.
D. Bu semptomlar bir madde kullanımının ya da genel tıbbi bir durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.
E. Bu semptomlar yas ile daha iyi açıklanamaz, yani sevilen birinin yitirilmesinden sonra bu semptomlar iki aydan daha uzun sürer ya da bu semptomlar, belirgin bir işlevsel bozulma, değersizlik düşünceleriyle hastalık düzeyinde uğraşıp durma, intihar düşünceleri, psikotik semptomlar ya da psikomotor retardasyonla belirlidir.

2.1.4.2.Manik Epizot

Tablo 5. DSM-IV-TR’ ye Göre Manik Epizotun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>MANİK EPİZOT</u>
A. En az bir hafta (hastaneye yatırılmayı gerektiriyorsa herhangi bir süre) süren, olağandışı ve sürekli, kabarmış, taşkın ya da irritable, ayrı bir duygudurum döneminin olması.
B. Duygudurum bozukluğu dönemi sırasında, aşağıdaki semptomlardan üçü (ya da daha fazlası) (duygudurum irritable ise dördü) belirgin olarak bulunur: (1) Benlik saygısında abartılı artma ya da grandiyozite (2) Uyku gereksiniminde azalma. (3) Her zamankinden daha konuşkan olma ya da konuşmaya tutma. (4) Fikir uçuşmaları ya da düşüncelerin sanki ayrışıyor gibi birbirlerinin peşi sıra gelmesi yaşantısı. (5) Distraktibilite (dikkat dağınıklığı). (6) Amaca yönelik etkinlikte artma ya da psikomotor ajitasyon. (7) Kötü sonuçlar doğurma olasılığı yüksek, zevk veren etkinliklere aşırı katılma.
C. Bu semptomlar mikst epizotun tanı ölçütlerini karşılamamaktadır.
D. Bu duygudurum bozukluğu, mesleki işlevsellikte, olağan toplumsal etkinliklerde ya da başkalarıyla olan ilişkilerde belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da, kendisine ya da başkalarına zarar vermesini önlemek için hastaneye yatırmayı gerektirecek denli ağırdır ya da psikotik özellikler gösterir.
E. bu semptomlar bir madde kullanımının ya da genel tıbbi bir durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.

2.1.4.3. Mikst Epizot

Tablo 6. DSM-IV-TR' ye Göre Mikst Epizotun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>MİKST EPİZOT</u>
A. En az bir haftalık bir dönem boyunca hemen her gün, hem bir manik Epizot hem de bir majör depresif Epizot için tanı ölçütleri (süre dışında) karşılanmıştır.
B. Bu duygudurum bozukluğu, mesleki işlevsellikte, olağan toplumsal etkinliklerde ya da başkalarıyla olan ilişkilerde belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da, kendisine ya da başkalarına zarar vermesini önlemek için hastaneye yatırılmayı gerektirecek denli ağırdır ya da psikotik özellikler gösterir.
C. Bu semptomlar bir madde kullanımının ya da genel tıbbi bir durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.

2.1.4.4. Hipomanik Epizot

Tablo 7. DSM-IV-TR' ye Göre Hipomanik Epizotun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>HİPOMANİK EPİZOT</u>
A. Olağan, depresif olmayan duygudurumdan açıkça farklı, en az dört gün boyu süren, sürekli kabarmış, askın ya da iritabl ayrı bir duygudurum döneminin olması.
B. Duygudurum bozukluğu dönemi sırasında, aşağıdaki semptomlardan üçü (ya da daha fazlası) (duygudurum iritabl ise dördü) belirgin olarak bulunur: (1) Benlik saygısında abartılı artma ya da grandiyozite. (2) Uyku gereksiniminde azalma. (3) Her zamankinden daha konuşkan olma ya da konuşmaya tutma. (4) Fikir uçuşmaları ya da düşüncelerin sanki yarışıyor gibi birbirlerinin pesi sıra gelmesi yaşantısı. (5) Distraktibilite (dikkat dağınıklığı). (6) Amaca yönelik etkinlikte artma ya da psikomotor ajitasyon. (7) Kötü sonuçlar doğurma olasılığı yüksek, zevk veren etkinliklere aşırı katılma.

C. Bu Epizot sırasında, kişinin semptomatik olmadığı zamanlardakinden çok farklı olarak işlevsellikte belirgin bir değişiklik olur.
D. Duygudurum bozukluğu ve işlevsellikteki değişiklik başkalarının da gözlenebilir düzeydedir.
E. Bu epizot, toplumsal ya da mesleki işlevsellikte belirgin bir bozulmaya yol açacak ya da hastaneye yatırılmayı gerektirecek denli ağır değildir ve psikotik özellikler göstermez.
F. Bu semptomlar bir maddenin ya da genel tıbbi bir durumun doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.

2.1.4.5. Bipolar Bozukluk

Tablo 8. ICD 10'a Göre Bipolar Bozukluğun Alt Tipleri [Dursun, 2008]

1. Bipolar duygulanım bozukluğu, şimdiki nöbet hipomanik: Hasta şimdi hipomaniktir. Geçmişte en az bir defa başka bir duygulanım bozukluğu geçirilmiş olmalıdır (Hipomanik, manik, depresif veya karma).
2. Bipolar duygulanım bozukluğu, psikotik belirtisiz, şimdiki nöbet manik: Hasta şimdi maniktir. Psikotik belirtisizdir. Geçmişte en az bir defa, başka duygulanım bozukluğu geçirmiş olmalıdır (Hipomanik, manik, depresif veya karma).
3. Bipolar duygulanım bozukluğu, psikotik belirtili, şimdiki nöbet manik: Hasta şimdi maniktir. Psikotik belirtilidir. Geçmişte en az bir defa başka duygulanım bozukluğu geçirmiş olmalıdır (Hipomanik, manik, depresif veya karma).
4. Bipolar duygulanım bozukluğu, şimdiki nöbet hafif veya orta şiddetli depresyon: Hasta şimdi depresiftir. Hafif veya orta şiddette nöbetlerden biri depresif nöbet olarak vardır. Geçmişte en az bir defa hipomanik, manik veya karışık duygulanım nöbeti geçirilmiş olduğu kanıtlanmıştır.
5. Bipolar duygulanım bozukluğu, şimdiki nöbet psikotik belirtisiz ağır depresyon: Hasta şimdi depresiftir. Psikotik belirtisiz ciddi depresif nöbet vardır. Geçmişte en az bir defa hipomanik, manik veya karışık duygulanım nöbeti geçirilmiş olduğu kanıtlanmıştır.

6. Bipolar duygulanım bozukluğu, şimdiki nöbet psikotik belirtili ağır depresyon: Hasta şimdi depresiftir. Psikotik belirtili ciddi depresif nöbettir. Geçmişte en az bir defa hipomanik, manik veya karışık duygulanım nöbeti geçirdiği kanıtlanmıştır.
7. Bipolar duygulanım bozukluğu, şimdiki nöbet karışık: Geçmişte hastanın en az bir defa hipomanik, manik, depresif veya karışık duygulanım nöbeti geçirmiş olduğu kanıtlanmıştır. Şimdiki nöbette manik, hipomanik ve depresif belirtiler karışık biçimde, bir arada görülmekte veya birinden diğerine hızlı bir değişim göstermektedir.
8. Bipolar duygulanım bozukluğu, su anda iyilik döneminde: Geçmişte hastanın en az bir defa hipomanik, manik veya karışık duygulanım nöbeti geçirdiği kanıtlanmıştır. En azından bir defa duygulanım nöbeti buna ilave olmuştur (hipomanik, manik, depresif veya karışık). Fakat su anda aylardan beri, anlamlı duygudurum bozukluğunda sıkıntısı yoktur. Koruyucu tedavi esnasında iyileşme döneminin süreleri burada kodlanmalıdır.
9. Bipolar duygudurum bozuklukları, diğer: Bipolar II bozukluk ve yineleyen manik nöbetler.
10. Bipolar duygulanım bozukluğu, tanımlanmamış (DSÖ, 1992:334–335).

Tablo 9. DSM-IV-TR’e Göre Bipolar Bozukluğun Alt Tipleri [Dursun, 2008]

1. Bipolar Bozukluk Tip I Bipolar Bozukluk Tip I, Tek Manik dönem Bipolar Bozukluk Tip I, En son dönem Hipomanik Bipolar Bozukluk Tip I, En son dönem Manik, Bipolar Bozukluk Tip I, En son dönem Mikst Bipolar Bozukluk Tip I, En son dönem Depresif Bipolar Bozukluk Tip I, En son dönem Belirlenmemiş
2. Bipolar Bozukluk Tip II
3. Siklotimik Bozukluk
4. BTA bipolar Bozukluk

2.1.4.6. Bipolar I Bozukluğu

Tablo 10. DSM-IV-TR ve ICD-10'a Göre Bipolar I Bozukluğunun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>BİPOLAR I BOZUKLUĞU</u>
A. En az bir manik ya da karışık tip Epizot vardır.
B. Depresif Epizotlar ya sergilenmiştir ya da ilerde ortaya çıkacakları varsayılmaktadır (ancak bulunmaları tanı için gerekli değildir).
C. Duygudurum Epizotları, şizoaffektif bozukluğa uymamaktadır ve şizofreni, şizofreniform bozukluk ya da delüzyonel bozukluk ya da başka bir yerde sınıflandırılmayan psikotik bozukluk üzerine eklenmemiştir.
D. Belirtiler sosyal, iş ya da diğer önemli alanlarda klinik olarak anlamlı bir rahatsızlık ya da bozulmaya neden olmaktadır.
E. belirtiler bir maddenin ya da genel tıbbi bir hastalığın doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.

2.1.4.7. Bipolar II Bozukluğu

Tablo 11. DSM-IV-TR' ye Göre Bipolar II Bozukluğunun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>BİPOLAR II BOZUKLUĞU</u>
A. En az bir majör depresif epizotun ya da geçirilmiş Epizot öyküsünün varlığı.
B. En az bir hipomanik epizotun ya da geçirilmiş Epizot öyküsünün varlığı.
C. Manik ya da karışık tip bir epizotun geçirilmemiş olması.
D. A ve B ölçütlerindeki duygudurum belirtileri şizoaffektif bozukluğa uymamaktadır ve şizofreni, şizofreniform bozukluk ya da delüzyonel bozukluk ya da başka bir yerde sınıflandırılmayan psikotik bozukluk üzerine eklenmemiştir.
E. Belirtiler sosyal, iş ya da diğer önemli alanlarda klinik olarak anlamlı bir rahatsızlık ya da bozulmaya neden olmaktadır.

2.1.4.8. Siklotimik Bozukluk

Tablo 12. DSM-IV-TR' ye Göre Siklotimik Bozukluğun Tanı Kriterleri [Dursun, 2008]

<u>SİKLOTİMİK BOZUKLUK</u>
A. Hipomanik belirtilerin ve majör depresif Epizot ölçütlerini doldurmayacak kadar hafif depresif belirtilerin, en az iki (çocuk ve ergende en az bir) yıl süreyle, çok sayıda sergilenmiş olması.
B. Bu iki yıl içerisinde, A ölçütlerine uymayan sürekli bir iyilik döneminin iki aydan fazla sürmemesi.
C. İlk iki yıl içerisinde manik, karışık tip ve majör depresif bir epizot ortaya çıkmaması (İlk iki –çocuk ve ergende bir- yıllık böyle bir dönem ardından manik ya da karışık tip bir Epizot tabloya eklenirse, tanı siklotimi ve bipolar I bozukluğa çevrilir. Eğer bu iki yıllık dönem ardından majör depresif bir epizot tabloya eklenirse, tanı siklotimi ve bipolar II bozukluğuna çevrilir).
D. Duygudurum epizotları şizoaftektif bozukluğa uymamaktadır ve şizofreni, sizofreniform bozukluk, delüzyonel bozukluk ya da bir yerde sınıflandırılmayan psikotik bozukluk üzerine eklenmemiştir.
E. Belirtiler bir maddenin ya da genel tıbbi bir hastalığın doğrudan fizyolojik etkilerine bağlı değildir.
F. Belirtiler sosyal, iş ya da diğer önemli alanlarda klinik olarak anlamlı bir rahatsızlık ya da bozulmaya neden olmaktadır.

2.1.4.9. Başka Türü Adlandırılmayan Bipolar Bozukluk

Tablo 13. DSM-IV-TR'ye Göre Başka Türü Adlandırılmayan BPB Sınıflaması [Turhan, 2007]

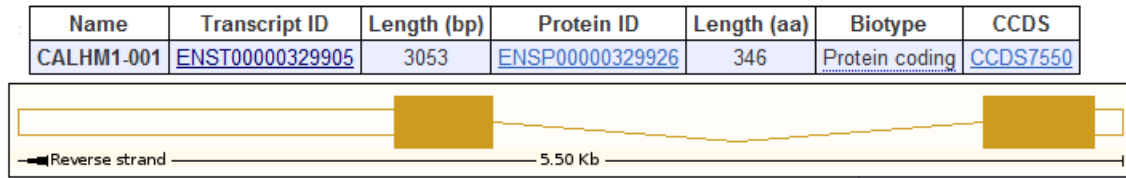
Başka türlü adlandırılmayan BPB kategorisi herhangi bir özgül BPB ölçütlerini karşılamayan, bipolar özelliklere sahip bozuklukları içermektedir. Örnekler aşağıda sıralanmaktadır:
--

1. Manik, hipomanik veya depresif dönem için asgari süre ölçütünü karşılamayan ancak belirti eşiği ölçütünü karşılayan, manik ve depresif belirtiler arasında hızlı değişimler (günlerce).
2. Arada tekrarlayan depresif belirtiler olmaksızın yineleyici hipomanik dönemler.
3. Sanrısız bozukluk, rezidüel şizofreni veya başka türlü adlandırılmayan psikotik bozukluk üzerine binmiş manik veya hipomanik dönem.
4. Kronik depresif belirtilerle birlikte giden, siklotimik bozukluk tanısı için fazla sık gözlenen hipomanik dönemler.
5. Hekimin BPB olduğuna karar verdiği, ancak birincil mani veya genel tıbbi duruma bağlı mı veya madde kullanımının mı yol açtığını belirleyemediği durumlar

2.2. CALHM1 (Kalsiyum Homeostaz Düzenleyici Faktör 1) Geni

2.2.1 CALHM1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi

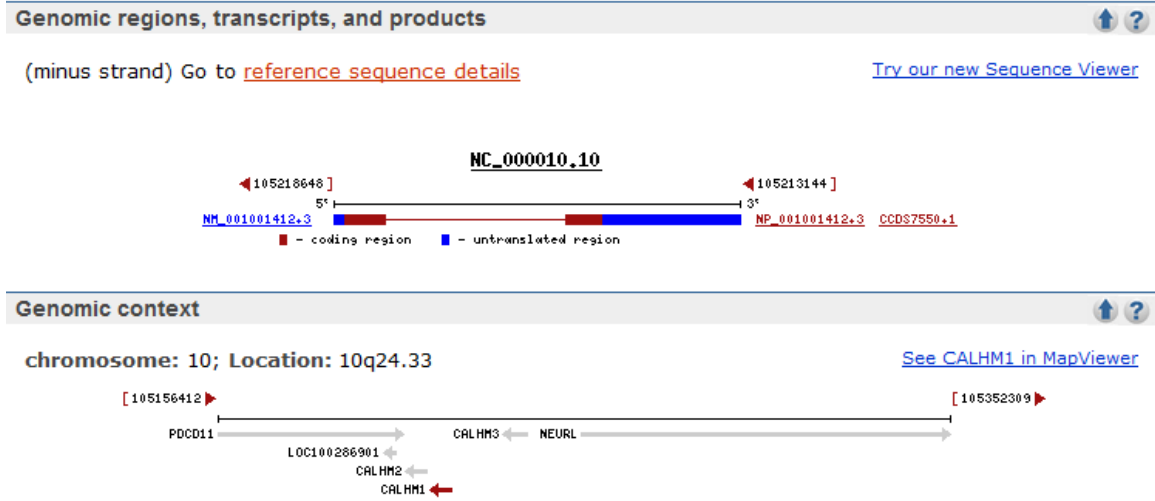
CALHM1 geni ilk olarak 2008 yılında Dreses-Werringloer ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. FAM26C olarak ta bilinir [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255022 2013]. Bu gen şempanze, makak, köpek, inek, fare, sıçan, tavuk ve zebra balığında korunmuş durumdadır [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255022 2013]. 692bp ve 2,3612 bp uzunluğunda iki ekson ve 2,449bp uzunluğunda bir introndan oluşmaktadır. Genin Şekil 2’de görüldüğü gibi bir adet transkripsiyon varyantı vardır.



Şekil 2. CALHM1 geninin transkripsiyon varyantı [www.ensembl.org/ 2013]

Bu genin işlevi amiloid-beta prekürsör proteininin (APP) işlenmesinde rol oynayan serebral Ca^{2+} kanalını kodlamaktır [Dreses-Werringloer, 2008]. CALHM1 geni 10. kromozomun q24.3.3 lokusunda lokalizedir [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255022

2013],[www.omim.org/entry/612234 2013]. Bu lokustaki polimorfizmlerin bazı popülasyonlarda geç başlayan Alzheimer hastalığına yatkınlıkla ilişkili olduğu bilinmektedir [Green, 2008]. CALHM1 geninin lokalizasyonu Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. CALHM1’in 10. Kromozomdaki yerleşimi [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255022 2013]

2.2.2. CALHM1 Proteininin Yapısı ve İşlevi

CALHM1 proteini 40 kD büyüklüğünde voltaj-kapılı fonksiyonel bir kalsiyum iyon kanalıdır [Green, 2008]. FAM26C ailesinin bir üyesidir. Endoplazmik retikulum zarında ve hücre membranında çok-geçişli membran proteini olarak bulunmaktadır [Nacmias, 2010],[Marneros, 2005],[Ma, 2012], [Siebert, 2013]. 346 aminoasitten oluşur. CALHM1 iyon akımı Gd^{3+} , Ruthenium Red, ve Zn^{2+} tarafından inhibe olur. 2-aminoethoxydiphenylborat tarafından kısmen inhibe olur [Ma, 2012]

Nucleotide Sequence (1041 nt):

ATGATGGACAAGTTCCGGATGATCTTCCAGTTCTGTCAGTCCAACCAGGAGTCCTTCATGAATGGCATCT
GTGGCATCATGGCCCTGGCCAGTGGCCAGATGTACTCGGCCTTCGACTTCAACTGCCCCTGCCTGCCGGG
CTACAATGCAGCCTACAGCGCGGGCATCCTGCTGGCGCCACCCCTGGTGCTCTTTCTGCTTGGCCTGGTC
ATGAACAACAACGTGTCCATGCTGGCCGAAGAGTGGAAGCGGCCGCTGGGCCCGGGCCAAAGGACCCCG
CTGTGTTGCGCTACATGTTCTGCTCCATGGCCAGCGCGCCCTCATCGCGCTGTCGTCTGGGTGGCCGT
CACGCTACTCGACGGCAAATGCTTCTCTGTGCTTCTGCACTGCCGTGCCGTGAGCGCACTGGGCAAC
GGCAGCCTGGCACCCGGCCTTCTGCCCCGAGCTCGCCCGCCTGCTGGCCCCGGGTGCCCTGCCCTGAGA
TCTACGATGGCGACTGGCTGTTGGCCGAGAGGTGGCCGTGCGTTACCTCCGCTGCATCTCCAGGCGCT
GGGCTGGTCCTTCGTGCTGCTGACCACTCTGCTGGCATTCTGTGGTGGCTCTGTGCGGCCCTGCTTCACG
CAGGCCGCCTTCTCAAGAGCAAGTACTGGTCCCACTATATCGACATCGAGCGCAAGCTCTTCGACGAGA
CGTGACGAGCAGGCCAAAGCCTTTGCCAAGGTCTGCATCCAGCAGTTCTTCGAGGCCATGAACCATGA
CCTGGAGCTGGGTACACCCACGGGACACTGGCCACGGCCCTGCTTCGCGAGCTGCCCCACGACCCCC
GATGGTGCGGAGGAGGAAAGGGAGAAGCTGCGTGGCATCACGGATCAAGGCACCATGAACAGGCTGCTCA
CGAGCTGGCACAAATGCAAACGCCTCTGCGGCTGGGCCAGGAGGAGCCACCGCTGATGGGCAACGGCTG
GGCTGGGGGTGGGCCCGGCCTCCGCGTAAGGAGGTGGCCACCTACTTCAGCAAAGTGTGA

Translation (346 aa):

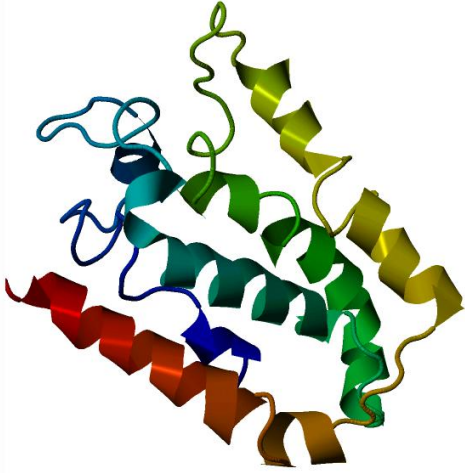
MMDKFRMIFQFLQSNQESFMNGICGIMALASQMYSAFDNFNCPCLPGYNAAYSAGILLAPPLVLFLLGLV
MNNNVSMIAEEWKRLGRRAKDPVLRVMFCSMAQRALIAFVWVAVTLLDGKCFLEAFCTAVPVVSALGN
GSLAPGLPAPELARLLARVPCPEIYDGDWLLAREVAVRYLRCSQALGWSFVLLTLLAFVVRVSRPCFT
QAAFLSKYWSHYIDIERKLFDETCTEHAKAFKVCIQQFFEAMNHDLELGHTHGTLATAPASAAAPTTP
DGAEEEREKLRGITDQGTMRLLTSWHKCKPPLRLGQEEPPLMGNGWAGGGPRPPRKEVATYFSKV

Şekil 4. CALHM1 proteinini kodlayan nükleotid sekansı ve CALHM1 proteininin aminoasit sekansı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi>)

CALHM1'in altbirim yapısı homohekzamerdir [Dreses-Werringloer, 2008],[Siebert, 2013].

Tablo 14. CALHM1 Proteini'nin Potansiyel Domeynleri [www.nextprot.org 2013]

CALHM1 Domainleri	CALHM1 Amino asit Sekansları
Sitoplazmik (Topolojik domain)	>sp Q8IU99 1-17 MMDKFRMIFQFLQSNQE
Helikal (Transmembran bölgesi)	>sp Q8IU99 18-38 SFMNGICGIMALASAQMYSAF
Ekstraselüler (Topolojik domain)	>sp Q8IU99 39-50 DFNCPCLPGYNA
Helikal (Transmembran bölgesi)	>sp Q8IU99 51-71 AYSAGILLAPPLVLFLGLVM
Sitoplazmik (Topolojik domain)	>sp Q8IU99 72-108 NNNVSMLAEWKRPLGRRAKDPAVLRYMFCMAQRAL
Helikal (Transmembran bölgesi)	>sp Q8IU99 109-129 IAPVVWVAVTLLDGKCFLCAF
Ekstraselüler (Topolojik domain)	>sp Q8IU99 130-181 CTAVPVSALGNGSLAPGLPAPELARLLARVPCPEIYDGDWLLAR EVAVRYLR
Helikal (Transmembran bölgesi)	>sp Q8IU99 182-202 CISQALGWSFVLLTTLLAFVV
Sitoplazmik (Topolojik domain)	>sp Q8IU99 203-346 RSVRPCFTQAAFLKSKYWSHYIDIERKLFDCTEHAFAFA KVCIQQFFEAMNHDLELGHTHGTLATAPASAAAPTTDPG AEEEREKLRGITDQGTMRLLTSWHKCKPPLRLGQEEPPL MGNGWAGGGPRPPRKEVATYFSKV



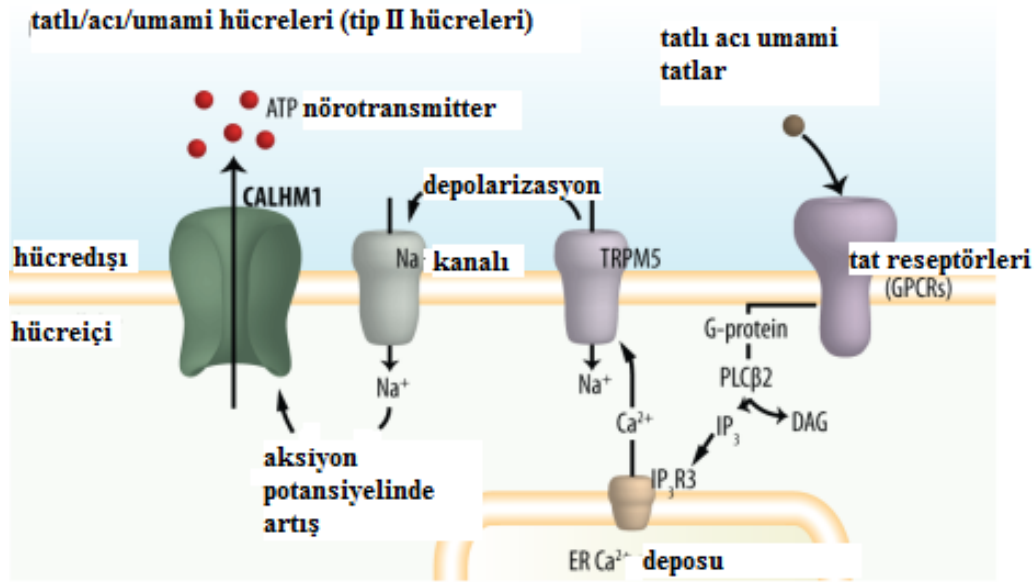
Şekil 5. CALHM1 proteini üç boyutlu yapısı [www.ensembl.org/ 2013]

CALHM1 tüm beyin bölgelerinde ve nöronal hücrelerde eksprese olur [Green, 2008]. Kalsiyumun nöronal iletideki rolü önemlidir ve bipolar bozukluk hastalarında hücre içi kalsiyum düzeyinde değişiklik olduğu saptanmıştır [Işık, 2003],[Goodnick, 2000]. CALHM1 sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu ve kalsiyum iyonu geçirgenliğini düzenlemektir. İyon seçicilik bölgesinde NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörü ile yapısal benzerlik gösterir [Green, 2008] ve Amiloid Prekürsör Proteininin (APP) proteolizisini ve agregatlaşmış amiloid-beta peptitlerinin seviyelerini kalsiyum iyonuna bağımlı olarak kontrol eder [Moreno-Ortega, 2009].

