

**Gama Amino Butirik Asit (GABA) reseptörlerinin genetik polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi arasındaki ilişkinin araştırılması**

**Proje No: 210T117**

Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN  
Prof. Dr. Orhan ADALI  
Yrd. Doç. Dr. Vedat Semai BEK  
Ezgi EROĞLU  
Yağmur MIÇOOĞULLARI

ŞUBAT 2012  
ANKARA



## ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu projede gama aminobütirik asit (GABA) reseptörlerinden GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B1</sub> ve GABA<sub>B2</sub>'yi kodlayan genlerde bulunan bazı tek nükleotit polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) ve/veya psikojenik non-epileptik nöbetler (PNEN) arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. 196 İJE hastası, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrolün dahil edildiği çalışma sonucunda elde edilen veriler, Türk popülasyonunda ilk kez incelenen bu polimorfizmlerin tek başına İJE veya PNEN için risk faktörü olmadığını, öte yandan bazı genotiplerin birlikte bulunması epilepsi riskini azalttığını ortaya koymuştur.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Önsöz.....	2
İçindekiler.....	3
Tablo Listesi.....	5
Şekil Listesi.....	6
Özet.....	8
Abstract.....	9
1. Giriş .....	10
2. Genel Bilgiler.....	10
3. Gereç ve Yöntem.....	21
3.1. Örnekleme ve kanların toplanması.....	21
3.2. DNA izolasyonu ve DNA'nın kalitatif ve kantitatif analizleri.....	21
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	22
3.3.1 GABA <sub>B2</sub> rs1999501 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
3.3.2 GABA <sub>B2</sub> rs967932 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
3.3.3 GABA <sub>B2</sub> rs3780428 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	27
3.3.4 GABA <sub>B2</sub> rs944688 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	29
3.3.5 GABA <sub>B1</sub> G1465A Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	30
3.3.6 GABA <sub>B1</sub> C59T Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	31
3.3.7 GABA <sub>A</sub> α1 rs2279020 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	33
3.3.8 GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
3.3.9 GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	35
3.4 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kırılması.....	37
3.4.1 GABA <sub>B2</sub> rs1999501 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	37
3.4.2 GABA <sub>B2</sub> rs967932 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	39
3.4.3 GABA <sub>B2</sub> rs3780428 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	41
3.4.4 GABA <sub>B2</sub> rs944688 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	42
3.4.5 GABA <sub>B1</sub> G1465A bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	44
3.4.6 GABA <sub>B1</sub> C59T bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	46
3.4.7 GABA <sub>A</sub> α1 rs2279020 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	48
3.4.8 GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	49
3.4.9 GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması.....	51
4. Bulgular .....	53
4.1 GABA <sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizmi.....	53
4.2 GABA <sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmi.....	53
4.3 GABA <sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmi.....	54
4.4 GABA <sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmi.....	55
4.5 GABA <sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmi.....	55
4.6 GABA <sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizmi.....	55



4.7 GABA <sub>A</sub> α1 rs2279020 tek nükleotit polimorfizmi.....	56
4.8 GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmi.....	56
4.9 GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmi.....	57
4.10 Kombine genotipler .....	57
4.10.1 GABA <sub>B1</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri.....	57
4.10.2 GABA <sub>B2</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri.....	57
4.10.3 GABA <sub>A</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri.....	59
5. Tartışma.....	60
Kaynaklar.....	64
Proje Özet Bilgi Formu.....	70

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması.....	12
<b>Tablo 2.</b> Epilepsilerin Moleküler Genetiğine İlişkin Örnekler.....	16
<b>Tablo 3.</b> GABA <sub>A</sub> α1, GABA <sub>A</sub> α2, GABA <sub>A</sub> α3, GABA <sub>B1</sub> ve GABA <sub>B2</sub> 'nin genetik polimorfizmlerinin Belirlenmesi.....	23
<b>Tablo 4.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu optimizasyonu için denenmiş MgCl <sub>2</sub> , dNTP, primer, Taq DNA polimeraz ve DNA konsantrasyonları.....	24
<b>Tablo 5.</b> GABA <sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	25
<b>Tablo 6.</b> GABA <sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	27
<b>Tablo 7.</b> GABA <sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	28
<b>Tablo 8.</b> GABA <sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	30
<b>Tablo 9.</b> GABA <sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	31
<b>Tablo 10.</b> GABA <sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	32
<b>Tablo 11.</b> GABA <sub>A</sub> IVS11 + 15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı .....	33
<b>Tablo 12.</b> GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	34
<b>Tablo 13.</b> GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı.....	36
<b>Tablo 14.</b> Epileptik hastalar, konversif ve kontrol bireylerin GABA <sub>B2</sub> rs1999501 genotip ve alel frekansları.....	53
<b>Tablo 15.</b> Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş ve kontrol bireylerin GABA <sub>B2</sub> rs967932 genotip ve alel frekansları.....	54
<b>Tablo 16.</b> Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA <sub>B2</sub> rs3780428 genotip ve alel frekansları.....	54
<b>Tablo 17.</b> Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA <sub>B2</sub> rs944688 genotip ve alel frekansları.....	55
<b>Tablo 18.</b> Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA <sub>B1</sub> C59T genotip ve alel frekansları.....	56
<b>Tablo 19.</b> Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA <sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) genotip ve alel frekansları.....	56
<b>Tablo 20.</b> IJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin ikili genotip kombinasyonları.....	57
<b>Tablo 21.</b> IJE hasta ve kontrol bireylerin ikili genotip kombinasyonları.....	58
<b>Tablo 22.</b> IJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin üçlü genotip kombinasyonları.....	58
<b>Tablo 23.</b> IJE hasta ve kontrol bireylerin üçlü genotip kombinasyonları.....	59
<b>Tablo 24.</b> IJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin dördü genotip kombinasyonları.....	59
<b>Tablo 25.</b> IJE hasta ve kontrol bireylerin dördü genotip kombinasyonları.....	59