Eski çalışmalar sitozoldeki kalsiyum akışındaki artışın Amiloid Beta (A β) üretimini artırdığını göstermektedir [LaFerla, 2007] fakat CALHM1 aracılığı ile kalsiyum akışı A β üretimini azaltmaktadır. Polimorfik CALHM1 kanalı, bu kanal ile indüklenen kalsiyum geçirgenliğini azaltır, bu da sitozolik kalsiyum seviyesinde azalmaya sebep olduğu gibi çözünmeyen beta-amiloid oluşumunun inhibisyonunu da bozar.

CALHM1 aracılığı ile kalsiyum girişi sıkı kontrol edilen APP prosesi ile ilgili bir akış yolağıdır, diğer sitozolik kalsiyum akış yolları CALHM1'in yaptığını yapamamaktadır [Green, 2008]. Alzheimer hastalığı APP'nin proteolizisi tarafından üretilen agregatlaşmış A-beta peptitlerinden oluşmuş serebral yaşlılık plaklarının varlığı ile karakterizedir. Bu bulgular ışığında bazı çalışmalar ve meta-analizler CALHM1 genindeki varyantlarının, özellikle P86L SNP'nin, kalsiyum geçirgenliğini düşürüp A β üretimini arttırarak geç-başlangıçlı Alzheimer hastalığına yatkınlığı etkilediğini öne sürmüştür [Dreses-Werringloer, 2008],[Gallego-Sandin, 2011],[Dreses-Werringloer, 2013], [Cui P.J, 2010], [Boada, 2010], [Aqdam,

2010],[Shibata, 2010]. Buna rağmen, Alzheimer hastalığı ile olan bu ilişki farklı popülasyonlarla yapılan çalışmalarla desteklenememiştir [Beecham, 2009], [Bertram, 2008], [Minster, 2009], [Slegers, 2009], [Tan, 2011], [Inoue, 2010], [Feher, 2011], [Lambert, 2010].

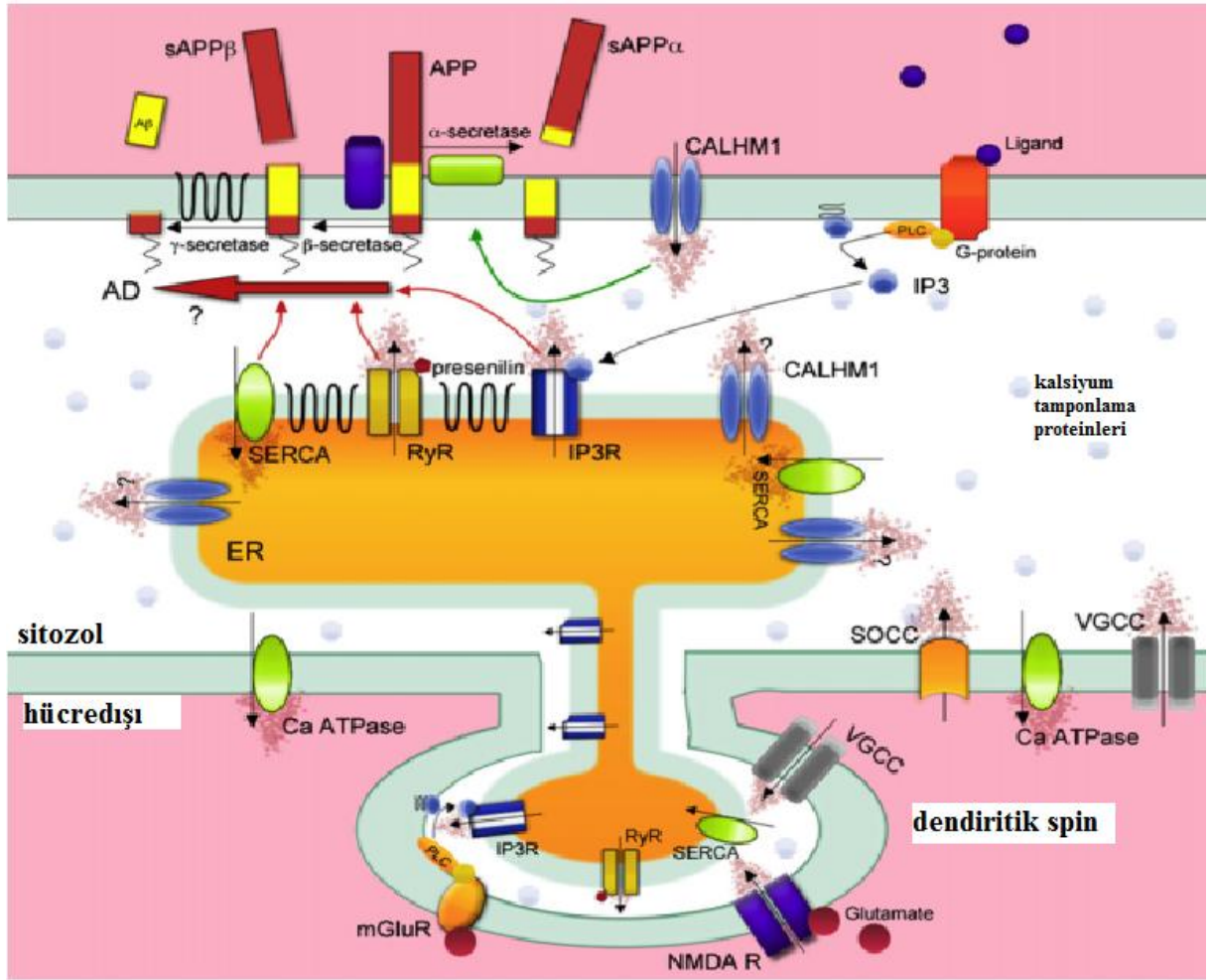


Şekil 6. CALHM1'in tat alma duyusundaki rolü

CALHM1 tatlı acı ve umami tatların algılanması için gerekli olan voltaj-kapılı ATP-salınımı kanalıdır [Taruno, 2013], [Moyer, 2009], [Taruno, 2013]. CALHM1 kanalının, tat alma duyusunda tatlı acı ve umami tatlarını algılayıcı hücrelerden ligand-uyarılmış ATP salınımı için önemli bir yeri vardır. CALHM1 eksikliği tat alma hücrelerinin gelişimi ve bütünlüğüne müdahale etmeden tat alma algısını etkiler. Bunu yaparken tat alma uyarıları ile tat alma hücrelerinde uyarılabilirliği etkilemez.

CALHM1'in ilişkilendirildiği bir diğer hastalık ise sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığıdır [Calero, 2012]. Ayrıca CALHM1'in ERK1 ve ERK2 kaskadında aktivatör olarak rol aldığını gösteren çalışmalar da vardır [Dreses-Werringloer, 2013].

2.2.3. CALHM1 iyon kanalının kalsiyum sinyal yolağındaki rolü



Şekil 7. Kalsiyum sinyal yolağı ve bu yolakta CALHM1'in yeri

Sitozole kalsiyum akışı, plazma membranında, depo ile kontrol edilen kalsiyum kanalları, voltaj-kapılı kalsiyum kanalları, CALHM1 veya iç depolar aracılığı ile meydana gelir ve çok sıkı kontrol edilen bir süreçtir.

ER en büyük hücre içi kalsiyum deposudur, yüksek kalsiyum konsantrasyonuna sahiptir (100–500 mM) bunu SERCA (sarkoendoplazmik retikulum (SR) kalsiyum transport ATPaz) tarafından sitozolik kalsiyumun pompalanması ile yapar. ER'dan sitozole kalsiyum salınımı iki tip kalsiyum kanalı ile sağlanır: IP3Rs ve RyRs. IP3R-aracılıklı salınım spesifik G protein-bağlantılı reseptörlere bağlanan ligand tarafından plazma membranında düzenlenir. Spesifik G protein-bağlantılı reseptörler fosfolipaz C'yi uyararak fosfolipaz C'nin fosfatidilinozitol- 4,5-

bisfosfat'ı diaçilgliserol ve IP3'e ayırmasını sağlar, daha sonra IP3 ER membranında IP3R'e bağlanır. Dendritik ağlar da ER kalsiyum depoları içerir, ER kalsiyum regülasyonu SERCA, IP3Rs ve RyRs tarafından yapılır.

Plazma membranından kalsiyum akışı depolarizasyon sayesinde, Voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla, NMDA reseptörü gibi glutamat reseptörleri aracılığıyla ve metabotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir.

Presenilinler ER membranında lokalize haldedir fakat plazma membranı ve diğer hücre içi lokasyonlarda da bulunur, yabanıl tipi ve FAD-ilişkili mutantları IP3R-aracılıklı kalsiyum salınımını arttırlar. RyR ve SERCA üzerinden kalsiyum regülasyonunu ayarlarlar.

Mutant presenilinler ER'den endojen kalsiyum salınımı bozarlar, bu da kalsiyum depolarında artışa neden olur. Bu sırada Pasif salınım kanalı ile ilgili özelliklere sahip gibi görünen CALHM1 ER'de lokalizedir. APP α -sekretaz tarafından (A β oluşumunu önleme), veya β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından (A β oluşumuna neden olma) işlenir. CALHM1 üzerinden kalsiyum akışı APP 83 amino asidini karboksi terminallerinden ayıran α -sekretaz yolağını iletir ve A β oluşumunu azaltır [Tanzi, 2008].

Literatürde henüz CALHM1 ve bipolar bozukluk arasındaki ilişkiyi araştırmış olan bir yayın yoktur. Ancak Kalsiyumun nöronal iletideki rolünün önemi ve bipolar bozukluk hastalarında hücre içi kalsiyum düzeyinde değişiklik olduğu bilinmektedir. CALHM1 sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu ve kalsiyum iyonu geçirgenliğini düzenlemekte ve tüm beyin bölgelerinde ve nöronal hücrelerde eksprese olmaktadır. CALHM1 iyon seçicilik bölgesinde NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörü ile yapısal benzerlik göstermektedir. NMDA reseptörleri plazma membranından kalsiyum akışına aracılık eder. Bu reseptörlerin bipolar bozukluğun patofizyolojisi ile ilişkili olduğu bilinmektedir [Fountoulakis, 2012]. Bu bilgiler ışığında CALHM1 iyon kanalının bipolar bozuklukla ilişkili olabileceği düşünüldü.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma tanımlayıcı ve deneysel niteliktedir

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı tarafından diğer bir çalışma için Etik Kurul onayı (Ek 2)ve Bilgilendirilmiş Olur Formu (Ek 3) ile toplanmış olan periferik kanlar kullanılmıştır. Tüm laboratuvar çalışmaları ve veri sonuçların değerlendirilmesi D.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Meral Sakızlı'nın laboratuvarında yapılmıştır. Araştırma'da tasarladığımız primer çiftleriyle yürütülen PCR ile elde edilen ürünlerin DNA dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı şeklinde olmuştur.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalında, DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition) bipolar bozukluk tanı kriterlerine uygun olarak tanı konmuş 40 hasta ve 10 hasta yakınından, ekson 1 için olan çalışmada 39 gönüllü kontrol bireyden ekson 2 için olan çalışmada 38 gönüllü kontrol bireyden farklı bir çalışma için çalışmanın amacını ve içeriğini açık bir dille anlatan gönüllü onam formu ile alınmış kanlar kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali olarak bipolar bozukluk hastalarından, bu hastaların yakınlarından ve kontrollerden EDTA'lı (EtilenDiaminTetraAsetikasıit) tüplere alınan 5'er ml kan örnekleri kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmamızın bağımlı değişkeni bipolar bozukluk hastalığıdır. Bağımsız değişkeni CALHM1 gen bölgesindeki analizini yaptığımız SNPler'dir. Kontrol değişkenler ise üç farklı genotiptir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Bilgi toplama

Deneklerin bilgileri Dokuz Eylül Hastanesi Psikiyatri Anabilim Dalı öğretim üyeleriyle temas edilerek sağlanmıştır.

3.6.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 15. Araştırmada kullanılan cihazlar

Cihazın adı	Cihazın markası
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Pikodrop	Picodrop
Santrifüj	Thermo scientific
Yatay elektroforez cihazı ve güç kaynağı	Thermo scientific
Termal cycler	Thechne
Mikro-pipet seti	Eppendorf
Hız ayarlı vorteks	Biocote
-80 buzdolabı	Hettich
-20 buzdolabı	Beko
+4 buzdolabı	Beko

3.6.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Tablo 16. Araştırmada kullanılan sarf malzemeleri

Malzemenin adı	Marka	Lot Numara
Etanol Absolute	RİEDEL-DEHAEN	200-578-6
Primer çiftleri	Alpha DNA	
dNTP Mix 10 mM	Fermentas-Roche	00075005
Taq DNA polimeraz	Fermentas-Roche	101005- 11647679001
10 X Taq polimeraz tamponu	Fermentas-Roche	00073162
MgCl ₂	Fermentas-Roche	00080465
Loding dye	Fermentas	00076700
Sybergreen	İnvitrogen	766065
Agaroz	Sigma-Aldrich	120M0464V
TBE Elektroforez tamponu	Thermo scientific	02241

3.6.4. Araştırmamız Kapsamında Hizmet Alımı

Araştırmamızda PCR ürünlerinin dizi analizi MacroGen (Macorgen Europe Meibergdreef 31 1105 AZ, Amsterdam the Netherland, www.macrogen.com) firmasından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.6.5. Uygulanan Yöntemler

3.6.5.1. Denek Gruplarının Belirlenmesi ve Örnek Alımı:

Çalışmamızın denekleri İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına gelen bireyler arasında ilgili birimin öğretim üyeleri tarafından seçildi. Hasta grubuna DSM-IV tanı kriterlerince bipolar bozukluğa uygun olan, başka herhangi bir sistemik, patolojik ve ruhsal bozukluğu olmayan 40 kişi alındı. Hastaların sağlıklı yakınlarından gönüllü olan toplam 10 kişi de çalışmaya katıldı. Kontrol grubuna herhangi bir belirlenmiş hastalığı olmayan ve DSM-IV tanı kriterlerince

bipolar bozukluğa uygun olmayan ekson 1 çalışması için 39, ekson 2 çalışması için 38 gönüllü alındı.

Çalışmanın amacı çalışmaya katılan her 3 gruptaki kişilere açık dille anlatıldı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma ve uygulama hastanesi yerel etik komitesinin 25.02.2011 tarihinde onay verdiği bilgilendirmiş onam formu ile izinler alındı. Tüm bireylerden DNA izolasyonunda kullanılmak üzere 5 ml periferik kan alındı ve deneysel çalışma yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

3.6.5.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları RTA DNA izolasyon kiti ile yapıldı. Kitin önerdiği DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

Tablo 17. Genomik DNA izolasyon aşamaları

1-mikrosantrifüj tüpüne 100 µl kan konuldu.
2-Tüpün üzerine 95 µl parçalama tamponu ve 5 µl proteinaz k enzimi eklendi.
3-Tüpe kısa vorteks yapıldıktan sonra örnek 20 dakika 55°C’da inkübe edildi.
4-Tüpün üzerine 700 µl genomik liziz tamponu eklenip 2 dakika vortekslendikten sonra toplama tüpüne aktarılıp 10,000 g’de 2 dakika santrifüj yapıldı, alt kısım atıldı.
5-Toplama tüpüne 200 µl DNA-önyıkama tamponu konuldu 10,000 g’de 2 dakika santrifüjlendi.
6-400 µl g-DNA yıkama tamponu eklendi ve 10,000 g’de 2 dakika santrifüjlendi.
7-Örnek yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 100 µl DNA’yı yıkayarak bulunduğu yüzeyden ayıran tampon eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8-Tüpler 14,000g’de 2 dakika santrifüjlendi, kolonlar tüpün üzerinden ayrıldı. Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki DNA -20c’de saklandı.

3.6.5.3. Genomik DNA' nın Saflığının ve Miktarının Ölçülmesi

260nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) değeri ile solüsyonun (50 g/ml) çift iplikli DNA içerdiği kabul edildi. 260nm'deki OD değeri kullanılarak örneklerin konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

İyi saflaştırılmış DNA'nın OD260/OD280 değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol ve protein bulunursa OD260/OD280 değeri 1,8'den küçük olacaktır. OD260/OD280 değeri 2'den büyükse RNA bulaşı olduğu anlamına gelmektedir.

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

3.6.5.4. Genomik DNA' nın Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyonu ile elde edilen genomik DNA' nın intakt olup olmadığı DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi ile belirlenmiştir.

3.6.5.5. CALHM1 Gen Dizisinin Veri tabanlarından Tespiti

CALHM1 gen sekansı www.ensembl.org adresinden elde edildi.

3.6.5.6. Oligonükleotidler (Primerler)' in Tasarlanması

CALHM1 geninin iki eksonu vardır. Araştırmamız için önemli olan bölgeler protein kodlayan bölgeler olduğu için primer dizaynımız bu bölgeleri kapsayacak şekilde yapıldı [Rozen, 2000].

CALHM1'in sekansı, primerlerin oturduğu bölgeler, protein kodlayan bölge EK 1'de verilmiştir.

Dizayn edilen primerlerin sekansları aşağıda verilmiştir.

1 nolu primer çifti:

>chr10:105217906-105218705 800bp

(ileri) F;ATCTGCATCCTCTCAGCCAG

(geri) R;ACCTTGATCTGCCAGGGAGA

2 nolu primer çifti:

>chr10:105214901-105215574 674bp

(ileri) F;GCTTTGGGAGTCTGAACAGG

(geri) R;TGGATCTGCCTAGGGGAGTA

3.6.5.7. Oligonükleotidler (Primerler)' in Hazırlanması

Liyofilize halde gelen primerler gerekli hesaplamalar yapılarak saf su ile 10pmol'e seyreltildi. Alikatlanıp -20^o C'de saklandı

3.6.5.8. PCR İçin Reaksiyon Koşulları ve Optimizasyon Deneyleri

Primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığının standardizasyonu için gradiyent PCR cihazı kullanıldı. Belli iki sıcaklık arasında kademeli olarak artan sıcaklık gradienti kuruldu. Bu yöntemle primerlerin bağlanma sıcaklıkları optimize edilmiş oldu. MgCl₂ gradiyenti için MgCl₂ konsantrasyonu 1mM, 1,5mM, 2mM, 2,5mM, 3mM şeklinde kademeli olarak arttırılarak optimum konsantrasyon bulundu. PCR işleminin optimum koşulları saptanarak tüm örneklerle aynı PCR koşulları uygulandı.

Tablo 18. CALHM1 Geninin 1. Ekson'u için 'Termal Cykler' PCR Basamakları

CALHM1 GENİNİN 1. EKSONU İÇİN 'TERMAL CYCLER' PCR BASAMAKLARI	SICAKLIK (DERECE) / SÜRE (DAKİKA)
Başlangıç Denatürasyonu	95°C /4dk
Denatürasyon	95°C /30s
Bağlanma	60°C /30s
Uzama	72°C /1dk
Sonlanma Uzaması	72°C /7dk
Bekleme	+4°C/sonsuz
Devir	35

Tablo 19. CALHM1 Geninin 2. Ekson'u İçin Termal Cyclers PCR Basamakları

CALHM1 GENİNİN 2. EKSONU İÇİN TERMAL CYCLER PCR BASAMAKLARI	SICAKLIK (DERECE) / SÜRE (DAKİKA)
Başlangıç Denatürasyonu	95°C /4dk
Denatürasyon	95°C /30s
Bağlanma	59°C /45s
Uzama	72°C /1dk
Sonlanma Uzaması	72°C /7dk
Devir	35

Tablo 20. Ekson 1 İçin Optimize Edilmiş PCR Komponentleri

PCR komponentleri	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	50 µl reaksiyondaki madde miktarı (µl)	10X reaksiyon (µl)
H ₂ O(Nükleaz içermeyen, steril)	-----	-----	20,5	205
Taq tamponu	10X	1X	5	50.0
MgCl ₂	25 mM	3mM	6	60
10mM dNTP karışımı	10mM	0,1 mM	0,5	5,0
İleri primer	10pmol/ µl	0.2pmol/ µl	1.0	10.0
Geri primer	10pmol/ µl	0.2pmol/ µl	1.0	10.0
Taq polimeraz enzimi	1U/ µl	1,0U/50 µl	1,0	10.0
DNA Kalıbı	10ng/ µl	3ng/ µl	15	15x10

Tablo 21. Ekson 2 İçin Optimize Edilmiş PCR Komponentleri

PCR komponentleri	Stok Konsantrasyonu	Son konsantrasyon	50 µl reaksiyonda ki madde miktarı (µl)	10X reaksiyon (µl)
H ₂ O(Nükleaz içermeyen, steril)	-----	-----	29,5	295
Taq tamponu	10X	1X	5	50.0
MgCl ₂	25 mM	1,5mM	3	30
10mM dNTP karışımı	10mM	0,1 mM	0,5	5,0
İleri primer	10pmol/ µl	0.1pmol/ µl	0,5	5.0
Geri primer	10pmol/ µl	0.1 pmol/ µl	0,5	5.0
Taq polimeraz enzimi	1U/ µl	1,0U/50 µl	1,0	10.0
DNA Kalıbı	10ng/ µl	2ng/ µl	10	10x10

3.6.5.9. PCR Optimizasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz Jelin Hazırlanması:

PCR ürünleri 674bp ve 800bp uzunluğunda olduğu için jelin konsantrasyonu %1,5 olarak ayarlandı. 100ml jel için gereken malzemeler:

-1,5 gr agaroz

-100ml 0,5XTBE tamponu

-4µl Syber Green

Jelin hazırlanışı: 100ml'lik erlene 1,5gr agaroz kondu. Üzerine 100ml'ye kadar 0,5XTBE eklendi. Mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun tampon içerisinde çözünmesi sağlandı. Jel mikrodalgadan çıkarılarak el yakmayacak sıcaklığa gelene kadar soğutuldu. Daha sonra içerisine 4µl Syber Green eklendi ve çalkalandı. Hazırlanan jel yatay jel yatağına döküldü ve jele kuyucuklar açmak için tarak yerleştirildi. Jel oda sıcaklığında donmaya bırakıldı. Taraklar çıkarıldıktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezine Yüklenmesi ve Yürütülmesi: Elektroforez tankına jel yerleştirildikten sonra jeli tamamen kaplayacak kadar 0,5XTBE tamponu tanka döküldü. 5µl PCR ürünü 1µl yükleme tamponu ile karıştırıldı ve pipet yardımı ile

kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa ise DNA Marker eklendi. Daha sonra elektroforez işlemi 80V-25mA de 1 saat çalıştırıldı.

3.6.5.10. PCR Ürünlerini Kontrolü ve Görüntülenmesi

Elektroforezde PCR ürünlerinin yürütülme işlemi bittikten sonra jel tanktan dikkatlice çıkarıldı. Transillüminatör yardımı ile UV ışık altında bantlar görüldü. Bantların boyutları ve yoğunlukları DNA Marker ile kıyaslandı. Non-spesifik bantların var olup olmadığına bakıldı. Bant yoğunlukları yeterli olan ve non-spesifik bant içermeyen örnekler DNA dizi analizine uygun bulunarak -20C⁰ de saklandı.

3.6.5.11. DNA Dizi Analizi ve Hazırlık Aşamaları

PCR örneklerinin DNA dizi analizi MacroGen (www.macrogen.com) firmasından hizmet alımı şeklinde yapıldı. Her örnek için ileri primerlerle dizi analizi yapıldı. Her bir örnek başına 2µl primer(10pmol/µl) ve PCR örnekleri paketlenerek firmaya gönderildi. MacroGen’de öncelikle PCR ürünleri saflaştırıldı, daha sonra bu PCR ürünleriyle ileri primerler kullanılarak tek iplik kalıp olarak alınıp bu iplik üzerinden normal deoksiniükleotidlerin yanında her tüpte farklı floresan işaretli dideoksiniükleotidlerin kullanıldığı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 4 farklı tüpte oluşan PCR ürünlerinin 3’ uçları o tüpte yer alan floresan işaretli dideoksiniükleotid ile sonlanmaktadır. Farklı uzunluktaki PCR ürünleri aynı jele yüklenip kapillerde yürütüldü bu sırada PCR ürünleri boyutlarına göre kapiller boruda sıralandı. En kısa olan PCR ürünü kapillerde en hızlı yol alan olup en önde yer aldı. Lazer ışığı altında optik sensörlerin okuduğu pikler ilk olarak en kısa PCR ürününün 3’ ucundaki floresan işareti okudu. Sıra ile okunan floresan işaretler pikler halinde bize DNA dizisini verdi. Bu pikler bilgisayar ortamına aktarıldı. Sonuçlar firmanın web sitesinden şifre ile indirildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 22. Araştırmanın Planı ve Takvimi

İş Paketi Ad Tanımı	1 . a y	2 . a y	3 . a y	4 . a y	5 . a y	6 . a y	7 . a y	8 . a y	9 . a y	10 . a y	11 . a y	12 . a y	13 . a y	14 . a y	15 . a y	16 . a y	17 . a y	18 . a y	19 . a y	20 . a y	21 . a y	22 . a y	23 . a y	24 . a y	25 . a y	
Hasta, Hasta Yakını ve Kontrol Kanlarının Toplanması																										
DNA izolasyonları, Kalite ve Miktar Tayini																										
PCR Primerlerinin Tasarımı, Temini ve PCR süreci																										
PCR Ürünlerinin Yürütülmesi, Görüntülenmesi, Sekans Hazırlığı																										
Sekanslama ve Yorumlama																										
Sonuçların Değerlendirilmesi																										

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. DNA Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi

Macrogen'den alınan DNA dizi analizi sonuçları CALHM1 geninin NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da tanımlanan dizisi referans alınarak değerlendirildi. Tüm sekans sonuçları BLAST Analizi yapılarak sonuçların CALHM1 genine ait olduğu doğrulandı. Daha sonra bu dizilerde Mutation Surveyor V4.0.9 programı yardımı ile homozigot ve heterozigot mutasyon/SNP'ler belirlendi.

Bulunan verilerin doğruluğu gözle tarama yolu ile de incelendi.

3.8.2. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiği internet üzerinden SHESİS programı kullanılarak yapıldı [Shi, 2005].

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

CALHM1 proteininin Bipolar bozukluk hastalarında beyin dokusunda ekspresyon düzeylerine bakılması ekspresyon değişiklikleri açısından değerli bir çalışma olurdu. Daha fazla hasta kontrol ve akraba örneği ile çalışılabilirdi, böylece bu araştırma popülasyonu daha iyi yansıtabilirdi.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmış no:2012/05-11 tarih: 25.02.2011 etik kurul onayı ile çalışma başlatılmıştır. (Ek 2)

4. BULGULAR

4.1 Çalışma gruplarının oluşturulması

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

Tablo 23. Çalışmanın Sağlıklı Kontrol Bireylerine Ait Kodlar ve Bireylerin Cinsiyetleri

doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE
BG 226	Kadın	BG 255	kadın	BG 291	erkek	BG 321	kadın	BG 340	kadın
BG 230	Erkek	BG 262	kadın	BG 294	kadın	BG 322	kadın	BG 350	erkek
BG 237	Kadın	BG 266	kadın	BG 302	erkek	BG 330	erkek	BG 406	kadın
BG 238	Kadın	BG 275	erkek	BG 306	erkek	BG 331	kadın	BG 407	erkek
BG 240	kadın	BG 276	erkek	BG 310	erkek	BG 334	kadın	BG 429	erkek
BG 241	kadın	BG 283	kadın	BG 311	kadın	BG 335	kadın	BG 437	erkek
BG 251	kadın	BG 286	erkek	BG 315	erkek	BG 336	kadın	BG 447	kadın
BG 253	kadın	BG 290	kadın	BG 319	kadın	BG 337	kadın	BG 449	kadın

Tablo 24. Çalışmanın Bipolar Bozukluk Hastalarına Ait Kodlar ve Hastaların Cinsiyetleri

doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE	doK	nıdaK/kekrE
BG 6	kadın ötimi	BG 36	erkek ötimi	BG 92	kadın ötimi	BG 203	erkek ötimi	BG 288	erkek depresyon
BG 8	kadın ötimi	BG 40	erkek ötimi	BG 96	kadın ötimi	BG 210	erkek ötimi	BG 289	kadın ötimi
BG 15	erkek ötimi	BG 54	erkek ötimi	BG 146	erkek	BG 224	kadın ötimi	BG 292	erkek depresyon
BG 22	kadın ötimi	BG 56	kadın ötimi	BG 187	erkek depresyon	BG 252	kadın mani	BG 293	kadın ötimi
BG	kadın	BG	kadın	BG	erkek mani	BG	kadın	BG	kadın

23	ötimi	57	ötimi	191		257	ötimi	300	ötimi
BG	kadın	BG	kadın	BG	kadın mani	BG	erkek	BG	kadın
25	ötimi	59	ötimi	192		258	mani	309	depresyon
BG	kadın	BG	erkek	BG	kadın mani	BG	erkek	BG	erkek
28	ötimi	73	ötimi	194		267	ötimi	418	depresyon
BG	erkek	BG	erkek	BG	kadın mani	BG	erkek	BG	kadın
34	ötimi	87	ötimi	200		270	ötimi	428	depresyon

Tablo 25. Çalışmanın Birinci Derece Akraba Bireylerine Ait Kodlar ve Bireylerin Cinsiyetleri

doK	akrabalık ilişkisi	doK	akrabalık ilişkisi	doK	akrabalık ilişkisi	doK	akrabalık ilişkisi	doK	akrabalık ilişkisi
BG	baba	BG	baba	BG	kız kardeş	BG	kız kardeş	BG	erkek
16		37		55		60		88	kardeş
BG	anne	BG	oğlu	BG	kızı	BG	kızı	BG	Anne
24		41		58		74		204	

4.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonuna Ait Bulgular

Hasta, kontrol ve akrabalarından alınan ve EDTA'lı tüplerde -20C⁰'de saklanan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflığı pikodrop ile ölçüldü. Bu DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde de yürütülerek intakt olup olmadığı gözlemlendi.



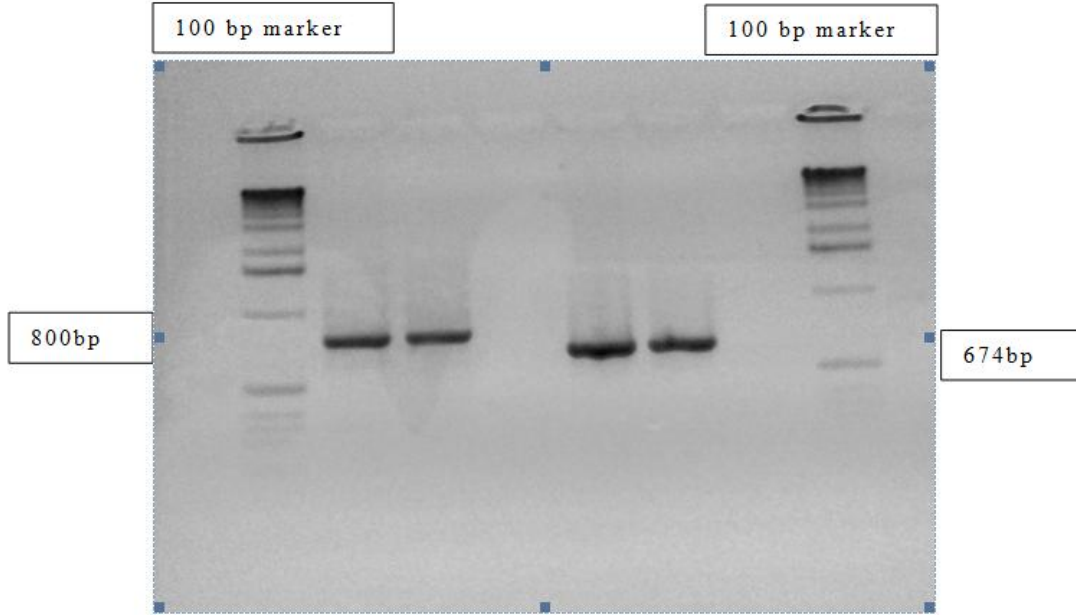
Şekil 8. DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Tablo 26. DNA Örneklerinin Pikodrop Ölçüm Değerleri

doK	Kons antra syon ng/ μ L	A26 0/A 280	doK	Kons antra syon ng/ μ L	A26 0/A 280	doK	Kons antra syon ng/ μ L	A26 0/A 280	doK	Kons antra syon ng/ μ L	A26 0/A 280	doK	Kons antra syon ng/ μ L	A26 0/A 280
BG 226	14, 9	2.5 84	BG 255	23, 6	2.1 97	BG 291	22, 8	3.0 48	BG 321	66, 9	2.3 51	BG 340	305 ,9	2.2 53
BG 230	17, 8	1.7 81	BG 262	11, 2	2.2 39	BG 294	3,8	1.2 62	BG 322	223 ,3	1.5 91	BG 350	280 ,3	1.7 21
BG 237	88, 0	1.5 51	BG 266	94, 6	1.6 28	BG 302	188 ,3	1.0 67	BG 330	208 ,6	1.5 16	BG 406	220 ,8	1.6 97
BG 238	75, 4	1.6 17	BG 275	40, 2	1.7 05	BG 306	39, 4	1.1 66	BG 331	220 ,0	1.6 44	BG 407	209 ,6	1.5 41
BG 240	51, 5	1.4 83	BG 276	10, 9	2.7 38	BG 310	157 ,6	1.4 8	BG 334	215 ,7	1.5 45	BG 429	181 ,8	1.5 97
BG 241	72, 1	1.5 03	BG 283	67, 5	2.7 92	BG 311	157 ,4	5.3 84	BG 335	324 ,0	2.7 14	BG 437	154 ,4	1.5 7
BG 251	55, 1	1.6 35	BG 286	53, 2	1.5 83	BG 315	135 ,5	2.6 9	BG 336	134 ,2	1.6 46	BG 447	137 ,0	1.7 3
BG 253	24, 5	1.9 72	BG 290	86, 8	1.5 56	BG 319	260 ,0	1.7 3	BG 337	305 ,4	2.4 44	BG 449	24, 6	2.0 51
BG 6	33, 1	1.8 77	BG 36	71, 1	3.4 88	BG 92	22, 2	1.6 84	BG 203	25, 0	2.0 18	BG 288	14, 7	1.5 8
BG 8	32, 4	2.2 49	BG 40	54, 9	2.9 84	BG 96	24, 5	2.0 67	BG 210	14, 6	1.8 87	BG 289	5,2	2.7 92
BG 15	92, 8	1.3 33	BG 54	46, 5	4.4 22	BG 146	35, 7	2.0 34	BG 224	23, 8	1.7 85	BG 292	0,3	0.1 01
BG 22	17, 7	1.7 68	BG 56	136 ,3	3.7 56	BG 187	13, 7	4.1 21	BG 252	27, 8	3.5 89	BG 293	25, 0	2.0 45
BG 23	21, 1	1.8 87	BG 57	64, 2	2.3 98	BG 191	40, 7	4.4 61	BG 257	3,2 6,0	1 300	BG 300	17, 8	2.1 51
BG 25	63, 9	1.7 62	BG 59	53, 9	2.3 8	BG 192	12, 7	106 ,34	BG 258	33, 7	1.6 65	BG 309	13, 4	3.0 85
BG 28	44, 1	2.0 23	BG 73	22, 0	1.7 14	BG 194	25, 2	2.1 9	BG 267	16, 7	2.2 52	BG 418	21, 9	3.2 58
BG 34	61, 5	2.2 14	BG 87	35, 5	1.8 7	BG 200	11, 0	3.1 23	BG 270	14, 5	2.8 04	BG 428	20, 9	2.4 08
BG 16	42, 9	2.0 04	BG 37	16, 6	1.8 54	BG 55	36, 7	2.2 72	BG 60	31, 2	1.8 97	BG 88	35, 2	1.9 49
BG 24	30, 6	1.8 66	BG 41	10, 4	2.6 09	BG 58	35, 9	2.2 74	BG 74	28, 3	1.9 14	BG 204	34, 9	1.9 72

4.3. PCR Optimizasyon Deneylerine İlişkin Bulgular

PCR optimizasyonu yapıldı. Optimize olan PCR koşulları ile çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 9. CALHM1 geninin 1. (800bp) ve 2. eksonuna (674bp) ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

4.4. DNA Dizi Analizi Verilerine Ait Bulgular

PCR ürünleri DNA dizi analizi için hizmet alımı yaptığımız MacroGen firmasına gönderildi (www.macrogen.com). Sonuçlar MacroGen'in web sitesinden şifre ile bilgisayara indirildi. Bu sonuçlar Mutation Surveyor V4.0.9 da analiz edildi. Bulunan mutasyon/SNP'ler gözle bakılarak da incelendi.

4.5. Ayrıntılarıyla Hasta, Kontrol ve Akraba Grubundaki Bireylerin CALHM1 geninde saptanan SNP'ler

Çalışmamızda CALHM1 geninde toplam 15 SNP saptandı. Bu SNP'lerden 11 tanesi 1. Ekson'da dört tanesi 2. Ekson'da gözlemlendi. 1. Ekson'daki 11 SNP'in üç tanesi daha önce saptanmış sekiz tanesi ise ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. 2. Ekson'daki dört SNP'in üç tanesi daha önce saptanmış biri ise ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. Bulunan SNP'lerin bipolar bozukluk hastalarında, sağlıklı gönüllü grubunda ve birinci derece akraba grubunda homozigot ve heterozigot dağılımı aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 27. CALHM1 Geninin 1. ve 2. Eksonu'ndaki SNP'ler, bu SNP'lerin Hasta, Kontrol ve Akraba Grubunda Homozigot ve Heterozigot Dağılımı.

EKSON 1 SNP'LERİ		HOMOZİGOT REFERANS GENOTİPİNİN BULUNDUĞU KİŞİ SAYISI	HETEROZİGOT OLARAK SNP'İ TAŞIYAN KİŞİ SAYISI	HOMOZİGOT OLARAK SNP'İ TAŞIYAN KİŞİ SAYISI
rs2986018	KONTROL	27	9	3
	HASTA	24	13	3
	AKRABA	3	5	2
rs4918016	KONTROL	18	15	6
	HASTA	21	13	6
	AKRABA	5	5	0
rs2986017	KONTROL	27	9	3
	HASTA	23	14	3
	AKRABA	3	4	3
360G>GA	KONTROL	39	0	0
	HASTA	36	4	0
	AKRABA	10	0	0
362G>GA	KONTROL	30	9	0
	HASTA	30	10	0
	AKRABA	10	0	0
389G>GA	KONTROL	38	1	0
	HASTA	34	6	0
	AKRABA	10	0	0
661T>TA	KONTROL	38	1	0
	HASTA	35	3	2
	AKRABA	10	0	0
126C>CA	KONTROL	37	2	0
	HASTA	35	5	0

	AKRABA	10	0	0
529C>CA	KONTROL	37	2	0
	HASTA	38	2	0
	AKRABA	10	0	0
449C>CA	KONTROL	35	4	0
	HASTA	38	2	0
	AKRABA	10	0	0
457C>CA	KONTROL	36	3	0
	HASTA	37	3	0
	AKRABA	10	0	0
EKSON 2 SNP'LERİ		HOMOZİGOT REFERANS GENOTİPİNİN BULUNDUĞU KİŞİ SAYISI	HETEROZİGOT OLARAK SNP'İ TAŞIYAN KİŞİ SAYISI	HOMOZİGOT OLARAK SNP'İ TAŞIYAN KİŞİ SAYISI
rs41287502	KONTROL	38	0	0
	HASTA	39	1	0
	AKRABA	9	1	0
rs2986016	KONTROL	25	10	3
	HASTA	25	13	2
	AKRABA	4	4	2
rs729211	KONTROL	17	15	6
	HASTA	19	16	5
	AKRABA	6	4	0
3555G>GA	KONTROL	38	0	0
	HASTA	39	1	0
	AKRABA	9	1	0

4.6. İstatistiki Değerlendirmeler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

SNP'lerin hasta ve kontrol grubunda dağılımına ilişkin bilgiler 'online' olarak kullanılabilen SHESIS programına girildi ve aşağıdaki veriler elde edildi.

Tablo 28. Hasta ve Kontrol Grubunda CALHM1 Geninde Bulunan SNP'lerin Allel ve Genotip Frekansları ve Bipolar Bozuklukla Olan İlişki Analizlerinin Sonucu.

Ekson 1 SNP'leri	Minör allel	¹ MAF Bipolar bozuklu grup	MAF Sağlıklı Grup	Majör allel	P value	Olasılıklar oranı	² L95	³ U95	Allel Sayısı	Genotip sayısı
rs2986018	A	0.237	0.192	G	0.49	1.30	0.6099	2.8058	B 19(A)/61(G)	B 3(A/A)/ 13(A/G)/

										24(G/G)
									K 15(A)/63(G)	K 3(A/A)/ 9(A/G)/ 27(G/G)
									A 9(A)/ 11(G)	A 2(A/A)/ 5(A/G)/ 3(G/G)
rs4918016	A	0.312	0.346	G	0.65	0.86	0.4419	1.6681	B 25(A)/55(G)	B 6(A/A)/ 13(A/G)/ 21(G/G)
									K 27(A)/51(G)	K 2(A/A)/ 5(A/G)/ 3(G/G)
									A 5(A)/15(G)	A 0(A/A)/ 5(A/G)/ 5(G/G)
rs2986017	T	0.250	0.192	C	0.38	0.71	0.3350	1.5229	B 60(C)/20(T)	B 23(C/C)/ 14(C/T)/ 3(T/T)
									K 63(C)/15(T)	K 23(C/C)/ 14(C/T)/ 3(T/T)
									A 60(C)/20(T)	A 27(C/C)/ 9(C/T)/ 3(T/T)
360G>GA	A	0.050	0.000	G	-0.04-	-----	-----	-----	B 4(A)/76(G)	B 4(A/G)/ 36(G/G)/ 0(A/A)
									K 0(A)/78(G)	K 0(A/G)/ 39(G/G)/ 0(A/A)
									A 0(A)/20(G)	A 0(A/G)/ 10(G/G)/ 0(A/A)
362G>GA	A	0.125	0.115	G	0.85	1.09	0.4193	2.8603	B 10(A)/70(G)	B 10(A/G)/

										30(G/G)/ 0(A/A)
									K 9(A)/69(G)	K 9(A/G)/ 30(G/G)/ 0(A/A)
									A 0(A)/20(G)	A 0(A/G)/ 10(G/G)/ 0(A/A)
389G>GA	A	0.075	0.013	G	0.06	6.24	0.7338	53.1145	B 6(A)/74(G)	B 6(A/G)/ 34(G/G)/ 0(A/A)
									K 1(A)/77(G)	K 1(A/G)/ 38(G/G)/ 0(A/A)
									A 0(A)/20(G)	A 0(A/G)/ 10(G/G)/ 0(A/A)
661T>TA	A	0.087	0.013	T	-0.03-	7.38	0.8865	61.4919	B 7(A)/73(T)	B 3(A/T)/ 35(T/T)/ 2(A/A)
									K 1(A)/77(T)	K 3(A/T)/ 35(T/T)/ 0(A/A)
									A 0(A)/20(T)	A 0(A/T)/ 10(T/T)/ 0(A/A)
126C>CA	A	0.062	0.026	C	0.26	2.53	0.4766	13.4655	B 5(A)/75(C)	B 0(A/A)/ 5(C/A)/ 35(C/C)
									K 2(A)/76(C)	K 0(A/A)/ 2(C/A)/ 37(C/C)
									A 0(A)/20(C)	A 0(A/A)/ 0(C/A)/ 10(C/C)
529C>CA	A	0.025	0.026	C	0.97	0.97	0.1338	7.0945	B 2(A)/78(C)	B 0(A/A)/

										2(C/A)/ 38(C/C)
									K 2(A)/76(C)	K 0(A/A)/ 2(C/A)/ 37(C/C)
									A 0(A)/20(C)	A 0(A/A)/ 0(C/A)/ 10(C/C)
449C>CA	A	0.025	0.051	C	0.39	0.47	0.0843	2.6675	B 2(A)/78(C)	B 0(A/A)/ 2(C/A)/ 38(C/C)
									K 4(A)/74(C)	K 0(A/A)/ 4(C/A)/ 35(C/C)
									A 0(A)/20(C)	A 0(A/A)/ 0(C/A)/ 10(C/C)
457C>CA	A	0.037	0.963	C	0.97	0.9740	0.1905	4.9793	B 3(A)/77(C)	B 0(A/A)/ 3(C/A)/ 37(C/C)
									K 3(A)/75(C)	K 0(A/A)/ 3(C/A)/ 36(C/C)
									A 0(A)/20(C)	A 0(A/A)/ 0(C/A)/ 10(C/C)
Ekson 2 SNP'leri	Minör allel	MAF Bipolar bozuklu grup	MAF Sağlıklı Grup	Majör allel	P value	Olasılıklar oranı	L95	U95	Allel sayısı	Genotip sayısı
rs41287502	T	0.013	0.000	G	0.33	-----	-----	-----	B 79(G)/1(T)	B 39(G/G)/ 1(G/T)/ 0(T/T)
									K 76(G)/0(T)	K 39(G/G)/ 1(G/T)/ 0(T/T)
									A	A

									19(G)/1(T)	9(G/G)/ 1(G/T)/ 0(T/T)
rs2986016	T	0.212	0.211	C	0.97	0.9882	0.4581	2.1318	B 63(C)/17(T)	B 25(C/C)/ 13(C/T)/ 2(T/T)
									K 60(C)/16(T)	K 25(C/C)/ 10(C/T)/ 3(T/T)
									A 12(C)/8(T)	A 4(C/C)/ 4(C/T)/ 2(T/T)
rs729211	G	0.325	0.355	A	0.69	1.1444	0.5897	2.2209	B 74(A)/26(G)	B 16(A/G)/ 5(G/G)/ 19(A/A)
									K 49(A)/27(G)	K 15(A/G)/ 6(G/G)/ 17(A/A)
									A 16(A)/4(G)	A 4(A/G)/ 0(G/G)/ 6(A/A)
3555G>GA	A	0.013	0.988	G	0.33	-----	-----	-----	B 1(A)/79(G)	B 1(A/G)/ 39(G/G)/ 0(A/A)
									K 0(A)/76(G)	K 0(A/G)/ 38(G/G)/ 0(A/A)
									A 1(A)/19(G)	A 1(A/G)/ 9(G/G)/ 0(A/A)

¹MAF: Minör Allel Frekansı

²L95: Lower 95% confidence interval (Alt %95 Güven Aralığı)

³U95: Upper 95% confidence interval (Üst %95 Güven Aralığı)

Tablo 29. Çalışma Grubundaki SNP'lerin Hardy-Weinberg Dağılımları

SNP kodları	Hardy-Weinberg Denge Testi
rs2986018	Hasta grubu için: $\chi^2=0.421684$, $df=1$, Fisher p:0.516128, Pearson p:0.516116 Kontrol grubu için: $\chi^2=2.578775$, $df=1$, Fisher p:0.108369, Pearson p:0.108301
rs4918016	Hasta grubu için: $\chi^2=2.374347$, $df=1$, Fisher p:0.123406, Pearson p:0.123335 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.881328$, $df=1$, Fisher p:0.347884, Pearson p:0.347830
rs2986017	Hasta grubu için: $\chi^2=0.177778$, $df=1$, Fisher p:0.673308, Pearson p:0.673309 Kontrol grubu için: $\chi^2=2.578775$, $df=1$, Fisher p:0.108369, Pearson p:0.108301
360G>GA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.110803$, $df=1$, Fisher p:0.739245, Pearson p:0.739240 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.000000$, $df=1$, Fisher p:1.000000, Pearson p:1.000000
362G>GA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.816327$, $df=1$, Fisher p:0.366300, Pearson p:0.366251 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.663516$, $df=1$, Fisher p:0.415360, Pearson p:0.415325
389G>GA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.262966$, $df=1$, Fisher p:0.608113, Pearson p:0.608113 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.006578$, $df=1$, Fisher p:0.935363, Pearson p:0.935339
-661T>TA-	Hasta grubu için: $\chi^2=11.250110$, $df=1$, Fisher p:0.000802, Pearson p:0.000801 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.006578$, $df=1$, Fisher p:0.935363, Pearson p:0.935339
126C>CA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.177778$, $df=1$, Fisher p:0.673308, Pearson p:0.673309 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.027008$, $df=1$, Fisher p:0.869469, Pearson p:0.869445
529C>CA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.026298$, $df=1$, Fisher p:0.871180, Pearson p:0.871156 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.027008$, $df=1$, Fisher p:0.869469, Pearson p:0.869445
449C>CA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.026298$, $df=1$, Fisher p:0.871180, Pearson p:0.871156 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.113952$, $df=1$, Fisher p:0.735703, Pearson p:0.735699
457C>CA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.060718$, $df=1$, Fisher p:0.805374, Pearson p:0.805359 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.062400$, $df=1$, Fisher p:0.802752, Pearson p:0.802738
rs41287502	Hasta grubu için: $\chi^2=0.006409$, $df=1$, Fisher p:0.936195, Pearson p:0.936171 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.000000$, $df=1$, Fisher p:1.000000, Pearson p:1.000000
rs2986016	Hasta grubu için: $\chi^2=0.033512$, $df=1$, Fisher p:0.854755, Pearson p:0.854733 Kontrol grubu için: $\chi^2=1.649306$, $df=1$, Fisher p:0.199113, Pearson p:0.199034
rs729211	Hasta grubu için: $\chi^2=0.312010$, $df=1$, Fisher p:0.576474, Pearson p:0.576472 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.727053$, $df=1$, Fisher p:0.393881, Pearson p:0.393840
3555G>GA	Hasta grubu için: $\chi^2=0.006409$, $df=1$, Fisher p:0.936195, Pearson p:0.936171 Kontrol grubu için: $\chi^2=0.000000$, $df=1$, Fisher p:1.000000, Pearson p:1.000000

Tablo 30. Bipolar Bozukluk Hastaları ve Bu Hastaların Birinci Derece Akrabalarının Bulunan SNP’ler Yönünden Karşılaştırılması.