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Gama aminobütirik asitin (GABA) yapısı.....	16
<b>Şekil 2.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs1999501 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	25
<b>Şekil 3.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs1999501 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	26
<b>Şekil 4.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs967932 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	26
<b>Şekil 5.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs967932 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	27
<b>Şekil 6.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs3780428 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	28
<b>Şekil 7.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs3780428 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	29
<b>Şekil 8.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs944688 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	29
<b>Şekil 9.</b> GABA <sub>B2</sub> geninin rs944688 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	30
<b>Şekil 10.</b> GABA <sub>B1</sub> geninin G1465A tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	30
<b>Şekil 11.</b> GABA <sub>B1</sub> geninin G1465A tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	31
<b>Şekil 12.</b> GABA <sub>B1</sub> geninin C59T tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	32
<b>Şekil 13.</b> GABA <sub>B1</sub> geninin C59T tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	32
<b>Şekil 14.</b> GABA <sub>A</sub> α1 geninin rs2279020 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	33
<b>Şekil 15.</b> GABA <sub>A</sub> α1 geninin rs2279020 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	34
<b>Şekil 16.</b> GABA <sub>A</sub> α2 geninin rs17852044 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	34
<b>Şekil 17.</b> GABA <sub>A</sub> α2 geninin rs17852044 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	35
<b>Şekil 18.</b> GABA <sub>A</sub> α3 geninin rs79829085 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı.....	36
<b>Şekil 19.</b> GABA <sub>A</sub> α3 geninin rs79829085 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	36
<b>Şekil 20.</b> GABA <sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotid polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	38
<b>Şekil 21.</b> GABA <sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotid polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	39

<b>Şekil 22.</b> GABA <sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	40
<b>Şekil 23.</b> GABA <sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	40
<b>Şekil 24.</b> GABA <sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	41
<b>Şekil 25.</b> GABA <sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	42
<b>Şekil 26.</b> GABA <sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
<b>Şekil 27.</b> GABA <sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	44
<b>Şekil 28.</b> GABA <sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
<b>Şekil 29.</b> GABA <sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	46
<b>Şekil 30.</b> GABA <sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
<b>Şekil 31.</b> GABA <sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
<b>Şekil 32.</b> GABA <sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	48
<b>Şekil 33.</b> GABA <sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	49
<b>Şekil 34.</b> GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	50
<b>Şekil 35.</b> GABA <sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
<b>Şekil 36.</b> GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
<b>Şekil 37.</b> GABA <sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	52

## ÖZET

Epilepsi tüm dünyada en yaygın görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Merkezi sinir sisteminin en önemli inhibitör nörotransmitteri olan gama aminobütirik asit (GABA) ve GABA reseptörleri epilepsi patofizyolojisinde sıkça anılmaktadır. GABA reseptörlerini kodlayan genlerde tespit edilmiş olan bazı tek nükleotit polimorfizmlerinin temporal lob epilepsiye yatkınlığı artırdığı bildirilmiştir. Etiyolojik sınıflandırma yapıldığında en geniş yeri (%65) tutan sebebi bilinmeyen (idiyopatik) epilepsiler ile GABA reseptör polimorfizmlerinin ilişkisini inceleyen çalışmalar çok kısıtlıdır. Türk popülasyonunda GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B1</sub> ve GABA<sub>B2</sub> reseptörlerinin genetik polimorfizmleri daha önce hiç çalışılmamıştır.