HASTA	BG15	BG23	BG36	BG40	BG54	BG57	BG59	BG73	BG87	BG203	P değeri
AKRABA	BG16	BG24	BG37	BG41	BG55	BG58	BG60	BG74	BG88	BG204	(minör allel açısından)
EKSON 1 SNP’LERİ											
rs2986018	HO.R. HET.	HO.V. HET.	HET. HET.	HET. HO.R.	HET. HO.V	HET. HO.V	HET. HET.	HO.R. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.52
rs4918016	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HET.	HO.R. HET.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HET.	HET. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HET.	0.43
rs2986017	HET. HO.V.	HO.V. HET.	HET. HET.	HET. HO.R	HET. HO.V.	HET. HO.V.	HET. HET.	HO.R. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.52
360G>GA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	-----
362G>GA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.15
389G>GA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.31
661T>TA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	-----
126C>CA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.15
529C>CA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	-----
449C>CA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	-----
457C>CA	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.15
EKSON 2 SNP’LERİ											
rs41287502	HET. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	1.00
rs2986016	HO.R. HO.R.	HO.V. HET.	HET. HET.	HET. HO.R	HET. HO.V	HET. HO.V	HET. HET.	HO.R. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	0.74
rs729211	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HET. HO.R.	HO.R. HET.	HET. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HET.	0.68
3555G>GA	HET. HET.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	HO.R. HO.R.	1.00

HET: heterozigot genotipi

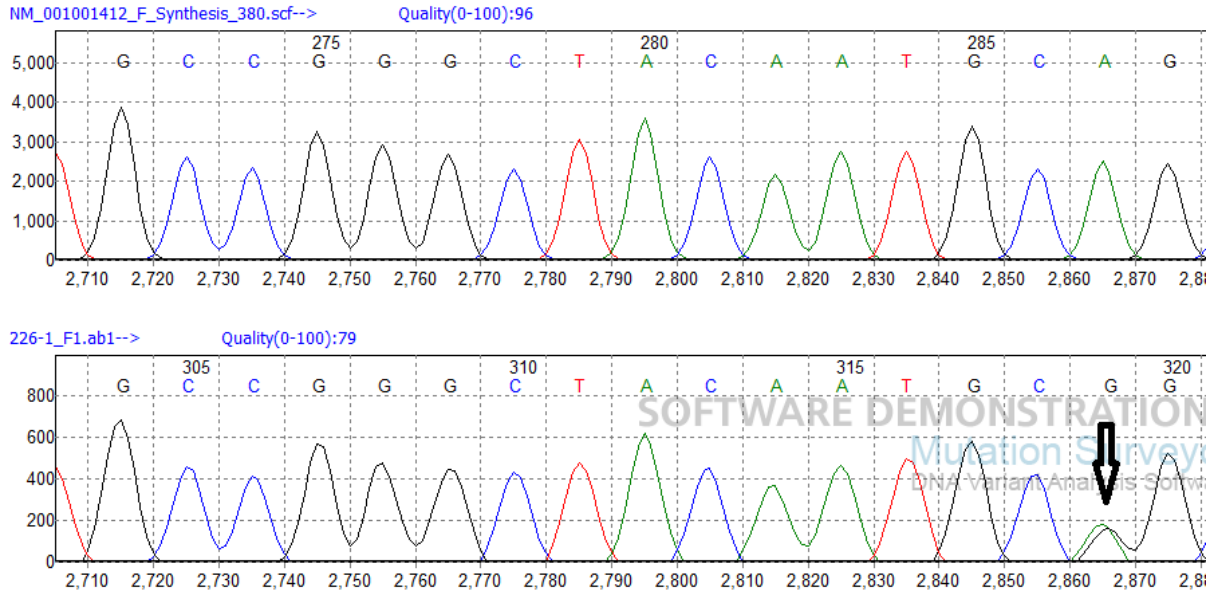
HO.R.: homozigot referans genotipi

HO.V.: homozigot varyant genotipi

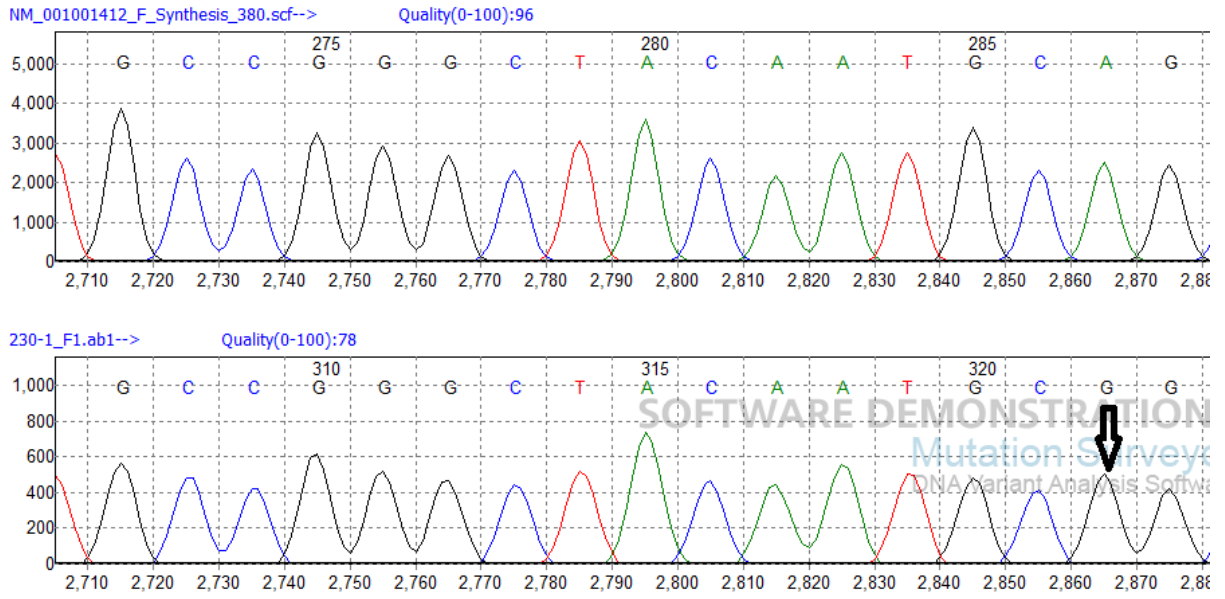
4.6.1 rs2986018 SNP

Referans/Alternatif: T/C | Atasal: C | Minör Allel Frekansı: 0.14 (T)

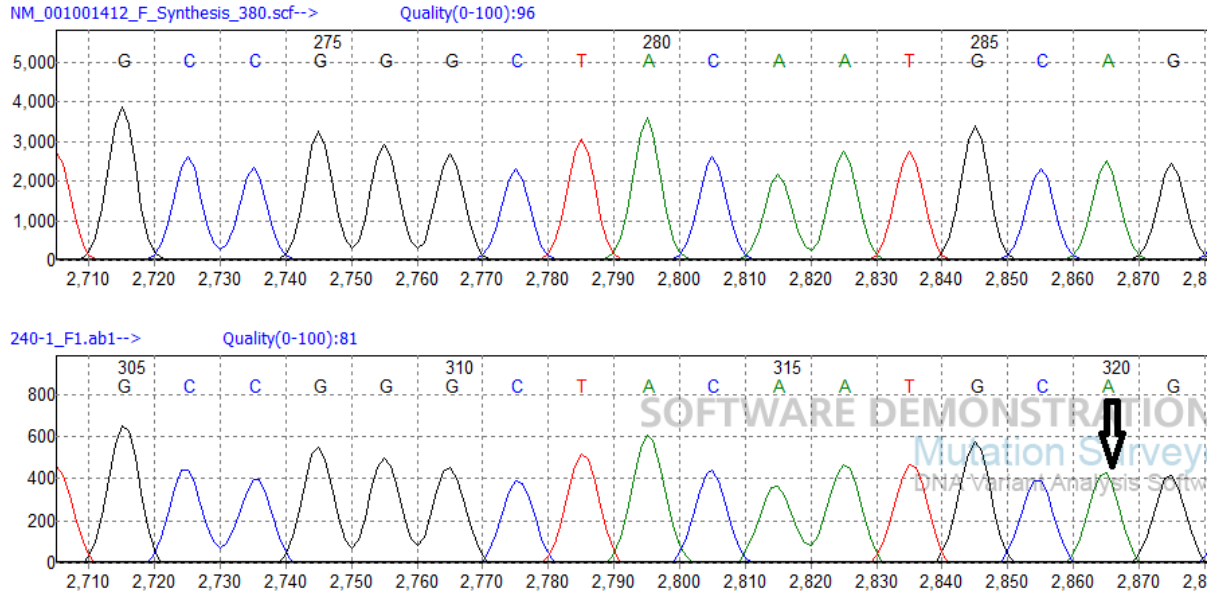
Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs2986018 SNP 1. Ekson'da bulunmaktadır. Bu SNP'in aminoasit kodlayan dizide meydana getirdiği değişim CGT → CGC (NG_016855.1:g.5290T > C) şeklindedir. Bu aminoasit proteinde 50. pozisyonda bulunmaktadır. Alanin aminoasitini kodlayan bu bölgede bu SNP herhangi bir aminoasit değişimine yol açmamaktadır. Bipolar tanısı konulan 13 kişide heterozigot olarak, üç kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda dokuz kişide heterozigot olarak, üç kişide homozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda beş kişide heterozigot olarak, iki kişide ise homozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs2986018 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs2986018 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs2986018 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 10. Heterozigot rs2986018 SNP taşıyan sekans



Şekil 11. Homozigot referans sekansı

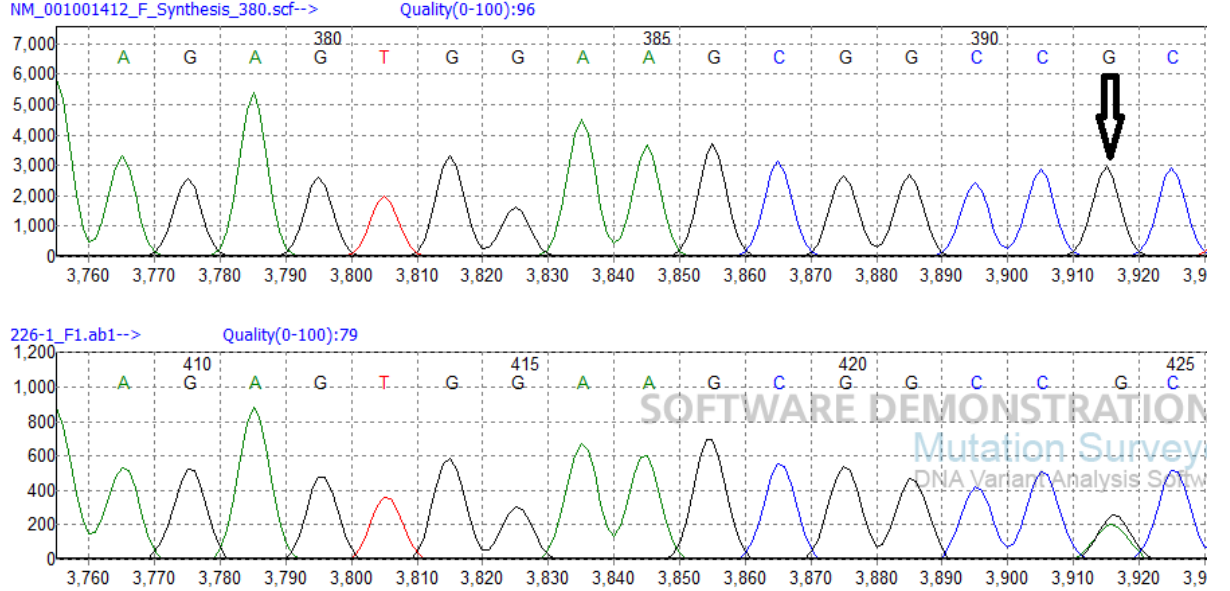


Şekil 12. Homozigot rs2986018 SNP taşıyan sekans

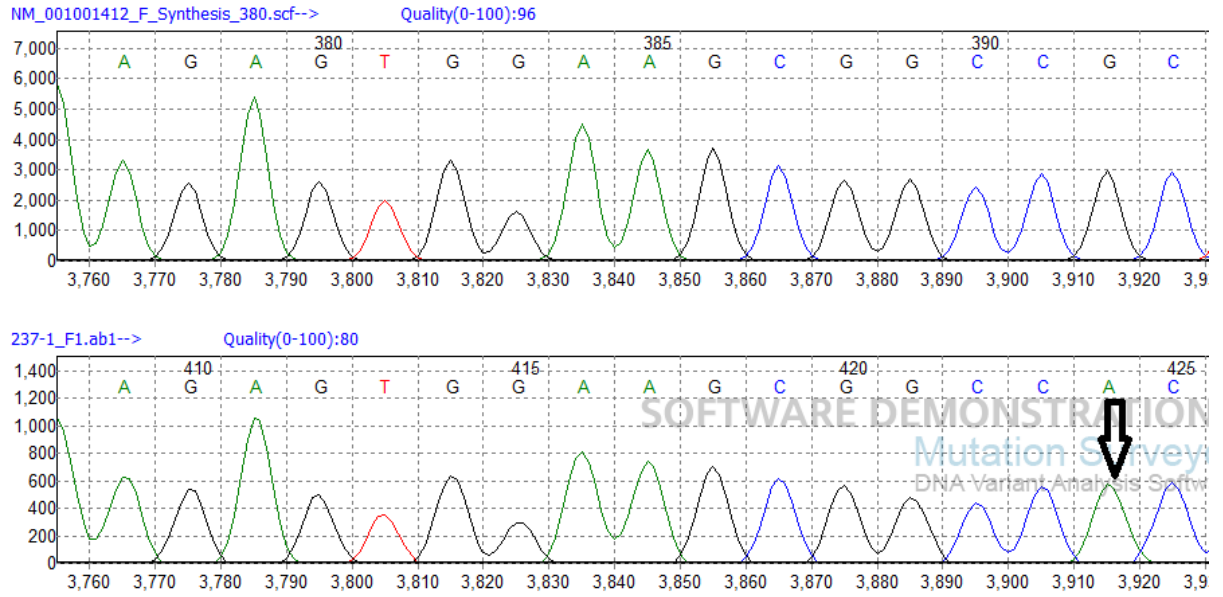
4.6.2. rs4918016 SNP

Referans/Alternatif: C/T | Atasal: C | Minör Allel Frekansı: 0.33 (T)

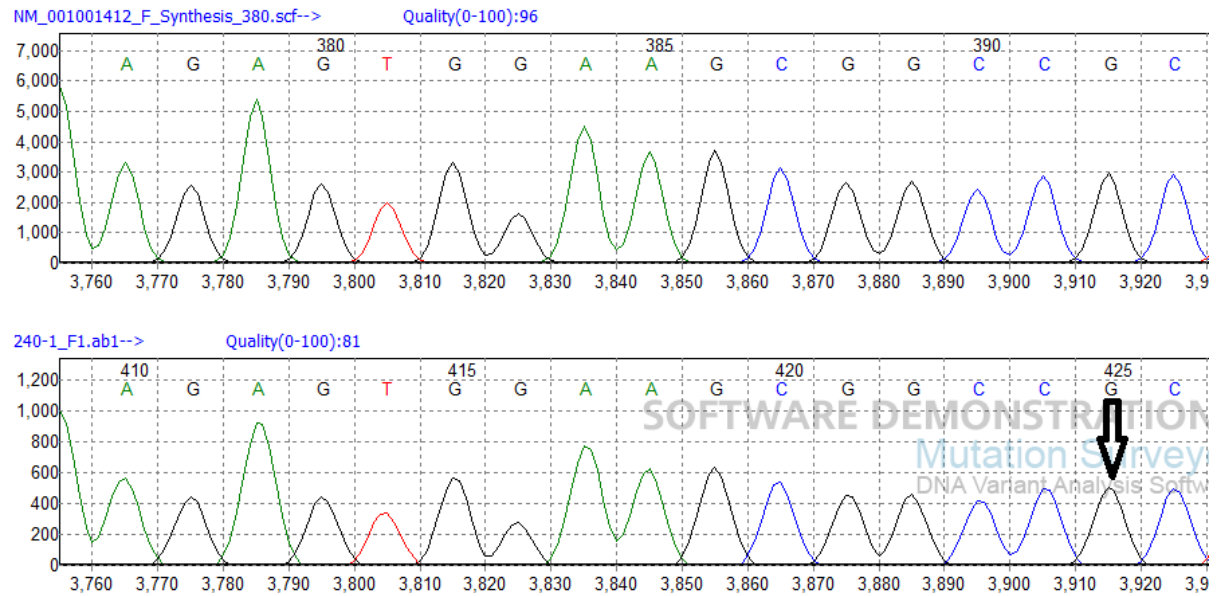
Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs4918016 SNP 1. Ekson'da bulunmaktadır. Bipolar tanısı konulan 13 kişide heterozigot olarak, altı kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda 15 kişide heterozigot olarak, altı kişide homozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda beş kişide heterozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs4918016 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs4918016 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs4918016 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu SNP'in aminoasit kodlayan dizide meydana getirdiği değişim GGC → GGT (NG_016855.1:g.5395C > T) şeklindedir. Bu aminoasit proteinde 85. pozisyonda bulunmaktadır. Prolin aminoasitini kodlayan bu bölgede SNP herhangi bir aminoasit değişimine yol açmamaktadır.



Şekil 13. Heterozigot rs4918016 SNP'ni taşıyan sekans



Şekil 14. Homozigot rs4918016 SNP'ni taşıyan sekans

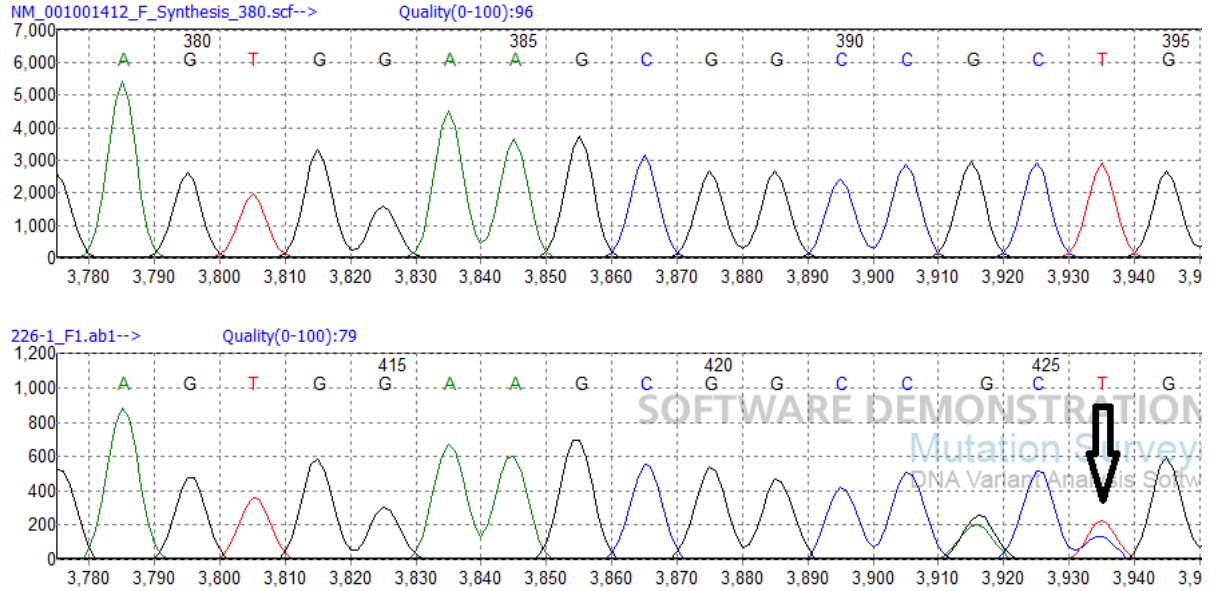


Şekil 15. Homozigot referans sekansı

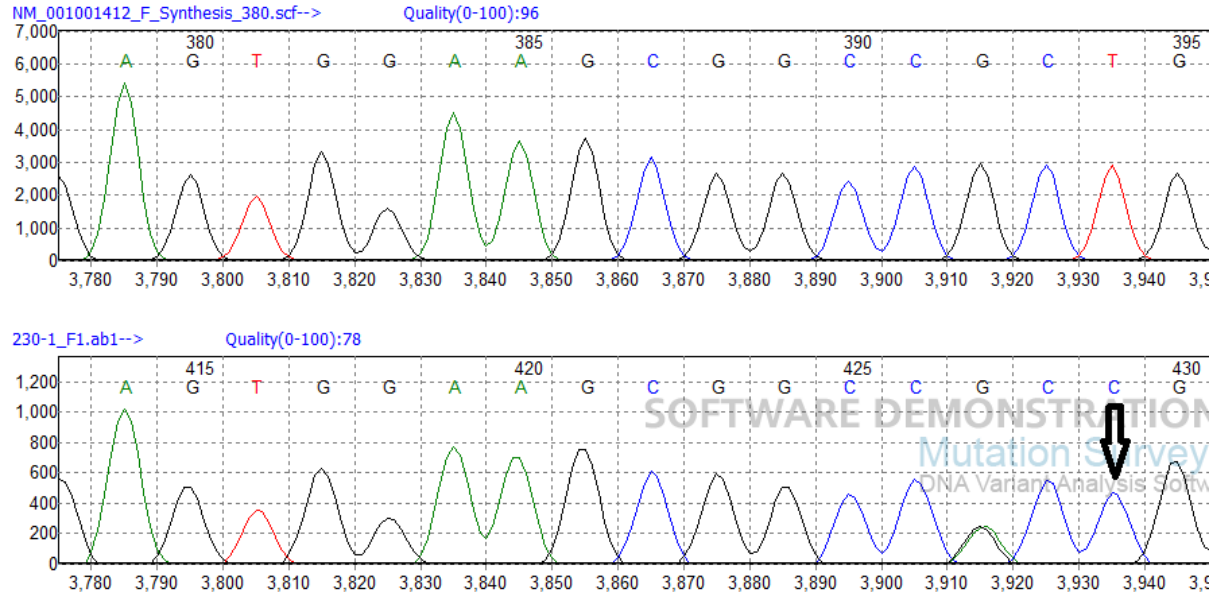
4.6.3. rs2986017 SNP

Referans/Alternatif: A/G | Atasal: G | Minör Allel Frekansı: 0.15 (A)

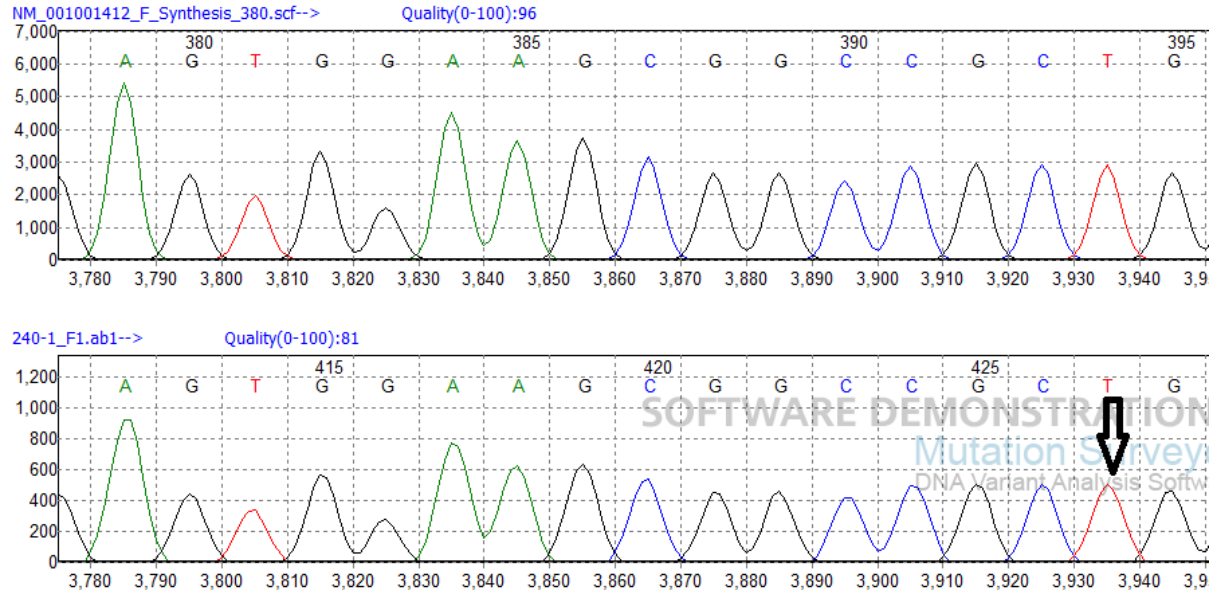
Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs2986017 SNP 1. Ekson'da bulunmaktadır. Bipolar tanısı konulan 14 kişide heterozigot olarak, üç kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda dokuz kişide heterozigot olarak, üç kişide homozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda dört kişide heterozigot olarak, üç kişide ise homozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs2986017 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs2986017 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs2986017 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu SNP'in aminoasit kodlayan dizide meydana getirdiği değişim GAC → GGC (NG_016855.1:g.5397A > G) şeklindedir. Bu aminoasit proteinde 86. pozisyonda bulunmaktadır. Lösin aminoasitini kodlayan bu bölgede bu SNP prolin aminoasitinin kodlanmasına yol açmıştır



Şekil 16. Heterozigot rs2986017 SNP'ni taşıyan sekans



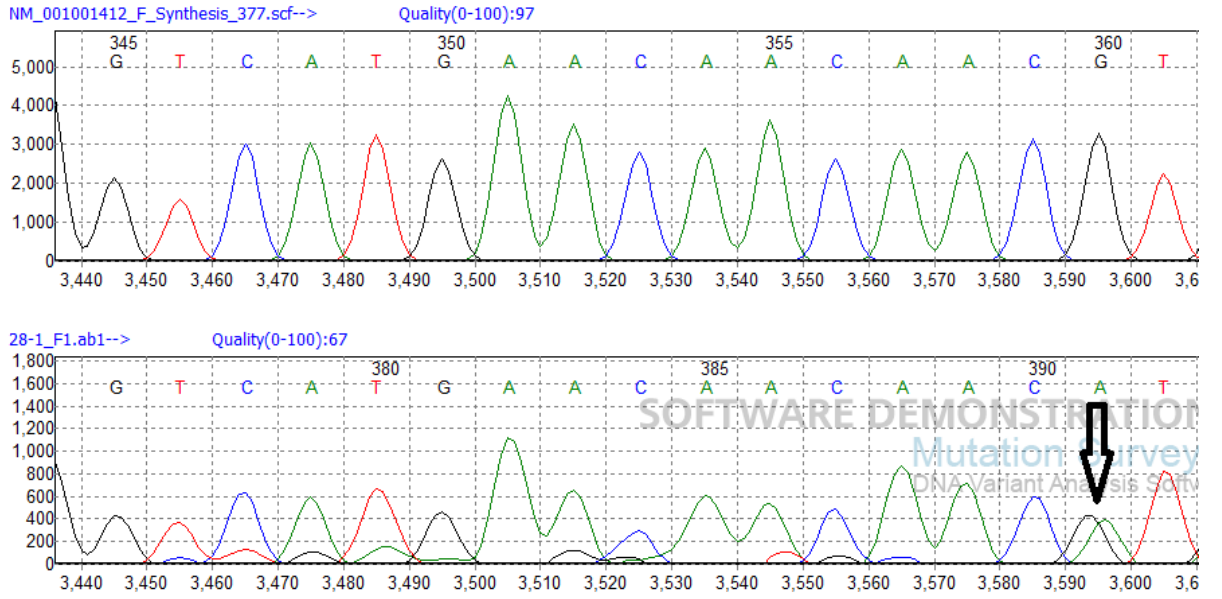
Şekil 17. Homozigot referans sekans



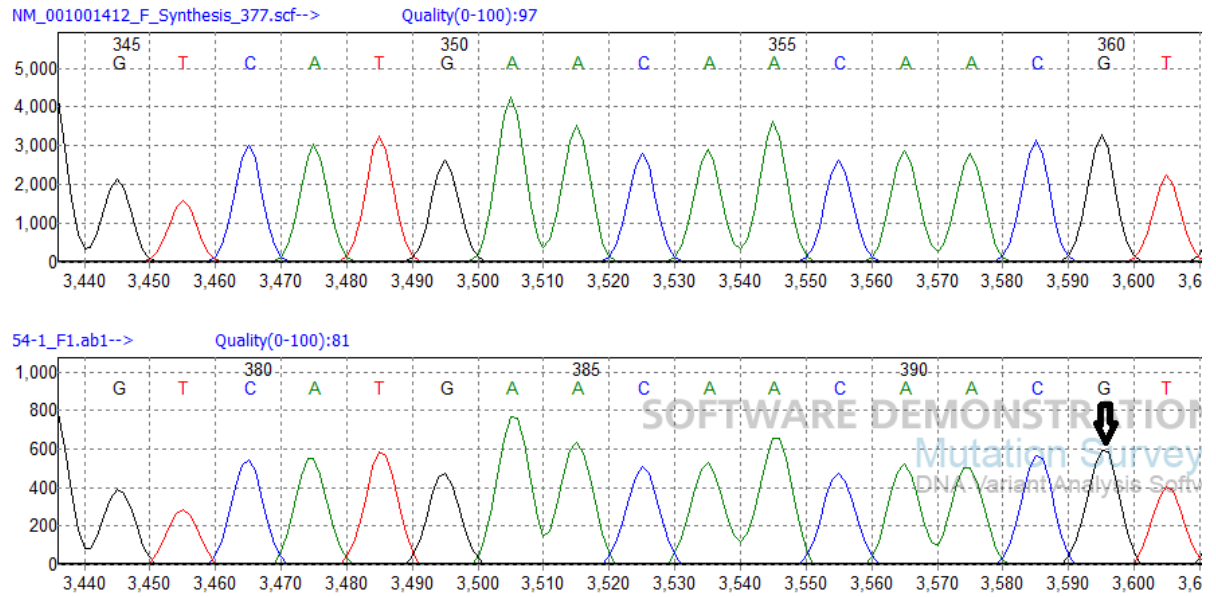
Şekil 18. Homozigot rs2986017 SNP'ni taşıyan sekans

4.6.4. 360G>GA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. Proteinde 75. aminoasite denk gelmektedir GTG→ATG değişimine yol açar. Valin aminoasidini metiyonin aminoasidine dönüştüren bir SNP'dir. Bipolar tanısı konulan dört kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP saptanmadı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 360G>GA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 360G>GA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 360G>GA SNP'nin allel frekansında bipolar bozukluk hasta grubunda sağlıklı gönüllü grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır.