Bu nedenlerle, bu çalışmada Türk popülasyonunda GABA reseptörlerinden A, B1 ve B2'nin genetik polimorfizmlerinin görülme sıklığının PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile belirlenmesi ve bu polimorfizmlerle idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın ikinci bir amacı da, GABA reseptör genlerinde bulunan farklılıkların psikojenik non-epileptik nöbetlerin (PNEN) ayırıcı tanısındaki rolünün araştırılmasıdır. Bu kapsamda çalışmaya 196 İJE hastası, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol dahil edilmiştir.

Türk popülasyonunda ilk defa çalışılan GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 polimorfizmine ait polimorfik alel frekanslarının üç grupta da birbirine yakın olduğu görülmüştür (epileptik bireylerde 0.457, PNEN geçirmiş bireylerde 0.453 ve kontrol bireylerde 0.427) ve İJE ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmleri ilk defa bu projede çalışılmıştır. Her iki polimorfizme de Türk popülasyonunda rastlanmamıştır.

Türk popülasyonunda ilk defa çalışılan GABA<sub>B1</sub> G1465A polimorfizmi yönünden bütün bireyler yabancıl genotipte bulunmuştur. GABA<sub>B1</sub> C59T polimorfizmi de Türk popülasyonunda ilk kez çalışılmıştır. Epileptik bireylerle PNEN geçiren bireyler karşılaştırıldığında, C59T polimorfizminin İJE riskini 1.5 kat artırdığı görülmüştür, fakat sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $P=0.164$ ). C59T polimorfizminin frekansı kontrol bireylerde bu çalışmada 0.110 olarak bulunmuştur.

GABA<sub>B2</sub> geninde bulunan dört polimorfizmin (rs3780428-rs1999501-rs967932-rs94688) tek başlarına İJE için istatistiksel olarak anlamlı bir risk oluşturmadıkları görülmüştür. Bu polimorfizmlerin genotip kombinasyonlarına bakıldığında ise rs944688 için polimorfik homozigot, rs967932 ve rs1999501 için ise yabancıl tip genotipe sahip olmanın PNEN geçirmiş bireylerde İJE için yaklaşık 15 kat koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır ( $P=0.001$ ). Aynı genotip kombinasyonlarının kontrol gruplarında da İJE için yaklaşık 12 kat koruyucu bir etki gösterdiği görülmektedir ( $P=0.009$ ). Bu üçlü genotip kombinasyonu psikojenik nöbet geçiren (PNEN) bireylerle gerçek epileptik nöbet geçirenlerin ayırımında kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** gama amino bütirik asit, GABA, idiyopatik jeneralize epilepsi, genetik polimorfizm



## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological diseases worldwide. Gamma amino butyric acid (GABA), the most important inhibitory neurotransmitter of the central nervous system, and its receptors are commonly mentioned in the pathophysiology of epilepsies. Some of the single nucleotide polymorphisms in the genes encoding GABA receptors have been reported to increase susceptibility to temporal lobe epilepsy. There are a limited number of studies analyzing the relationship of GABA receptors and idiopathic epilepsy, which is the most widespread (65%) when etiologically classified. In Turkish population, genetic polymorphisms of GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B1</sub> and GABA<sub>B2</sub> receptors have not been studied before.

For these reasons, in this study we aimed to determine the frequencies of genetic polymorphisms of GABA receptors A, B1 and B2 in Turkish population by PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) method, and to investigate the correlation between these polymorphisms and idiopathic generalized epilepsy (IGE). A second aim of this study was to analyze the role of GABA receptor polymorphisms in differential diagnosis of psychogenic non-epileptic seizure (PNES). In this context, 196 IGE patients, 107 PNES subjects and 109 controls were included in this study.

Polymorphic allele frequencies were very close to each other in the three groups (0.457 in IGE patients, 0.453 in PNES patients and 0.427 in controls) for the GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 rs2279020 polymorphism. A statistically significant relationship was not found between this polymorphism and IGE. We did not observe polymorphic alleles in Turkish population for GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2 rs17852044, GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 3 rs79829085 and GABA<sub>B1</sub> G1465A. For GABA<sub>B1</sub> C59T polymorphism, when IGE patients and PNES subjects were compared, C59T polymorphism was found to increase IGE risk 1,5 times, but this result was not significant ( $P=0.164$ ). The frequency of C59T polymorphism in control population was found as 0.110 in this study.

We observed that four polymorphisms found on GABA<sub>B2</sub> gene (rs3780428-rs1999501-rs967932-rs94688) did not constitute a significant risk for IGE when considered alone. When the genotype combinations were taken into account, we concluded that having polymorphic homozygote genotype for rs944688 and wild type genotype for rs967932 and rs1999501 had 15 times protective effect against IGE for PNES subjects ( $P=0.001$ ). The same genotype combination constituted 12 times protective effect against IGE in control subjects ( $P=0.009$ ). This triple combined genotype can be used to differentiate subjects who have psychogenic seizures (PNES) from those having epileptic seizures. All of the studied polymorphisms were studied for the first time in Turkish population.