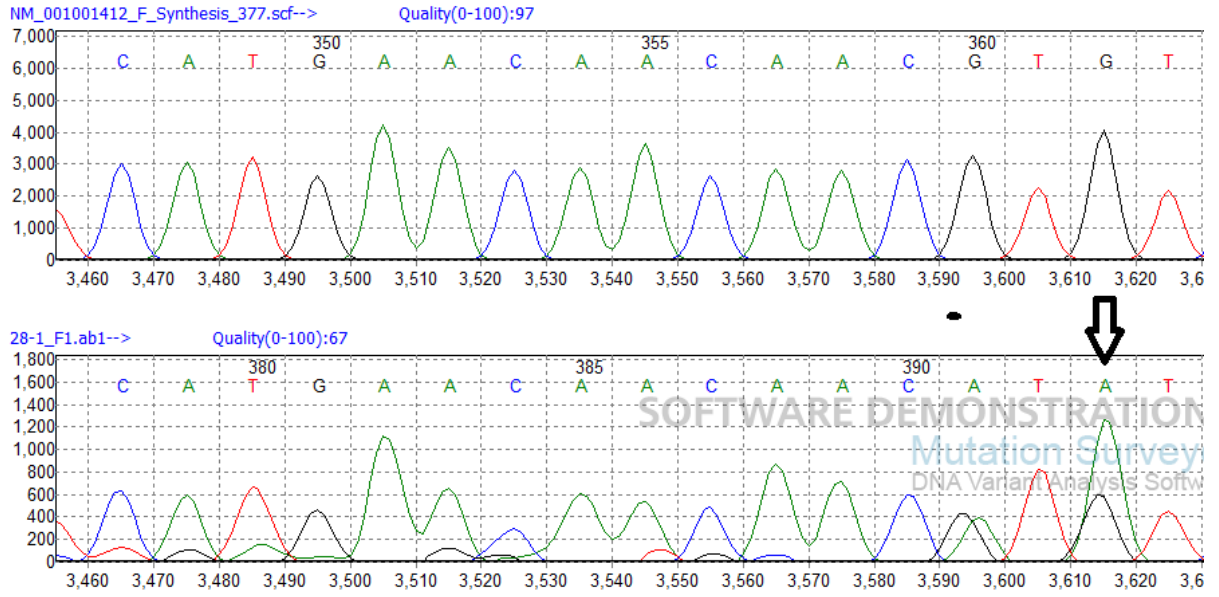
Şekil 19. Heterozigot 360G>GA SNP'ni taşıyan sekans



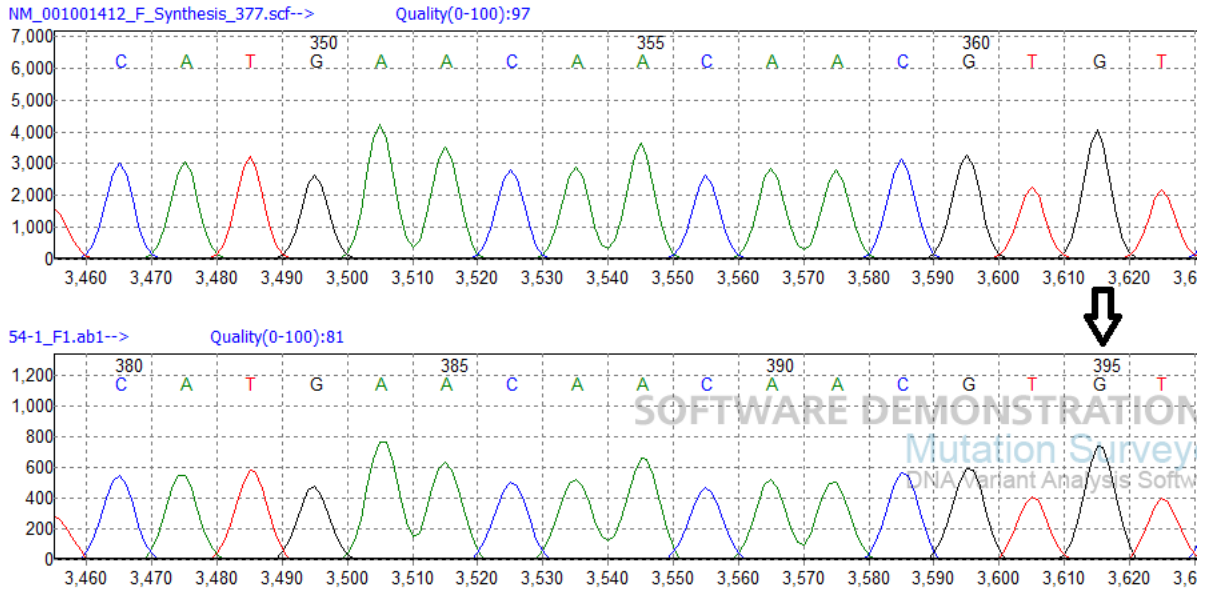
Şekil 20. Homozigot referans sekans

4.6.5 362G>GA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. Proteinde 75. aminoasite denk gelmektedir. GTG→GTA değişimine yol açar. Bu SNP herhangi bir aminoasit değişime yol açmamaktadır. Bipolar tanısı konulan 10 kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP dokuz kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 362G>GA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 362G>GA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 360G>GA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



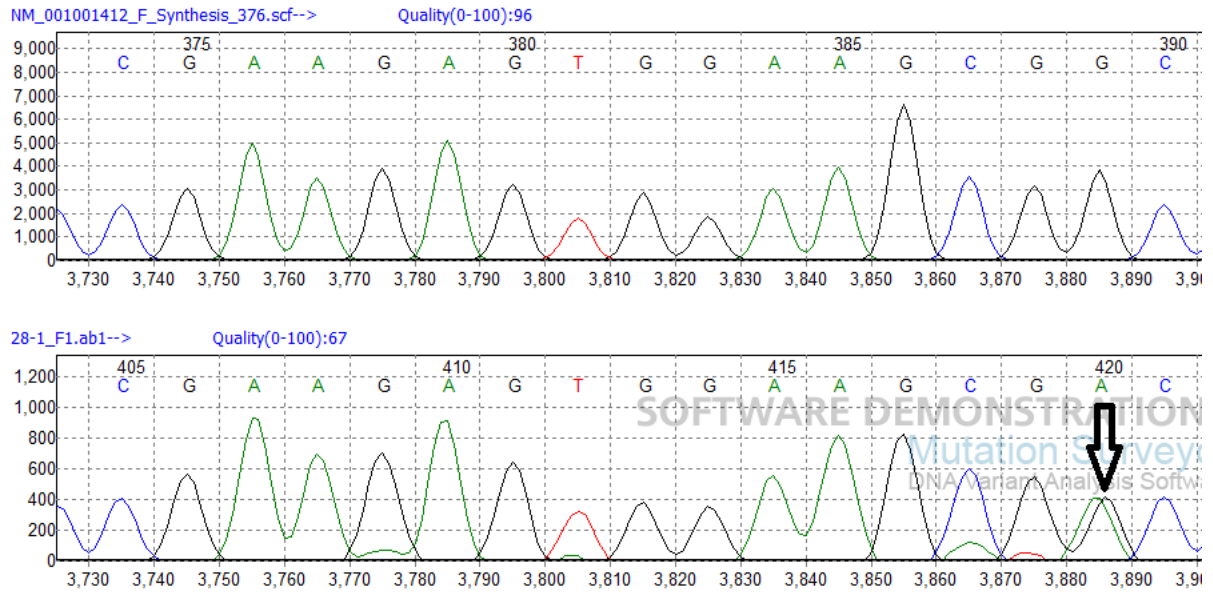
Şekil 21. Heterozigot 362G>GA SNP'ni taşıyan sekans



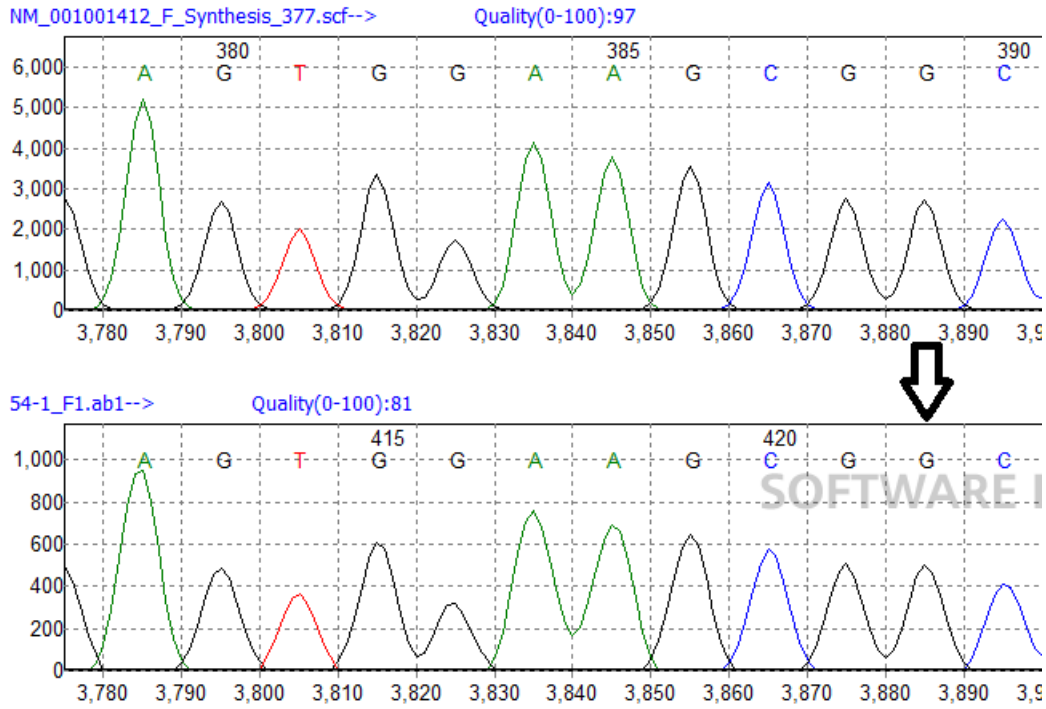
Şekil 22. Homozigot referans sekans

4.6.6 389G>GA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. Proteinde 84. aminoaside denk gelmektedir. CGG→CGA değişimine yol açmaktadır. Proteinde herhangi bir aminoasit değişimine yol açmamaktadır. Bipolar tanısı konulan altı kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP bir kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 389G>GA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 389G>GA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 389G>GA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



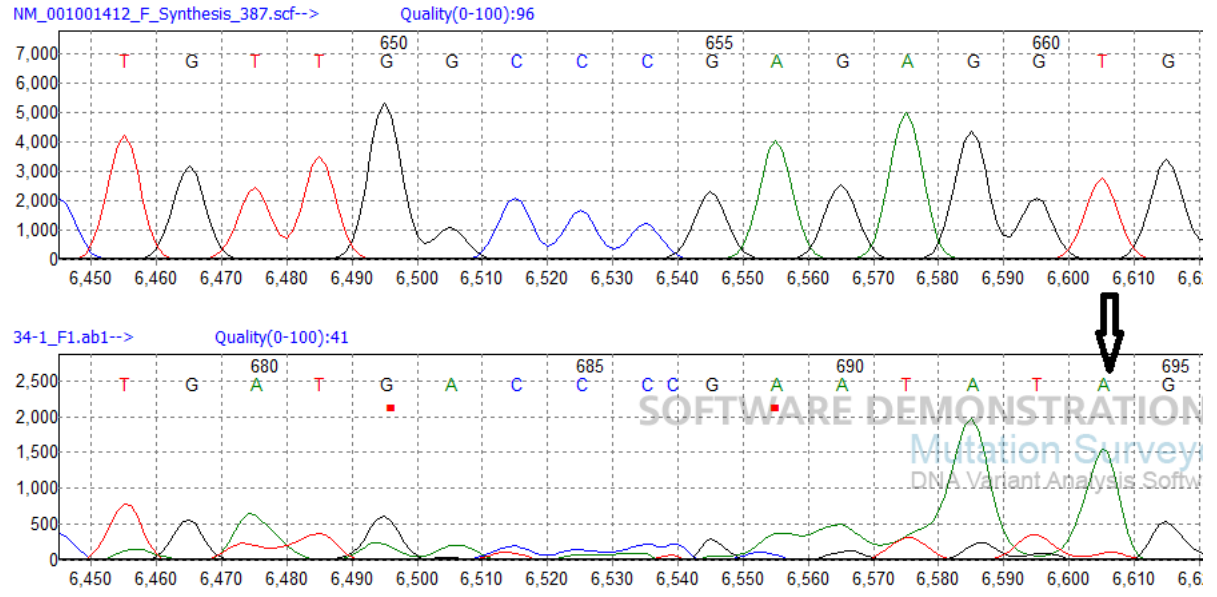
Şekil 23. Heterozigot 389G>GA SNP'ni taşıyan sekans



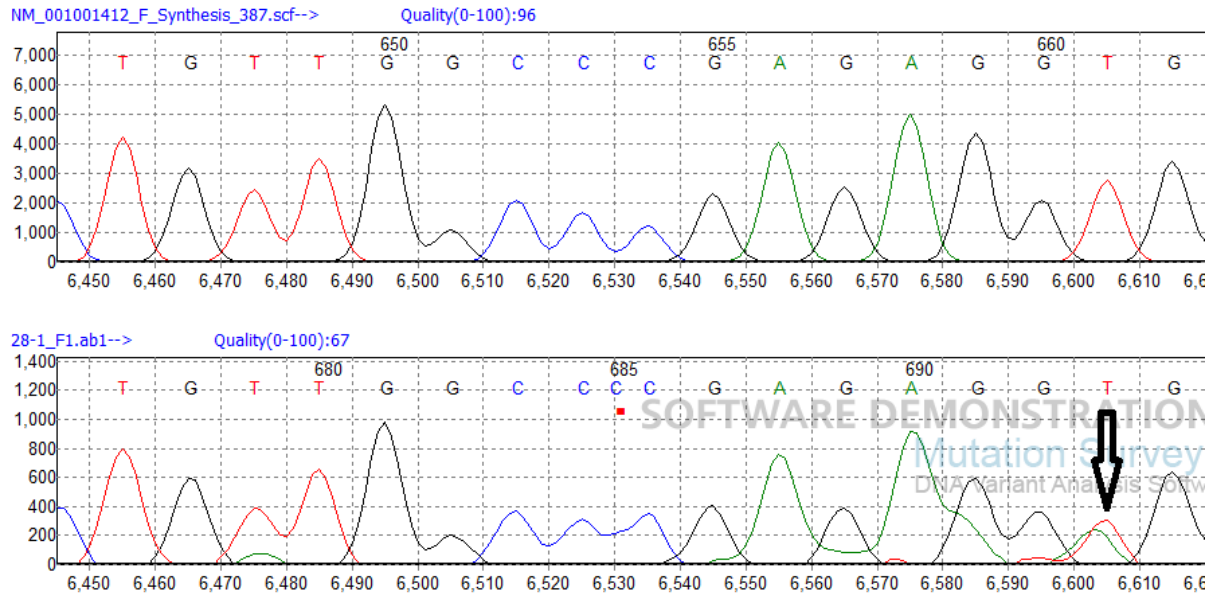
Şekil 24. Homozigot referans sekans

4.6.7. 661T>TA SNP

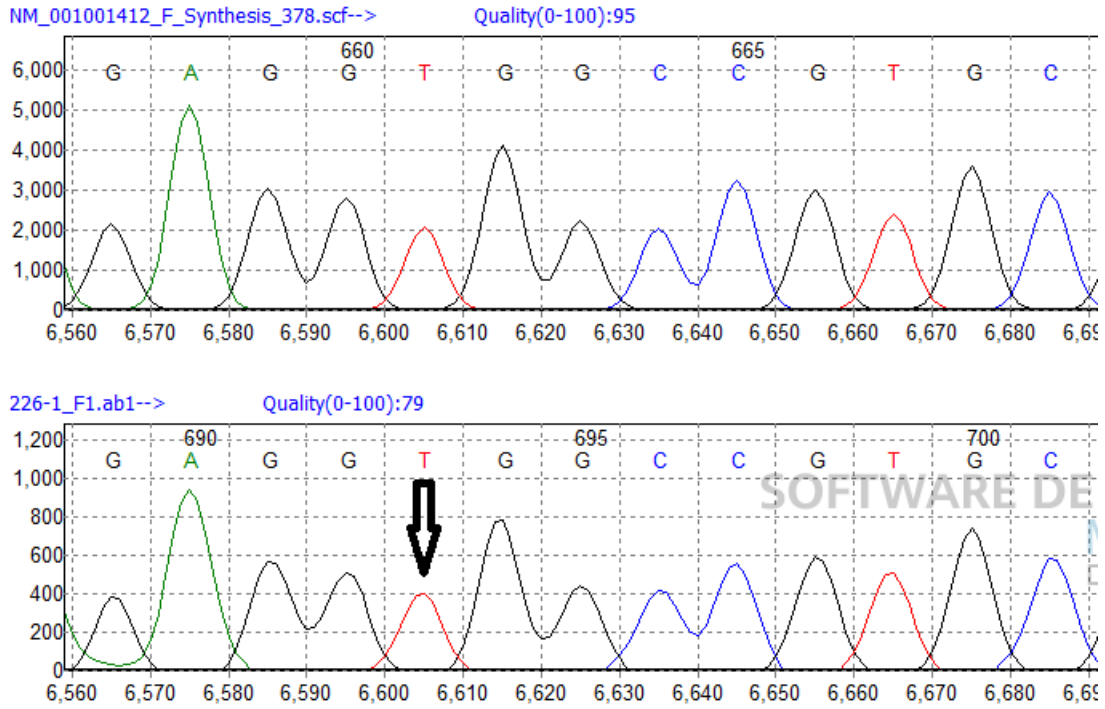
Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. Proteinde 175. aminoaside denk gelmektedir. GTG→GAG değişimine yol açmaktadır. Valin aminoasidini glutamik aside dönüştürür. Bipolar tanısı konulan üç kişide heterozigot olarak, iki kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP bir kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 661T>TA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymamaktadır. 661T>TA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 661T>TA SNP'nin allel frekansında bipolar bozukluk hasta grubunda sağlıklı gönüllü grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptanmıştır fakat bu SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dengesine uymadığı için hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın bize doğru sonucu vermediği anlaşılmıştır.



Şekil 25. Homozigot 661T>TA SNP’ni içeren sekans



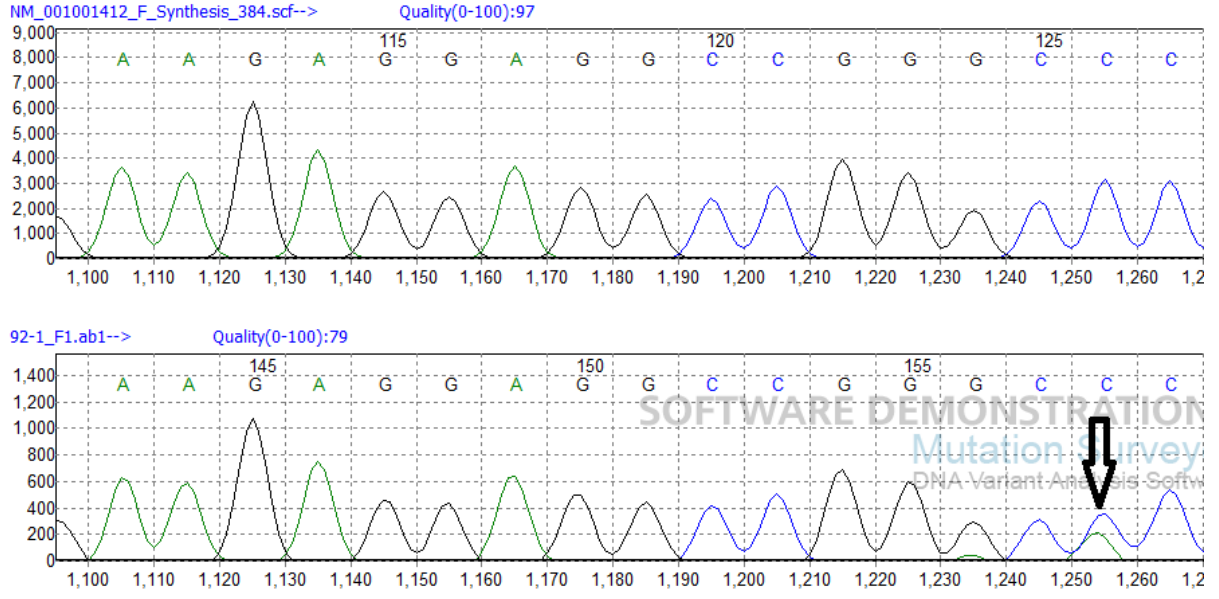
Şekil 26. Heterozigot 661T>TA SNP’ni içeren sekans



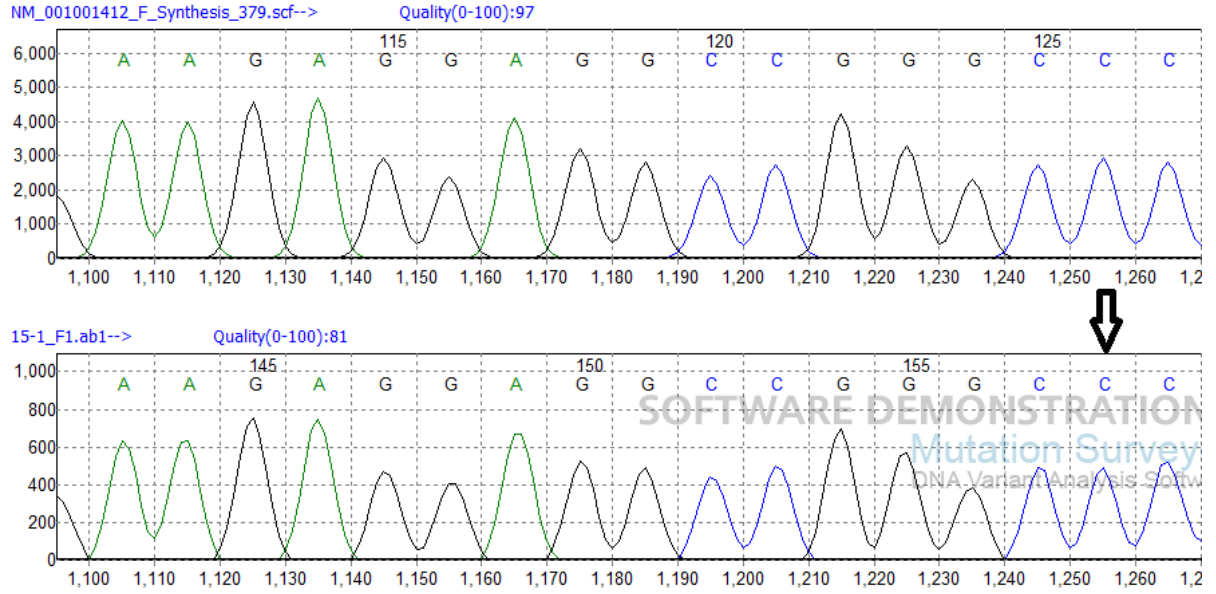
Şekil 27. Homozigot referans sekans

4.6.8 126C>CA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. Genin 5'UTR bölgesinde yer almaktadır. Bipolar tanısı konulan beş kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP iki kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 126C>CA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 126C>CA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 126C>CA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



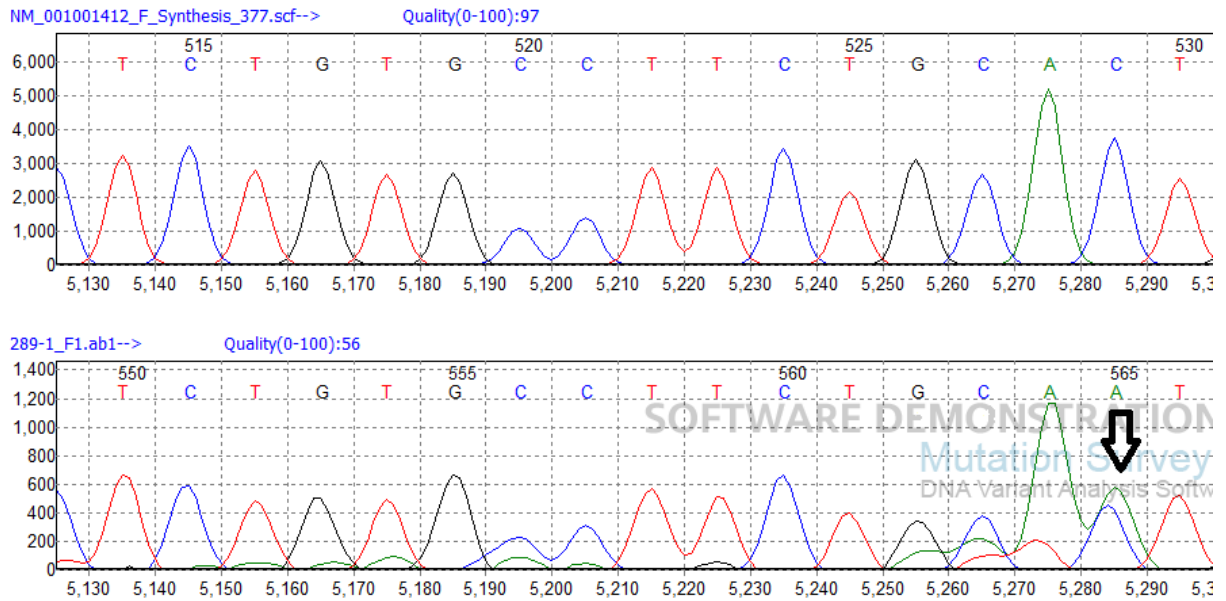
Şekil 28. Heterozigot 126C>CA SNP taşıyan sekans



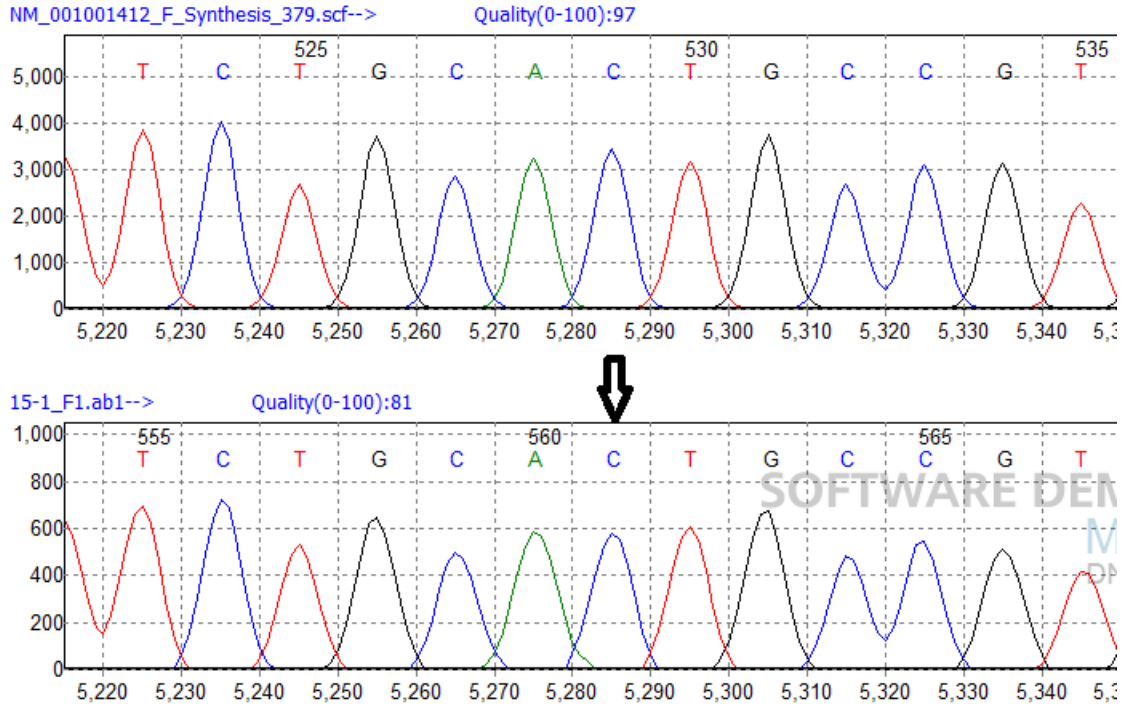
Şekil 29. Homozigot referans sekans

4.6.9. 529C>CA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. 131. aminoasite denk gelmektedir. ACT→AAT değişimine yol açmaktadır. Treonin aminoasidinin asparagin aminoasidine dönüştürür. Bipolar tanısı konulan iki kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP iki kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 529C>CA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 529C>CA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 529C>CA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



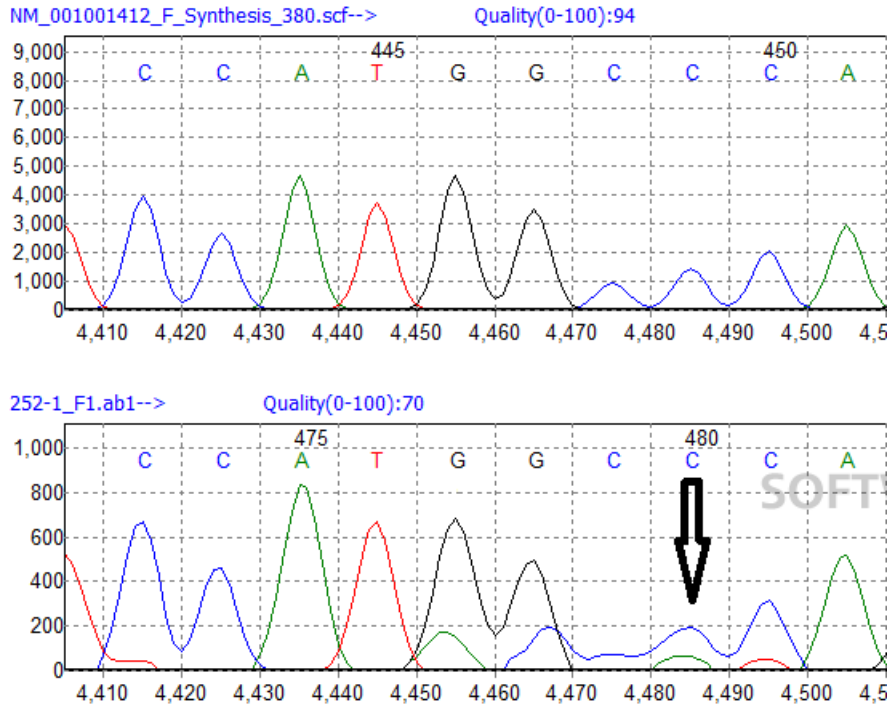
Şekil 30. Heterozigot 529C>CA SNP'ni taşıyan sekans



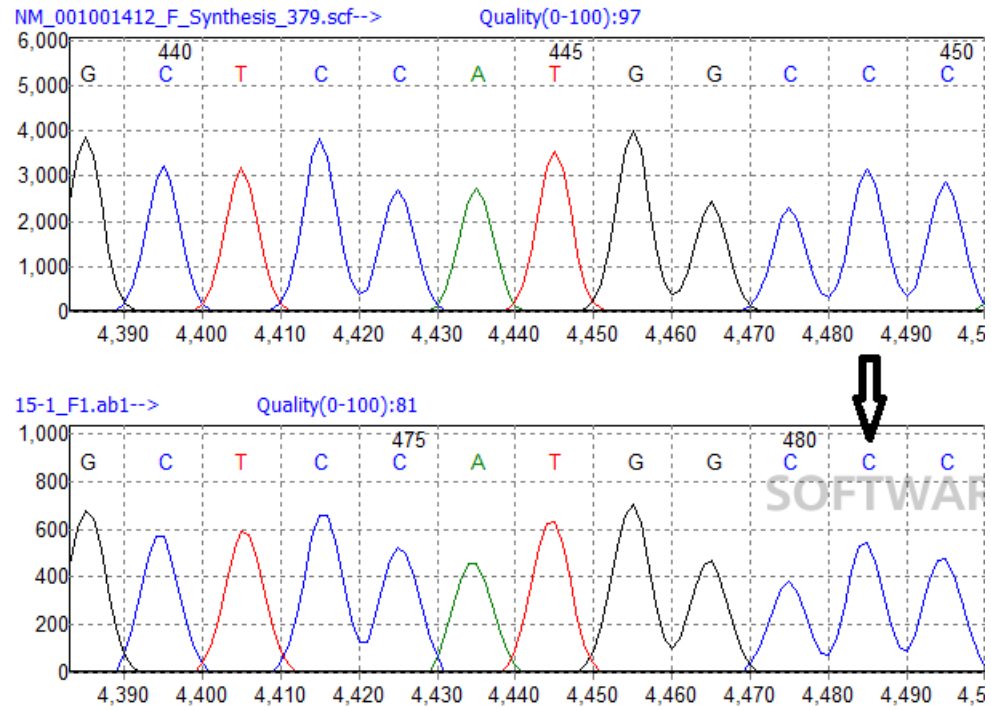
Şekil 31. Homozigot referans sekans

4.6.10. 449C>CA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. 28. aminoasit denk gelmektedir. GCC→GCA değişimine yol açmaktadır. Proteinde herhangi bir aminoasit değişimine yol açmamaktadır. Bipolar tanısı konulan iki kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP dört kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 449C>CA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 449C>CA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 449C>CA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



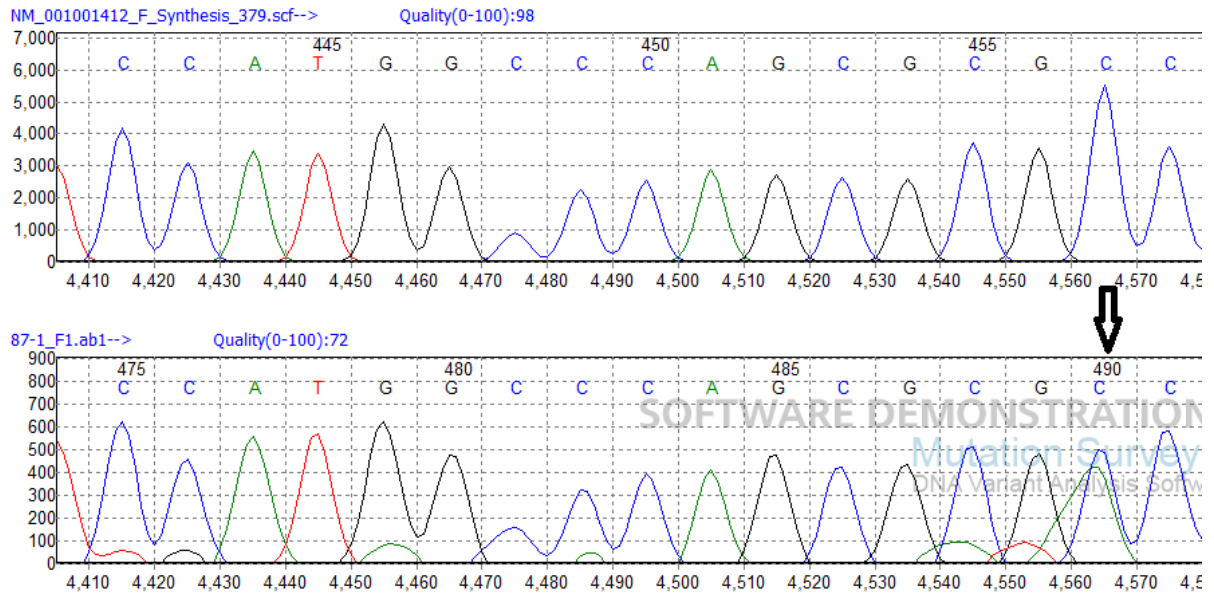
Şekil 32. Heterozigot 449C>CA SNP'ni taşıyan sekans



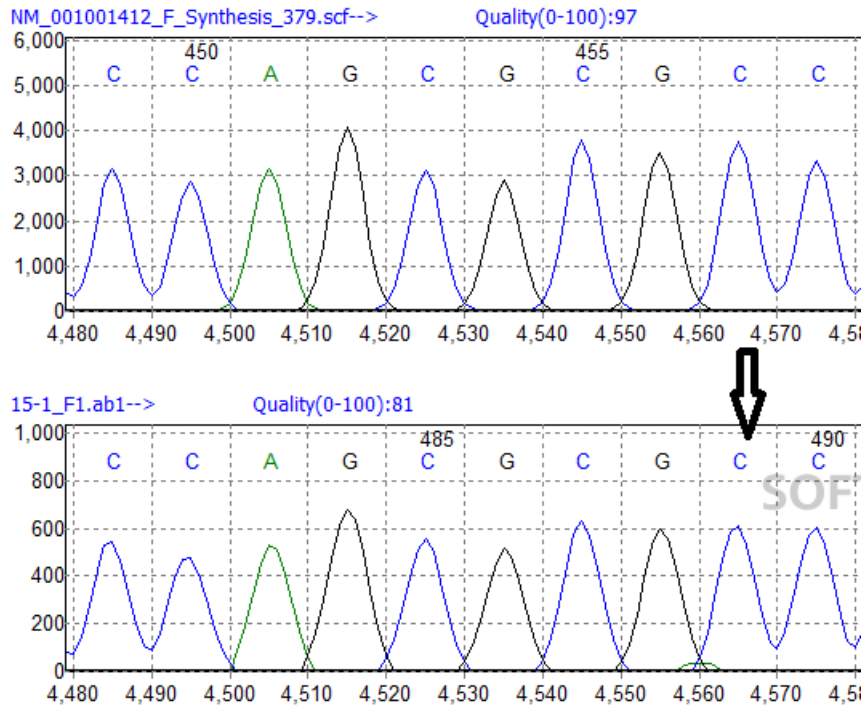
Şekil 33. Homozigot referans sekans

4.6.11. 457C>CA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 1. Eksonda bulunmaktadır. 107. aminoaside denk gelmektedir. GCC→GAC değişimine yol açmaktadır. Alanin aminoasidini aspartik aside dönüştürür. Bipolar tanısı konulan üç kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP üç kişide heterozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda bu SNP saptanmadı. Tüm üç çalışma grubunda da 457C>CA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 457C>CA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 457C>CA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 34. Heterozigot 457C>CA SNP'ni taşıyan sekans

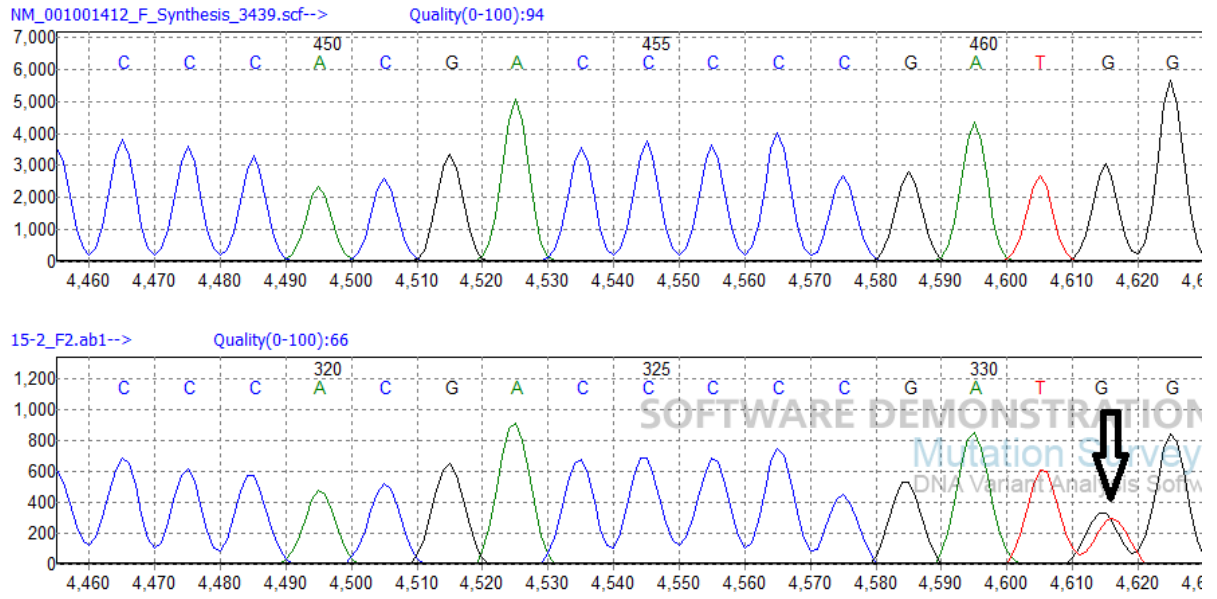


Şekil35. Homozigot referans sekans

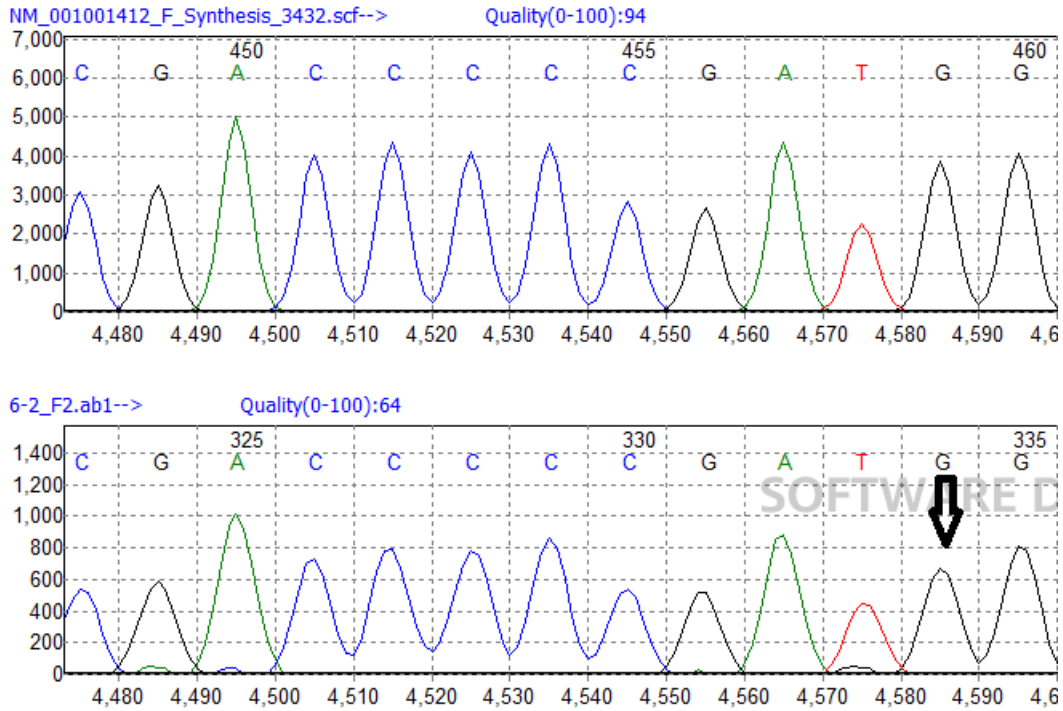
4.6.12. rs41287502 SNP

Referans/Alternatif: C/A | Atasal: C | Minör.Allel.Frekansı: 0.01 (A)

Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs41287502 SNP 2. eksonda bulunmaktadır. Bipolar tanısı konulan bir kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP saptanmadı. Birinci derece akraba grubunda bir kişide heterozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs41287502 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs41287502 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs41287502 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu SNP'in aminoasit kodlayan dizide meydana getirdiği değişim CCA → ACA (NG_016855.1:g.8433GC> A) şeklindedir. Bu aminoasit proteinde 282. pozisyonda bulunmaktadır. Glisin aminoasitini kodlayan bu bölgede bu SNP sistein aminoasitinin kodlanmasına yol açmıştır.



Şekil 36. Heterozigot rs41287502 SNP'ni taşıyan sekans

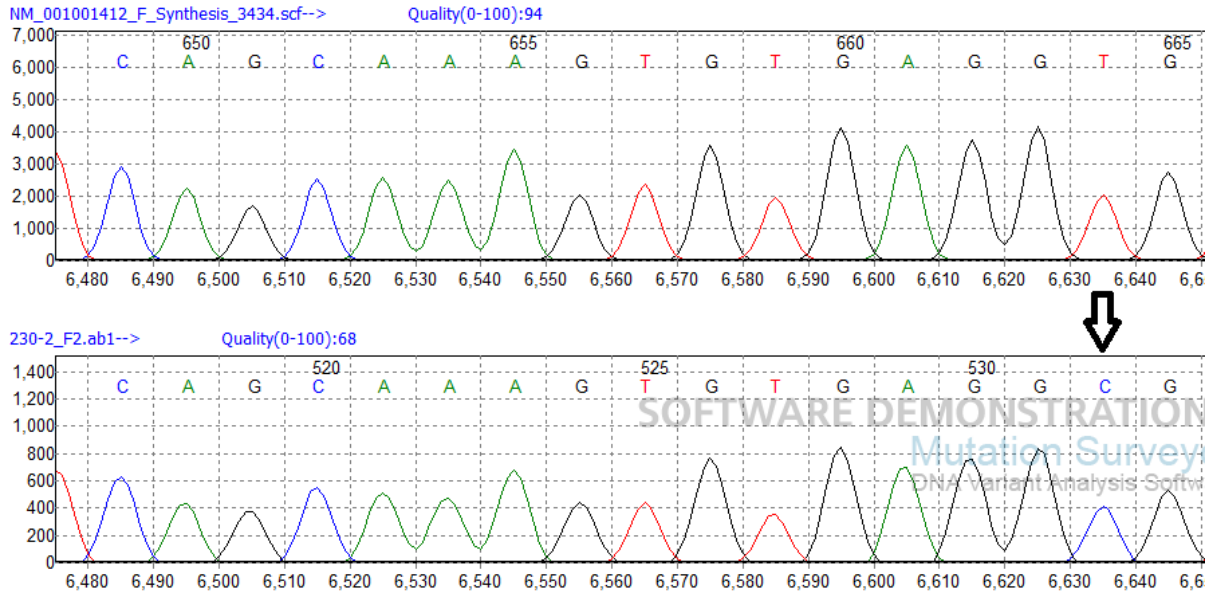


Şekil 37. Homozigot referans sekans

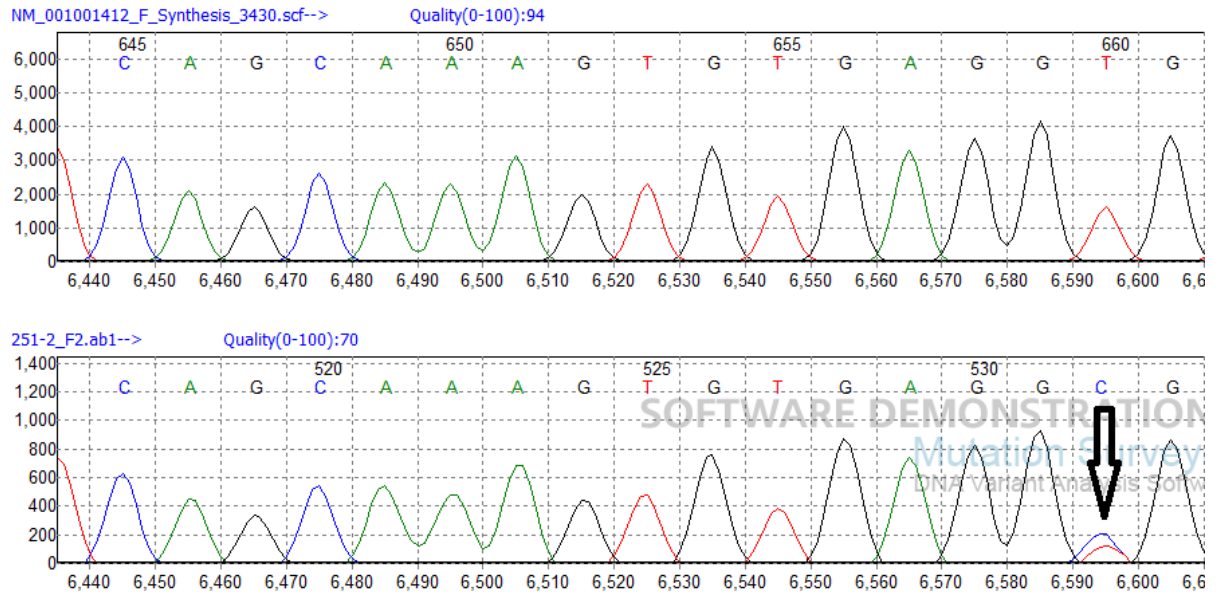
4.6.13 rs2986016 SNP

Referans/Alternatif: A/G | Atasal: G | Minör.Allel.Frekansı: 0.15 (A)

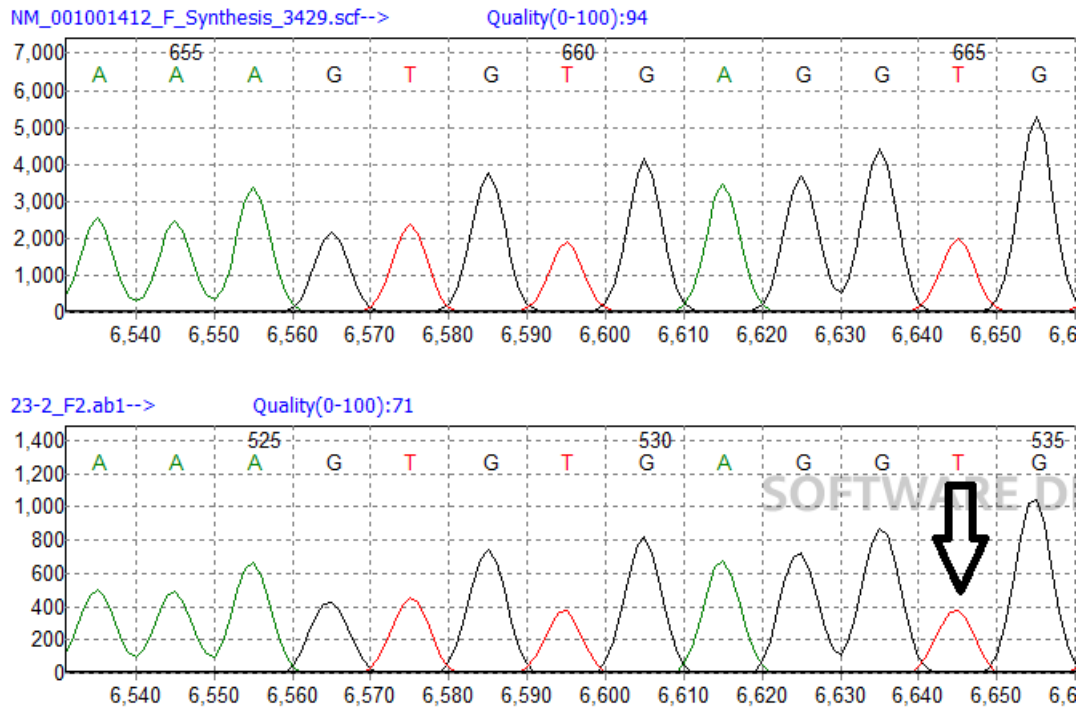
Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs2986016 SNP'nin yerleşimi 3'UTR bölgesidir. Bipolar tanısı konulan 13 kişide heterozigot olarak iki kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda 10 kişide heterozigot olarak, üç kişide homozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda dört kişide heterozigot olarak, iki kişide homozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs2986016 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs2986016 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs2986016 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 38. Homozigot referans sekans



Şekil 39. Heterozigot rs2986016 SNP'ni taşıyan sekans

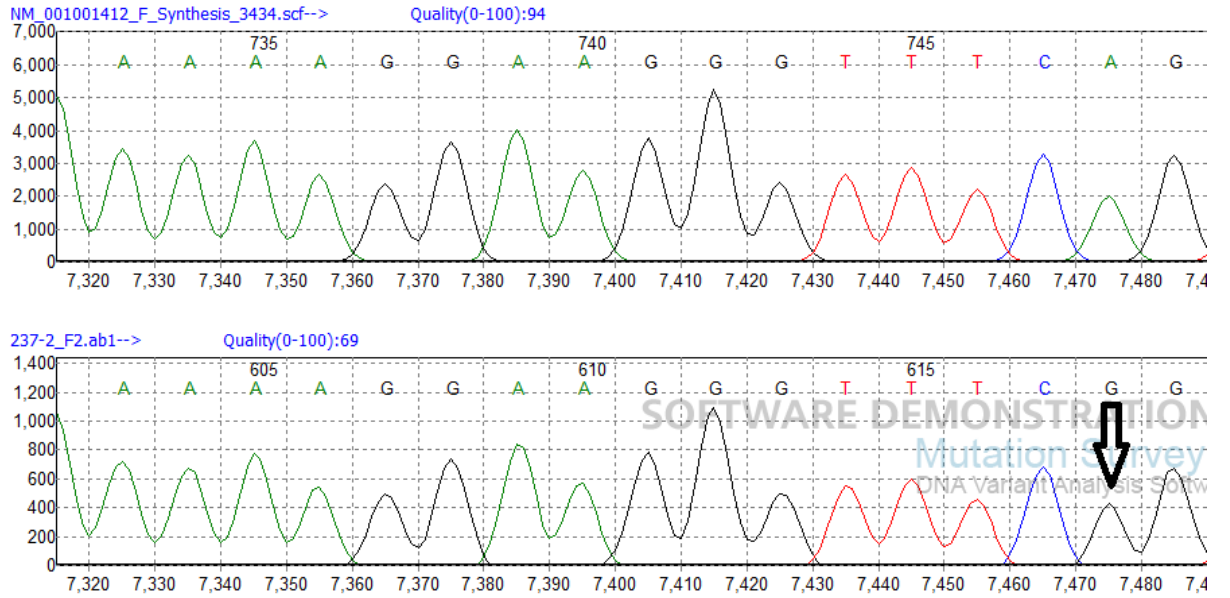


Şekil 40. Homozigot rs2986016 SNP'ni taşıyan sekans

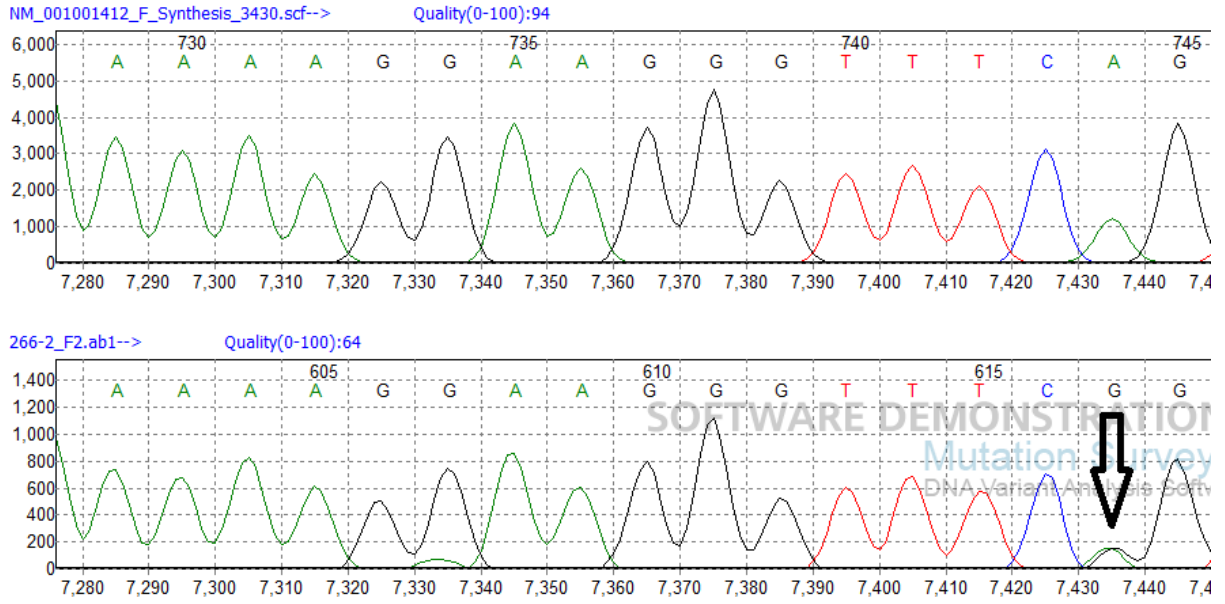
4.6.14 rs729211 SNP

Referans/Alternatif: T/C | Atasal: T | Minör Allel Frekansı: 0.38 (C)

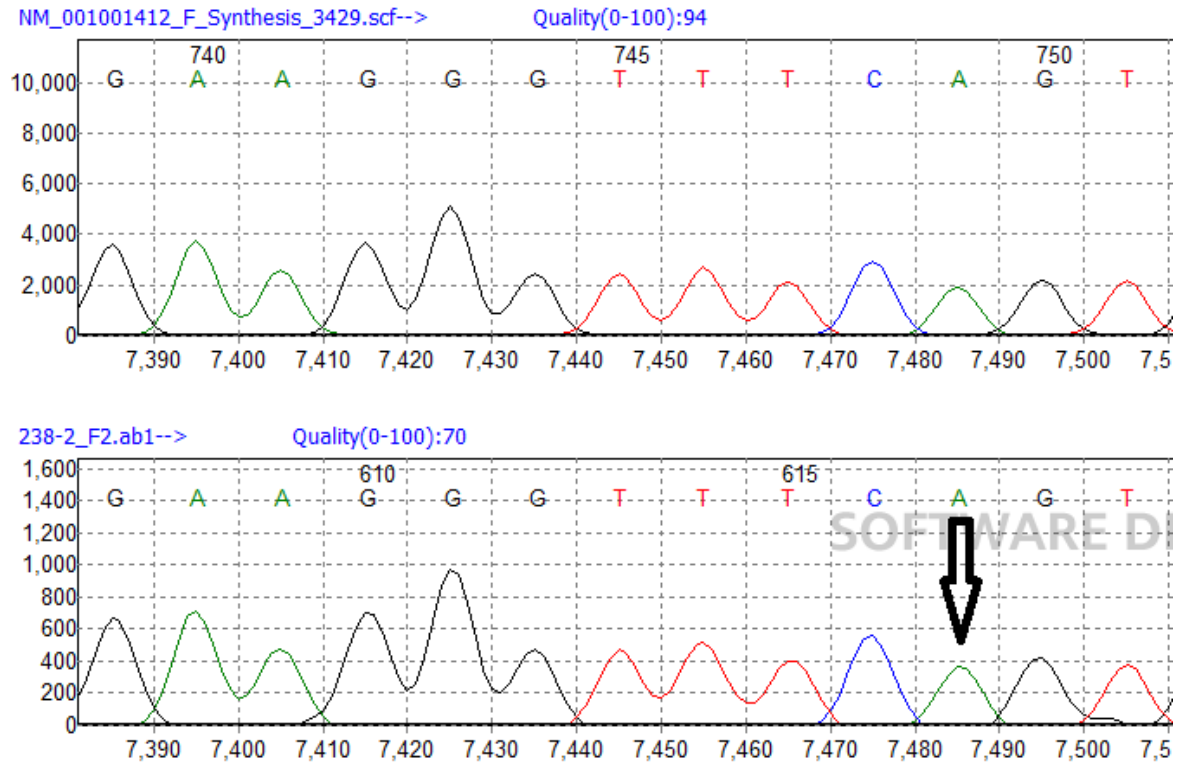
Çalışmamızda saptanan SNP'lerden rs729211 SNP'nin yerleşimi 3' UTR bölgesidir. Bu SNP genin protein kodlayan bölgesinin dışında kalmaktadır. Bipolar tanısı konulan 16 kişide heterozigot olarak beş kişide homozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda 15 kişide heterozigot olarak, altı kişide homozigot olarak saptandı. Birinci derece akraba grubunda dört kişide heterozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da rs729211 SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. rs729211 SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda rs729211 SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 41. Homozigot rs729211 SNP'ni taşıyan sekans



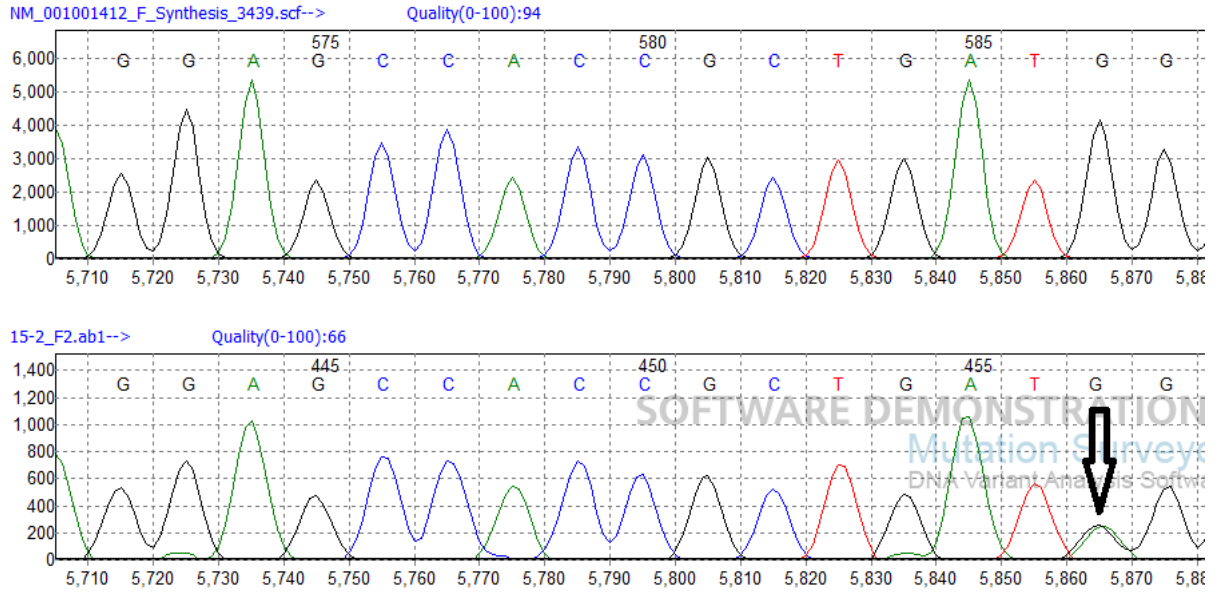
Şekil 42. Heterozigot rs729211 SNP'ni taşıyan sekans



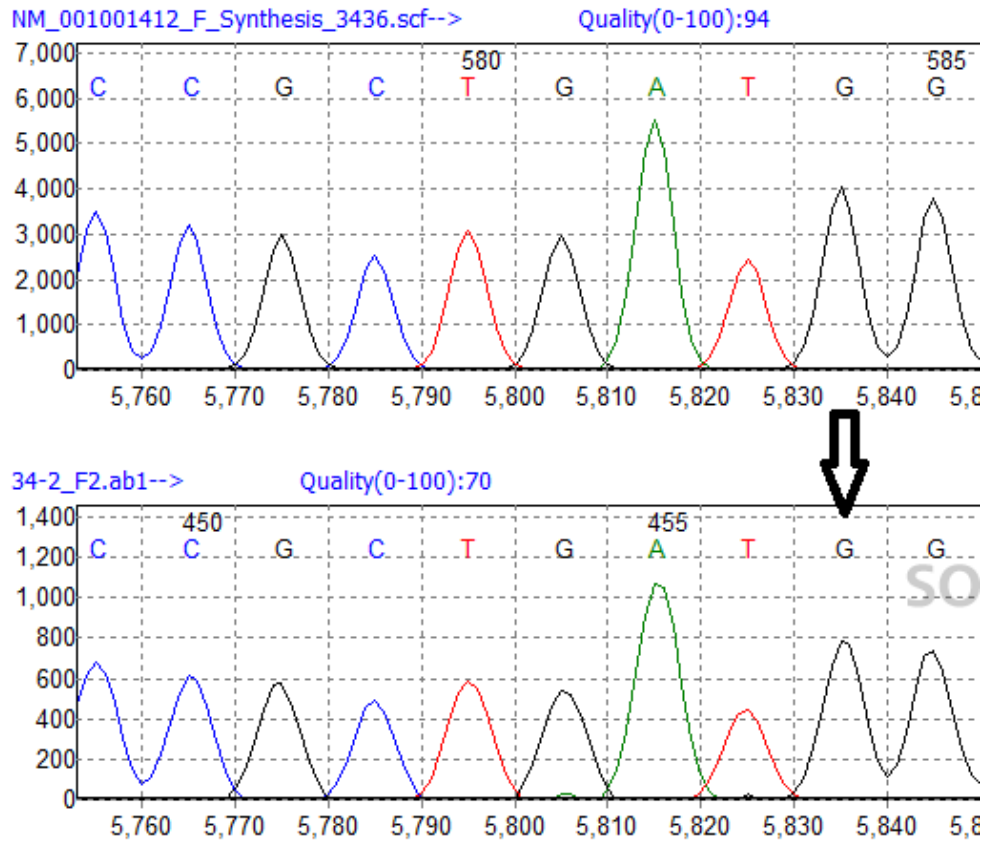
Şekil 43. Homozigot referans sekans

4.6.15 3555G>GA SNP

Bu SNP ilk defa bu çalışmada bulunan bir SNP'dir. 2. eksonda bulunmaktadır. 323. aminoaside denk gelmektedir. ATG → ATA değişimine neden olmaktadır. Metiyonin aminoasidini izolösine dönüştürür. Bipolar tanısı konulan bir kişide heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda bu SNP saptanmadı. Birinci derece akraba grubunda bir kişide heterozigot olarak saptandı. Tüm üç çalışma grubunda da 3555G>GA SNP allel frekansları Hardy-Weinberg dağılımına uymaktadır. 3555G>GA SNP'nin allel ve genotip frekansları, olasılık oranları, p değerleri ve Hardy-Weinberg test sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. İlişki çalışmaları sonucunda 3555G>GA SNP'nin allel frekansında sağlıklı gönüllü grubu ve bipolar bozukluk hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 44. Heterozigot 3555G>GA SNP'ni taşıyan sekans



Şekil 45. Homozigot referans sekans

4.7 Çalışmada saptanan SNP'lerin minör allel frekansları

Çalışma gruplarımızda CALHM1 geninde en sık görülen SNP'ler 32,02 %MAF değeri ile rs4918016 ve rs729211'dir. Her iki SNP'nin çalışmamızdaki %MAF değeri en çok bu SNP'lerin Avrupa popülasyonundaki MAF değerlerine yakındır. SNP'lerin geneline bakıldığında rs41287502 hariç çalışmada bulunan SNP'lerin tamamının %MAF değerleri Avrupa popülasyonundaki MAF değerlerine yakındır.

Çalışma gruplarımızda CALHM1 geninde ikinci en sık görülen SNP rs2986017, üçüncü en sık görülen SNP ise rs2986018'dir.

Tablo 31. Çalışmada Saptanan SNP'lerin Hesaplanan ve 1000 Genom Projesinde Farklı Popülasyonlar İçin Gösterilen Minör Allel Frekansları.

Minör Allel Frekansları (%MAF)					
SNP'ler	Çalışmada hesaplanan	Afrika	Amerika	Asya	Avrupa
rs2986018	24,16	3	17	9	24
rs4918016	32,02	22	40	44	29
rs2986017	25,28	3	19	8	26
360G>GA	2,25	-----	-----	-----	-----
362G>GA	10,67	-----	-----	-----	-----
389G>GA	3,93	-----	-----	-----	-----
661T>TA	4,49	-----	-----	-----	-----
126C>CA	3,93	-----	-----	-----	-----
529C>CA	2,25	-----	-----	-----	-----
449C>CA	3,37	-----	-----	-----	-----
457C>CA	3,37	-----	-----	-----	-----
rs41287502	1,12	1	1	0	2
rs2986016	23,03	3	17	9	25
rs729211	32,02	41	43	45	28
3555G>GA	1,12	-----	-----	-----	-----

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, ‘Endoplazmik retikulum zarında bulunan ve hücrelerde kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan CALHM1 gen ürününün işlevini etkileyebilecek mutasyon veya polimorfizmlerin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceği’ hipotezi üzerine gerçekleştirildi. Bu hipotez üzerine CALHM1 geninin protein kodlayan bölgesinin DNA dizisindeki farklılıkları araştırmayı hedefledik. Bipolar bozuklukla ilişkili olabileceğini düşündüğümüz CALHM1 geninin protein kodlayan bölgesinin mutasyon ve polimorfizmler yönünden araştırılması ve eğer varsa hastalıkla ilişkilerinin yorumlanmasını amaçladık.

Araştırmanın örneklemini Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına gelen, DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition) bipolar bozukluk tanı kriterlerine uygun olarak tanı konmuş 40 hasta ve 10 hasta yakını, ekson 1 için olan çalışmada 39 gönüllü kontrol birey ekson 2 için olan çalışmada 38 gönüllü kontrol bireydir.

Çalışmanın hasta grubu, sağlıklı kontrol grubu ve birinci derece akraba grubu oluşturulurken; birinci derece akraba ve sağlıklı gönüllü gruplarının bipolar bozukluk hastalığı veya herhangi bir belirgin hastalığı olmayan bireylerden oluşturulmasına, hasta grubunun bipolar bozukluktan başka herhangi bir hastalığı olmamasına, sağlıklı gönüllü grubunun cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubu ile benzer olmasına dikkat edildi.

CALHM1 sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu ve kalsiyum iyonu geçirgenliğini düzenlemektir. İyon seçicilik bölgesinde NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörü ile yapısal benzerlik gösterdiği ve Amiloid Prekürsör Proteininin (APP) proteolizisini ve agregatlaşmış amiloid-beta peptitlerinin seviyelerini kalsiyum iyonuna bağımlı olarak kontrol ettiği araştırmalarla gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığı APP’nin proteolizisi tarafından üretilen agregatlaşmış A-beta peptitlerinden oluşmuş serebral yaşlılık plaklarının varlığı ile karakterizedir. Bu bulgular ışığında bazı çalışmalar ve meta-analizler CALHM1 genindeki varyantlarının, özellikle P86L SNP’nin, kalsiyum geçirgenliğini düşürüp Aβ üretimini arttırarak geç-başlangıçlı Alzheimer hastalığına yatkınlığı etkilediğini öne sürmüştür.

Bu çalışmada CALHM1 geninin protein kodlayan bölgesindeki mutasyon/polimorfizmleri araştırdık. Bunun nedeni bipolar bozukluklu hastalarda CALHM1 iyon

kanalının yapısında, bu kanalın fonksiyonunu etkileyebilecek mutasyon/polimorfizm'in olup olmadığının araştırılmak istenmesidir.

Çalışmamızda CALHM1 geninde toplam 15 SNP saptanmıştır. Bu SNP'lerden altı tanesi daha önceden tanımlanmış SNP'lerdir. Bu SNP'lerin bipolar bozuklukla herhangi bir ilişkilerinin olup olmadığı daha önce değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada veri tabanlarında bulunmayan dokuz yeni SNP saptanmıştır.

Bugüne kadar CALHM1 geni ile bipolar bozukluğun ilişkisini araştıran bir çalışmanın olmayışı nedeni ile bu çalışma CALHM1 geni ile bipolar bozukluk hastalığının ilişkisini araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir.

Çalışmada en sık rastlanan ve MAF değeri en yüksek iki SNP'den biri olan rs729211 CALHM1 geninin 2. Eksonu'nda 3' UTR bölgesinde bulunmaktadır. Literatürde bu SNP ile ilgili bir adet çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmada bu SNP'in Alzheimer hastalığı ile olan ilişkisi araştırılmış, ancak böyle bir ilişki gösterilememiştir.-Bu SNP'nin minör alleli olan guanin bazı 35 kişide heterozigot olarak, 11 kişide homozigot olarak, toplamda 46 kişide gözlemlendi. Çalışmamızda guanin allelinin frekansı %32,02 olarak bulundu. Bu SNP için guanin allelinin frekansı 1000 genom projesinin verilerine göre Afrika popülasyonunda %41, Amerika popülasyonunda %45, Asya popülasyonunda %45, Avrupa popülasyonunda %28 olarak bulunmuştur [www.1000genomes.org/ 2013]. Türk popülasyonunda yaptığımız bu çalışmada rs729211 SNP MAF değeri Avrupa popülasyonunun MAF değerine yakın bulunmuştur.

Çalışmada ikinci en sık rastlanan SNP rs4918016'dir. Bu SNP proteinin topolojik domaininde potansiyel sitoplazmik bölümündedir. Literatürde sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığı ile CALHM1 geni arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, bu SNP'in homozigot varyantının hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu SNP CALHM1 geninin 1. Eksonu'nda bulunur. Bu SNP'nin minör alleli olan adenin bazı 33 kişide heterozigot olarak, 12 kişide homozigot olarak, toplamda 45 kişide bulundu. Adenin allelinin frekansı çalışmada %32,02'dir. Bu değer çalışmada bulunan en yüksek iki MAF değerinden biridir. 1000 genom projesinin verilerine göre adenin allelinin frekansı Afrika popülasyonunda %22, Amerika popülasyonunda %40, Asya popülasyonunda %44, Avrupa popülasyonunda %29 olarak bulunmuştur [www.1000genomes.org/ 2013]. Türk popülasyonunda yaptığımız bu çalışmada rs4918016 SNP MAF değeri Avrupa popülasyonunun MAF değerine yakın bulunmuştur.

Çalışmada üçüncü en sık rastlanan SNP rs2986017'dir ve pro86-leu (P86L) sübstitüsyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu SNP proteinin topolojik domaininde potansiyel sitoplazmik bölümündedir. CALHM1 geninin 1. Eksonu'nda bulunur. Bu SNP'nin minör alleli olan timin bazı 27 kişide heterozigot olarak, dokuz kişide homozigot olarak, toplamda 36 kişide bulundu. Çalışmamızda timin allelinin frekansı %25,28 olarak bulundu. 1000 genom projesinin verilerine göre timin allelinin frekansı Afrika popülasyonunda %3, Amerika popülasyonunda %19, Asya popülasyonunda %8, Avrupa popülasyonunda %26 olarak bulunmuştur. Türk popülasyonunda yaptığımız bu çalışmada rs4918016 SNP MAF değeri Avrupa popülasyonunun MAF değerine yakın bulunmuştur. Literatürde CALHM1 ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında rs2986017 SNP, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. 2009 yılında yapılan bir çalışma da ise rs2986017 SNP'i ile geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı arasında her hangi bir ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda toplam 15 SNP bulunmasına karşın bu SNP'lerden sadece bir tanesi anlamlı olarak bipolar bozukluk hastalarında kontrol grubuna göre daha fazla görülmüştür. Bu SNP daha önce veri tabanlarında tanımlı olmayan ve çalışmamızda yeni bulduğumuz 360G>GA (p=0,04) SNP'dir. 360G>GA proteinde 75. aminoasite denk gelmektedir GTG→ATG değişimine yol açar. Valin aminoasidini metiyonin aminoasidine dönüştüren bir SNP'dir. 360G>GA SNP'i proteinin topolojik domaininde yer alan sitoplazmik bölümündedir.

Çalışmamızın denek grubu sayıca azdır fakat 661T>TA SNP'i hariç çalışmada saptanan tüm SNP'ler Hardy-Weinberg dağılımına uygundur.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre bipolar bozukluk ve CALHM1 geninin protein kodlayan bölgeleri arasında daha önceden tanımlanmış SNP'ler açısından olmasa da yeni bulunan ve hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösteren 360G>GA SNP açısından bir ilişki olabileceği düşünülebilir.

Hasta grubu ve akraba grubu arasında bu SNP'lerin allel frekansları açısından yapılan istatistiksel analiz hasta grubunda akraba grubuna göre hiçbir SNP minör allelinin anlamlı bir artış göstermediğini ortaya koymuştur. Akrabalarda bipolar bozukluk hastalığı belirlenemediğine göre bu sonuç bize bulunan SNP'lerin hastalıkla ilişkili olmadığını düşündürebilir. Üç farklı SNP ve 360G>GA SNP'inde örneklemde seçilen hasta ve akraba grubunun hiçbirinde SNP bulunmamaktadır. Bu SNP için istatistik programı herhangi bir p değeri vermemiştir. CALHM1 genindeki SNP'ler ve bipolar bozukluk arasındaki ilişkinin daha iyi değerlendirilmesi için denek sayısının arttırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı bipolar bozukluk hastalarında CALHM1 geninin protein kodlayan bölgelerinin mutasyon/polimorfizmler yönünden araştırılması ve bulguların hastalıkla olan ilişkisinin yorumlanmasıydı. Bu amaç doğrultusunda bipolar bozukluk tanısı konmuş 40 hasta, 10 birinci derece akraba, 1. ekson için 39 2. ekson için 38 sağlıklı gönüllü birey çalışmaya alındı. Bu deneklerin gDNA'sında CALHM1 geni PCR ile çoğaltılıp DNA dizi analizi yapıldı. Saptanan 15 SNP'den sadece ' 360G>GA SNP'nin allel frekansı hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark gösterdi.

Hipotezimizi, 'Endoplazmik retikulum zarında ve hücre membranında bulunan ve hücrelerde kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan CALHM1 gen ürününün işlevini etkileyebilecek mutasyon veya polimorfizmlerin bipolar bozukluk ile ilişkili olabileceği' şeklinde kurmuştuk. Hasta grubu ve akraba grubu arasında hiçbir SNP'nin allel frekansında anlamlı sonuç bulunamadı fakat 360G>GA SNP açısından istatistik programı herhangi bir p değeri vermemiştir. Sonuç olarak CALHM1 geninin 1. Eksonunda bulunan 360G>GA yeni SNP'nin allel frekanslarının hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermesi ve bu SNP'lerin proteinde aminoasit değişimine neden olması çalışmamızın hipotezini doğrulamaktadır.

Çalışmanın devamında CALHM1 proteininin beyindeki ekspresyon değişimine bakmak anlamlı olabilir. Bu çalışmada bulunan SNP'lerin daha çok denekle yapılan ve sadece Türk popülasyonundan değil daha farklı popülasyonlardan oluşan bir çalışmada tekrar araştırılması bize genin hastalıkla ilişkisi açısından daha açıklayıcı sonuçlar verebilir.

7. KAYNAKLAR

- American Psychiatric Association (APA). DSM-IV-TR Official Site <http://www.psychiatry.org/>
- Andreas Marneros, Frederick Goodwin Bipolar Disorders: Mixed States, Rapid Cycling and Atypical Forms Cambridge University Press 2005
- Aqdam MJ, Kamali K, Rahgozar M, Ohadi M, Manoochehri M, Tahami A, Bostanshirin L, Khorshid HR. Association of CALHM1 Gene Polymorphism with Late Onset Alzheimer's Disease in Iranian Population. Avicenna J Med Biotechnol. 2010 Jul;2(3):153-7.
- Beecham G.W., Schnetz-Boutaud N., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. Ann. "CALHM1 polymorphism is not associated with late-onset Alzheimer disease." Hum. Genet. 73:379-381(2009)
- Bertram L., Schjeide B.M., Hooli B., Mullin K., Hiltunen M., Soininen H., Ingelsson M., Lannfelt L., Blacker D., Tanzi R.E. "No association between CALHM1 and Alzheimer's disease risk." Cell 135:993-994(2008)
- Bienvenu OJ, Davydow DS, Kendler KS. Psychiatric 'diseases' versus behavioral disorders and degree of genetic influence. Psychol Med. 2011;41(1):33–40.
- Boada M., Antunez C., Lopez-Arrieta J., Galan J.J., Moron F.J., Hernandez I., Marin J., Martinez-Lage P., Alegret M., Carrasco J.M., Moreno C., Real L.M., Gonzalez-Perez A., Tarraga L., Ruiz A.J. "CALHM1 P86L polymorphism is associated with late-onset Alzheimer's disease in a recessive model." Alzheimers Dis. 20:247-251(2010)
- Brand S, Angst J, Holsboer-Trachsler E. Is the increase of hypomanic stages during adolescence related to gender and developmental tasks? World J Biol Psychiatry 2010; 11:594-602.

- Bräunig P, Krüger S, Shugar G. Prevalence and clinical significance of catatonic symptoms in mania. *Compr Psychiatry*. 1998 Jan-Feb;39(1):35-46.
- Calero O, Bullido MJ, Clarimón J, Hortigüela R, Frank-García A, Martínez-Martín P, Lleó A, Rey MJ, Sastre I, Rábano A, de Pedro-Cuesta J, Ferrer I, Calero M. Genetic variability of the gene cluster CALHM 1-3 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2012 Sep-Oct;6(4):407-12. doi:10.4161/pri.20785. Epub 2012 Aug 9.
- Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet*. 1999 Aug;36(8):585-94.
- Cui P.J., Zheng L., Cao L., Wang Y., Deng Y.L., Wang G., Xu W., Tang H.D., Ma J.F., Zhang T., Ding J.Q., Cheng Q., "CALHM1 P86L polymorphism is a risk factor for Alzheimer's disease in the Chinese population." *Chen S.D.J. Alzheimers Dis*. 19:31-35(2010)
- Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ, Rau NL. Genomewide linkage analyses of bipolar disorder: A new sample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Am J Hum Genet* 2003; 73:107-114
- Dr.Olga Gökbulut İstanbul-2008 BİPOLAR HASTALIKTA ALKOL-MADDE KULLANIMI VE ANKSİYETE BOZUKLUĞU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN SAPTANMASI (Uzmanlık Tezi)
- Dreses-Werringloer U., Vingtdeux V., Zhao H., Chandakkar P., Davies P., Marambaud P.J. "CALHM1 controls Ca²⁺-dependent MEK/ERK/RSK/MSK signaling in neurons." *Cell Sci*. 126:1199-1206(2013)
- Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.-C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., and 9 others. A polymorphism in CALHM1 influences Ca(2+) homeostasis, A-beta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* 133: 1149-1161, 2008.
- Dursun M. Bipolar Bozukluklarda Kişilik Özellikleri MALTEPE ÜNİVERSİTESİ □ SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ, Psikoloji, İnsan Bilimleri □ ve Felsefe Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi 2008 □

- Feher A., Juhasz A., Rimanoczy A., Pakaski M., Kalman J., Janka Z. "No association between CALHM1 polymorphism and Alzheimer's disease risk in a Hungarian population." *Psychiatr. Genet.* 21:249-252(2011)
- Fountoulakis KN. The possible involvement of NMDA glutamate receptor in the etiopathogenesis of bipolar disorder. *Curr Pharm Des.* 2012;18(12):1605-8. Review.
- Gallego-Sandin S., Alonso M.T., "Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress." *Garcia-Sancho J. Biochem. J.* 437:469-475(2011)
- Goodnick PJ. The use of nimodipine in the treatment of mood disorders. *Bipolar Disord.* 2000 Sep;2(3 Pt 1):165-73
- Green KN, LaFerla FM. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron.* 2008 Jul 31;59(2):190-4. doi: 10.1016/j.neuron.2008.07.013. Review.
- Grunze H. The clinical side of bipolar disorders. *Pharmacopsychiatry* 44(Suppl. 1), S43–S48 (2011).
- H. Kaplan BS, J. Grebb. *Synopsis of Psychiatry.* New York; 1994.
- <http://www.1000genomes.org/> 2013
- http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000185933;r=10:105213144-105218645;t=ENST00000329905 2013
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255022> 2013
- http://www.nextprot.org/db/entry/NX_Q8IU99/sequence 2013
- <http://www.omim.org/entry/612234> 2013
- <http://www.who.int/classifications/icd/en/> 2013
- Inoue K., Tanaka N., Yamashita F., Sawano Y., Asada T., Goto Y. "The P86L common allele of CALHM1 does not influence risk for Alzheimer disease in Japanese cohorts." *J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153:532-535(2010)

- Işık E. Depresyon ve Bipolar Bozukluklar.2003;1.Baskı, Ankara, Görsel Sanatlar Yayınevi, S:467-483
- Kennedy N, Boydell J, Kalidindi S, Fearon P, Jones P B, van Os J et al. Gender differences in incidence and age at onset of mania and bipolar disorder over a 35-year period in Camberwell, England. Am J Psychiatry 2005; 162:257-262.
- Kessing LV. Gender differences in the phenomenology of bipolar disorder. Bipolar Disord 2004; 6(5):421-425
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 2007 Jul;8(7):499-509. Review.
- Lambert J.C., Sleegers K., Gonzalez-Perez A., Ingelsson M. at all "The CALHM1 P86L polymorphism is a genetic modifier of age at onset in Alzheimer's disease: a meta-analysis study. Alzheimers Dis. 22:247-255(2010)
- Ma Z., Siebert A.P., Cheung K.H., Lee R.J., Johnson B., Cohen A.S., Vingtdeux V., Marambaud P., "Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca²⁺ regulation of neuronal excitability."Foskett J.K.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109:E1963-E1971(2012)
- Manning JS, Cannon PD, Sahai A. The bipolar spectrum of depression in primary care. Arch Fam Med, 1998; 7: 63- 71.
- Minster R.L., Demirci F.Y., DeKosky S.T., Kamboh "No association between CALHM1 variation and risk of Alzheimer disease." M.I.Hum. Mutat. 30:E566-E569(2009)
- Moreno-Ortega AJ, Ruiz-Nuño A, García AG, Cano-Abad MF. Mitochondria sense with different kinetics the calcium entering into HeLa cells through calcium channels CALHM1 and mutated P86L-CALHM1. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):722-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.127. Epub 2009 Nov 26.

- Moyer B.D., Hevezi P., Gao N., Lu M., Kalabat D., Soto H., Echeverri F., Laita B., Yeh S.A., Zoller M., "Expression of genes encoding multi-transmembrane proteins in specific primate taste cell populations." *Zlotnik A.PLoS ONE* 4:E7682-E7682(2009)
- Nacmias B, Tedde A, Bagnoli S, Lucenteforte E, Cellini E, Piaceri I, Guarnieri BM, Bessi V, Bracco L, Sorbi S. Lack of implication for CALHM1 P86L common variation in Italian patients with early and late onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(1):37-41. doi: 10.3233/JAD-2010-1345.
- Niculescu AB, Kelsoe JR. Finding genes for bipolar disorder in the functional genomics era: From convergent functional genomics to phenomics and back. *CNS Spectrums* 2002; 7:215-226.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86.
- Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res* 2005;15:97-8.
- Shibata N, Kuerban B, Komatsu M, Ohnuma T, Baba H, Arai H. Genetic association between CALHM1, 2, and 3 polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(2):417-21. doi: 10.3233/JAD-2010-1380.
- Siebert A.P., Ma Z., Grevet J.D., Demuro A., Parker I., "Structural and functional similarities of calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) ion channel with connexins, pannexins, and innexins." *Foskett J.K.J. Biol. Chem.* 288:6140-6153(2013)
- Sleegers K., Brouwers N., Bettens K., Engelborghs S., van Miegroet H., De Deyn P.P., Van Broeckhoven C. "No association between CALHM1 and risk for Alzheimer dementia in a Belgian population." *Hum. Mutat.* 30:E570-E574(2009)
- Sullivan PF, Magnusson C, Reichenberg A, et al. Family history of schizophrenia and bipolar disorder as risk factors for autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2012;69(11):1099–1103.

- Szczepankiewicz A. Evidence for single nucleotide polymorphisms and their association with bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:1573-1582. Epub 2013 Oct 11. Review.
- Tan E.K., Ho P., Cheng S.Y., Yih Y., Li H.H., Fook-Chong S., Lee W.L., Zhao Y. "CALHM1 variant is not associated with Alzheimer's disease among Asians." *Neurobiol. Aging* 32:546.e11-546.e12(2011)
- Tanzi RE, Bertram L. Alzheimer's disease: The latest suspect. *Nature*. 2008 Aug 7;454(7205):706-8. doi: 10.1038/454706a.
- Taruno A, Matsumoto I, Ma Z, Marambaud P, Foskett JK. How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel. *Bioessays*. 2013 Dec;35(12):1111-8. doi: 10.1002/bies.201300077. Epub 2013 Sep 17.
- Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., Koppel, J., Davies, P., Civan, M. M., Chaudhari, N., Matsumoto, I., Hellekant, G., Tordoff, M. G., Marambaud, P., Foskett, J. K. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495: 223-226, 2013.
- Turhan N. Bipolar Bozukluk: Kesitsel Bir Değerlendirme, Uzmanlık Tezi, 2007
- Vega P, Barbeito S, Azua SR, Cengotitabengoa MM, Ortega IG, Saenz M et al. Bipolar disorder differences between genders: special considerations for women. *Womens Health (Long Engl)* 2011; 7:663-674.

8. EKLER

EK 1 : CALHM 1 sekansı, eksonları, primerlerin oturduğu bölgeler, protein kodlayan bölgeler

GGCCACAGCCCCCTGCCAGGCAACTTATCAAATTCAAGTCCTCTGCCAGCAAATCCAGGA
TGTTTCATTCTACGCCACGTCCACATTAGCACCATCCCCCTGCACCACCACCTGCCATCCCC
TCTGTGGCTAGTATCCCCACGACCACCAGCAGCACCCCTCACTGCAGCCACCACCACCGCA
GCACCACACCGTCATCGGGGAACTGATGGAGGAGCCCTCTAGGATTCTGATACAGCATGG
AGGAGACCCCCAGTGGGAAGGGCAAAAGGAGGGCGATGAGCTTCCTAGGAGCCCAGAAGA
CAAGGTCCAGGACCTCAGGCCCTGCAGCAGCCCTGGACTCTCCAACTCCAGCCCTGCT
GGAGACAGTGTCTTCCCAGTCTGTGTCTGAGCCTTCTCTCCCGCCCCCTCCCTCCCTCCCT
CCCACACCCACAGAAAGCTGGTCTCTAGCAGGTGCTAGCGCCGGAGGTGGAGGCGGCTGC
AGAGAGAGAGAAGCCCAGGAGGGAGGGGCACAGCCCTGGCTGAACCCACAGGATTGGTCA
ATCTGCATCCTCTCAGCCAGCACCTGACTAAAGATTCCCTCAAAGCGACAGTGACCTCAGC
CTCTGCTCTGAGCTCTGTGGTCCCAGCCAGGAGAGCCCCGAGTCATGAGGTGGGCACCCA
GTGGGCAGGGTGGGCAGCAGGGGCCCTCTTGGAGGCAGCAGTGAGTTGGGAAGAGGAGGC
CGGGCCCCACAGCGGGCATGATGGACAAGTTCCGGATGATCTTCCAGTTCTGCAGTCCA
ACCAGGAGTCCTTCATGAATGGCATCTGTGGCATCATGGCCCTGGCCAGTGCCCAGATGT
ACTCGGCCCTTCGACTTCAACTGCCCTGCCCTGCCGGGCTACAATGCAGCCTACAGCGCGG
GCATCTGCTGGCGCCACCCCTGGTGCTCTTTCTGCTTGGCCTGGTCATGAACAACAACG
TGTCCATGCTGGCCGAAGAGTGGAAGCGGCCGCTGGGCCGCCGGGCCAAGGACCCCGCTG
TGTTGCGCTACATGTTCTGCTCCATGGCCCAGCGCGCCCTCATCGCGCCTGTCTGTGGG
TGGCCGTCACGCTACTCGACGGCAAATGCTTCCTCTGTGCCCTTCTGCAC'TGCCGTGCCCG
TGAGCGCACTGGGCAACGGCAGCCTGGCACCCGGCCTTCCTGCCCCGAGCTCGCCCCGCC
TGCTGGCCCCGGGTGCCCTGCCCTGAGATCTACGATGGCGACTGGCTGTTGGCCCCGAGAGG
TGGCCGTGCGTTACCTCCGCTGCATCTCCCAGGTGAGGGGGCCGCATGGCTTCACGCTGGG
TCTCCCTGGCAGATCAAGGTCCCTCTGGGAGGGCCCTATCCCCCTACCTCTCAAATGGG
GCCTCTGCTCAGGTGGAGCTCCGAGGTGTGGGGGGCATCTTCCCAACTGAGGCTGAAGGC
AGAGCCACGCATCTGCCCTCAGCCCAGGGCCATCCGAGAACGTGCTTTGGCTCCCTCTG
TCCAGAGGCTTCTGGTGAGTGGGCCTGACCCCTATCCTGAGGTCCCCAGAGTGAGCCTGC
ATCCCCATCCTGATTTCTGAGCTTGGAAGCTGGAGGAATTTGCATGCTTTCCCTCTTCCG
GGCCTCGGCAGTGGTGAGGCCAGTGGGTGGCTAGGCCATTTGGGTACATTTCCCTAGCAA
ATGCCCCCATCTGGTGCTTCCCTGCTGGGGAGTGGGAGCTGAGGACCAGGGTGTCTGGA
AGGGGGTGATGGGTGAGAGAGAGGAGGCCCTGTTGGGATGTGATGGAAAGGCAGTTTGG
AGAGACCACTGACGGGTGAGCCAGAGTGAGGGTCCTCCCCAGCCCTACTCCACATCCTC
TGCCCCCTCCATGCTCACCCATCCAAGCCTCTCGGGCCTTCTCCAACCCAGTCAGTGCCGT
GTGGGGAGGACCACCCAGGCAGCCTGCCCTCACAGCTGGCAGACCAGGTGCTGTGAGGGC
GAGGGGCTGGGGCCAGCCTGCTCTGCAAGGACTGGAGAAACGTGCACACTCTGCCCTGGC

AAGTCCAGACACCCCTGGCTTCCCACTCTAGCAGGGGCTCTCTCCTGGGAGGCCTCTGT
CACCACCCAGATGACCTTGGTGAATGTCATGCTCTAAGCATCCCGACTGAACTCTACTTC
CCTCTCCTCCCTAACCTGTGCCCTCTCTCCTGTGGGCACTCATCCCATCGTCCCCGGCCT
CAGGGCCTTGGCAGCTGTCATTCCACCTGACCTTTAAGCCACCACATCATAAGCTGAGAG
GGCCCCAGAGGCCACAGGCTGCCTGGCCTATACATGTTTCATTTGGCCTTCAGAGACTGA
ATTCTAGATTCAACTTTAGAATTTGTTGGCATCTTCTAAAAACCAGAATGGGCCGGGTAC
GATGTGCCCTCATGTCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAAGAAGATTGCTAGA
GCCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTAGGGAATATAGTGAGACCCTGTCTCCAAAAAAGAAAA
GAAAAGAAAAAATTAGCCAGGCTTGGTGGCACATGCCTGTAGTCCCAGCTACACAGGAA
GCTGAAGTGAGAGGATTGCTTGAGCCTGGGAGGTCAAGGCTGCAGTGAAATGTAATTGTG
CCACTGCACTCTGGCTTGGGTAACGGAGTAAGACCTGTCTCAAAACAAAAAAGTAAATAA
GATTAAAAATAAAAAATCGGAATTTTTTACATAAAAAATCAGATTTTCAAGTTGGAAATCCAG
AAAAATCCAGCCCCACCAGGCCCGGTGTACTCCTGGAACAGGCTGGGGTGGCCCCAGCCT
ATGCACATGCTCAGTGGCTCCCCACCCCGTGTGCTCTGTACGACCTGCCTGGCCCCATA
GGCATCTGGGCTTGCCCTCAGCCCCAGTCTGATCTGCCCAAGTGCTTCTCTGTGCGGCT
GGGGCCTAACCCCTGAAGCGTGGGCCAGGGGAGCATCCTGCCCCGTGCCCTGCAGTGAGGT
GACAGAGCAGAGCTGGAACCAAGCGCAGGGTGCTCTTCAGCGCAGAGTTTGATTTCTTGC
CTGATTCGCTCTATGACCCCTGAAGGCCCAGCTCAGAACCGACACAGAGGAGGTGCTCA
TTTGGCACTGGTGACAATACTAGGAGCCAAAGGAGAGGTTTCAAGACTCAGAGGAAAATGG
GCCACTATGGCCTGGGGAGATCAAGGAAGGCTTCCTGAAAGAAGAGGCACAGTAAGTAAG
TGAGGGCCTATTGGCACAACAGTAATGGTTAATAGTCACTGAGCACTGGGTACCAGGCAC
TGCACTAAGCTTATCACATTCAGTCCTCACAACAACACTCTGAGATAGGTGCTACCACCA
GCTGCTTTATAGGTGTGGAAGCTGAGGCACAGAGAAGTTGAGTGCTTTGCTCCTGGTCAA
CTAGTAAATAGTGAGACAGCATTCAAACCCAAGCAGCCTAACTCCAGGGTCTGCCCCACT
TAACTCCTGGGCCCTGGGTGCCCCGCCAGCACGGTGGGTGCTTTACCCACGTGATCTTCT
TTCCATGAGGTGCACCTATCTCCATTATTTCAATTTCTATGCCATTTTACAGATGAGGA
AATGGAGGCCAAGAGGCAAGCTCACTTGCCCAATTTGTGCTCTTTGCCCTAGAGGCAGTG
GCATAGAGAGTGCTTTGGGAGTCTGAACAGGCTCGGAGGCCCAAGGACAGTGCCCCGTGA
CTCTCTCTCATCTTCCACAG**GCGCTGGGCTGGTCCTTCGTGCTGCTGACCACTCTGCTG**
GCATTTCGTGGTGCGCTCTGTGCGGCCCTGCTTCACGCAGGCCGCCCTTCCTCAAGAGCAAG
TACTGGTCCCACTATATCGACATCGAGCGCAAGCTCTTCGACGAGACGTGCACGGAGCAC
GCCAAAGCCTTTGCCAAGGTCTGCATCCAGCAGTTCTTCGAGGCCATGAACCATGACCTG
GAGCTGGGTACACCCACGGGACACTGGCCACGGCCCCCTGCTTCCGCAGCTGCCCCACG
ACCCCCGATGGTGCGGAGGAGGAAAGGGAGAAAGCTGCGTGGCATCACGGATCAAGGCACC
ATGAACAGGCTGCTCACGAGCTGGCACAAATGCAAACCGCCTCTGCGGCTGGGCCAGGAG
GAGCCACCGCTGATGGGCAACGGCTGGGCTGGGGTGGGCCCCGGCCTCCGCGTAAGGAG
GTGGCCACCTACTTCAGCAAAGTGTGAGGTGTGGCCAGCTGAAGAGGCAGGAACGGGGAT
CTGAGCCACAGCCCCCTCCAACCCCCAAACCAGGTGGAAAAAGGAAGGGTTTCAAGTGCTG
GGCAGTACTCCCTAGGCAGATCCCACTCCCTAGCACTCGCCTGCCCATTTGGAGGCAGG

AAATTTGGAGCTGGAAGGGGATCTGATGCCTTCAGGTGTGACACTGCCCTGGATGGCCCT
 AGGGCAGTGGGCCCATGAGCAGTATTAGTCTAAAGGGGTCGGAACGTGCATGGCAGGTAC
 AGGGACCAATGGCTCCCCCTGCCCCAGCCCTTCCCAGGCTGATGTTCACTGTCTCCTCCC
 AGGTTCAACAGACATCCCTGCCCCAGGGTCCACCCTCGTCTGTGGCTGTTCAGTACCTCT
 CTTCCCTTTATGCTCCGGGCTCGGGGAGTGGGAATCATCAGGCGTCTCATGAAGTGGGAGC
 CCTCTGATTTGGGCAAGCGTGTCTAGGTGAGACTGGGTGTGCCGGGGCAGGTCCATAAG
 GACATGACACACAGCCTACCTGGTGTGACACACCTGGGGTGACAGGCGATGAGACAAGAT
 GTCAGAAGCTAGGTTACATGGAAGAGGTGAGAGTGTGTGGTCACCATGGGGGTGATGTG
 ACAATTGTCCAGGTGGACTGCATGTTTATTTAGCACAAACCAAGCACAAAAGTCC'TCCTG
 TAGAGGGGTCTTTGAAAAACCACCTTAATACCCCCGTACATCCAGGTCTCCAGGGGAAA
 TCAGACCATCCCCAAGGCTTGAGAAGTTAGACACAGAAGCTGAAGTCTCTCCATTTTTCT
 CAAAGACCCACCTCTTGGGGATGGAGTTC'TAAGAGGCTAAGAGGAGCTCCAAGGCTCTA
 GCCCAGGTGGGATGAGGGTGGAGGAGAGCAGTGTAAAGAGAAAGCAGCTCAGATTCAGA
 GTGAGACAGAACTGGGTCAAATGGTGTCTCTACCACTCACAAACCTGTCCCTGGGCCAG
 CTGCATCACTGCCTGTGCCTTCGTTTCTTCATCTATACAATGAGGATGAGGCCCCCCCGG
 CCCGCCATCATGGGGTTGCTGTGTGTAAAGCACATGGCACATAGTAGGCACCCAGCACAA
 GGGTGGCTAATGTATTTGTTGATTTCTGAACCTAAGGACTTCCTTCCTCCTCCCCTGGGC
 AGGGATGAGACAGCAACACAAACACTCGAGCTTCCATCTTGTGAGGAGGAAACAGAGGT
 ACAGATAGGTTTCTCAGCACCGCCCTCAGCTCTGAGACATAAGTCCCAAGCATCTAAGGA
 TTCATTTTGATCTTGGCATGATTCCATCCTTTTTTTATCCATCCTTCCCTCTATTCCCCT
 TCTGGGGTCCAGTTTCCCTCCTCTTAATTATTTGGGAGGAGTTGCTCAGATCTTTGTGGG
 CCAAGGTGGGCTGGGAGGGCTCTTCCAGGAGGTAGGAGTTGGTATGGGCCCTGAAGTCAG
 GGAGGATTAGGATGAGCAAAAAACAAGGTGTATGTTGGTGGGTGGCAGCACTTCCAGTGG
 GAAGAGAAGGCCCGGAGGTATCAGGAGGTACAAATGTGATGAAGAGCAAAGCTTTGGGTC
 AGGCACACCTGAGTTCAAATACCAGCACTGCAGGACTTGTGGCCAGTCACCCAGCCACTC
 TAAGCCTCAGTGTGTCTGTCTATAAAATGGATATTAGAAGACCTGC'TTGGCCAGGCGGAG
 TGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCCAAGGAGGGAGGATCAC'TTGAGCCTG
 GGAGTTGGAGACCAGCCTGGGCAACATAGCAAGACTCTGTCTCTGTAAAGTAATAATAAT
 AATAAGAAGAAGAAGAAGAAATAAAGAGAAGATTTATAATTTT'TTTAAAATGAAAAATTA
 TTTTTTAAAAAAGACCTGATTTTCAGGATTGTGGTAAGGATAGAGGAAGATAACTTTTAG
 GGAAGGATCTGGGACTGTGTTTAGCACATGCTGGGATCTGAAACAAACAAATAAACAAGC
 AGAACTTGGTACCTTTTCTTTCCTTCGTACATATGGTCAAGCCCAGCTCAGGGAGGCCAG
 CGGGTCACTCGGCAGCTCCACCATGACGGAACCACGAGCACTGCAGAGCTGACAGATGTC
 GGGGGTCTCTCCCTCCATGCTAAGGGTCATCTAGCCTGTCCGTAGACTCTCCTGTGCAG
 CATTCTGACCCGTGACGCTTCAGCCCGCATCTTGACCACTTTTAGATACAGGCTGGGCA
 GCTCTGATTATTACACAGGGCTTCCTTCAGAAACCTGCCTCCTTGTAAC'TTTCACCCACC
 AGTTGGAGCTCTGCCTGCAGGACCCGGAGAATCCCTAGGCTCCTGAATTCAATCCTCAGC
 CCTCCAGGGATCCGAAGCAGGTCCCGGGGAGTTAGCTGACTATAGGTCAAAGAGTCAGCA
 TTGGGGATGGTTTGTCCAGTCAATGGACAACTCTGAGGGAGA

EK 2: Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/05- 11	Tarih:25.02.2011
	Prof.Dr.Meral SAKIZLI'nın sorumluluğu olduğu "Bipolar Bozukluk (BD) Olgularında GDNF (glia kökenli nörotropik faktör) ve CALHM1 (kalsiyum homeostaz düzenleyici faktör) Genlerinin SNP (Polimorfizm) ler Yöntünden İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
CALISMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Besit ÖSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhai BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Ünvan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İhtisap Odası Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

EK 3 : GENETİK ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

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

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

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

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

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

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

<u>Hastanın:</u>	<u>Velisinin ya da Vasisinin:</u>	<u>Araştırmacının:</u>
Adı:	Adı:	Adı:
Soyadı:	Soyadı:	Soyadı:
Tarih:	Tarih:	Tarih:
İmza:	İmza:	İmza:
<u>Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin:</u>		
Adı:	Tarih:	
Soyadı:	İmza:	

EK 4: ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : DUYGU ARSLANTAŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	21434307992
Doğum Yılı:	1984
Yazışma Adresi :	
Telefon :	0 505 264 54 95
Faks :	
e-posta :	duyguaybay@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TÜRKİYE	EGE ÜNİVERSİTESİ	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA		2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