**Key words:** gamma amino butyric acid, GABA, idiopathic generalized epilepsy, genetic polymorphism

## 1. Giriş

Epilepsi, merkezi sinir sisteminde kortikal veya subkortikal bölgelerde yer alan nöronların artmış uyarılabilirliğinden kaynaklanan, ani, hipersenkron, yüksek voltajlı, anormal elektriksel deşarjları sonucu gelişen klinik bir durumdur. Merkezi sinir sisteminin en önemli inhibitör nörotransmitteri olan gama aminobütirik asit (GABA) ve GABA reseptörleri epilepsi patofizyolojisinde sıkça anılmaktadır. Nöronlarda GABA'nın inhibitör etkisinin azalması epileptik deşarjlar meydana getirerek nöbet oluşmasına neden olmaktadır. GABA, GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> adlı iki reseptör üzerinden etkili olur. GABA reseptörlerini kodlayan genlerde birçok tek nükleotit polimorfizmi tespit edilmiştir. Bu çalışmada ilk defa Türk popülasyonunda GABA reseptörlerinden A, B1 ve B2'nin genetik polimorfizmlerinin görülme sıklığının PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile belirlenmesi ve bu polimorfizmlerle idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Nöroloji Bölümü'nce 196 İJE hastası, 109 psikojenik non-epileptik nöbet (PNEN) geçiren birey ve 107 kontrol bireyden alınan toplam 412 tam kan örneğinden genomik DNA elde edilmiş ve bu DNA'larda, GABA<sub>B2</sub> geninde bulunan rs1999501, rs967932, rs3780428, rs944688; GABA<sub>B1</sub> geninde bulunan G1465A, C59T; GABA<sub>A</sub> α1 geninde bulunan IVS11+15 A>G (rs2279020); GABA<sub>A</sub> α2 geninde bulunan rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3 geninde bulunan rs79829085 tek nükleotit polimorfizmlerinin PCR ve restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri yapılarak 412 örneğin genotipleme çalışmaları tamamlanmış ve elde edilen sonuçlar istatistiksel testler kullanılarak hasta ve kontroller arasında karşılaştırılmış, bu polimorfizmler ile İJE arasında ilişki olup olmadığı incelenmiştir.

## 2. Genel Bilgiler

Epilepsi, tarihi eski çağlara kadar dayanan, hastanın işlevselliği ve yaşam kalitesini etkileyen, yineleyici nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Epilepsi yol açtığı bireysel yıkım, çevrenin yüklenmesi gereken görevler ve tıbbi yardım harcamalarının ülke ekonomisine getirdiği yük nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Epilepside hastalığa neden olan moleküler mekanizmaların ve genetik faktörlerin belirlenmesi, tanımlanan veriler ışığında yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemlidir (Baykan ve ark. 2004; Bolat, 2007).

Epilepsi tüm dünyada en yaygın görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Nöroloji pratiğinde çocukluk ve ergenlik çağında en sık, erişkinlerde ise beyin damar hastalıklarının ardından ikinci en sık rastlanan hastalıktır (<http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm>). Epilepsi görülme sıklığı ülkeler ve toplumlar arasında büyük farklılıklar göstermektedir; gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelere göre 4-6 kat fazla görülmektedir (Shorvon ve Farmer 1988). Gelişmekte olan ülkelerde yapılmış çalışmalara göre ortalama aktif prevalans binde 18,5'tir (de Bittencourt ve ark. 1996). Gelişmiş ülkelerde ise binde 4-10 olarak verilmektedir (Hauser ve Hesdorffer, 1990). Türkiye'de epilepsi prevalansını belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Orta Anadolu'da yaşamboyu epilepsi prevalansı %0,7 (şehir merkezinde %0,45, ilçelerde %0,87) olarak belirlenmiştir (Guvener ve ark 1995). Türkiye ile Pakistan arasında ortaklaşa yürütülen bir çalışma sonunda orta Anadolu'da ve Pakistan'da yaşamboyu epilepsi prevalansı sırasıyla %0,70 ve %0,98 olarak belirlenmiştir (Aziz 1995). Yaşamboyu epilepsi prevalansı Sivas'ın şehir merkezinde %0,61 (Topalkara ve ark. 1999) Alibaba bölgesinde %0,93 (Topalkara ve ark. 1994), kırsal bölgelerinde ise %1,73 olarak belirlenmiştir (Ozdemir ve ark. 1995). İstanbul'un Küçükçekmece bölgesinde yaşamboyu epilepsi prevalansı %0,78 olarak bildirilmiştir (Onal ve ark 2002). Bursa'da yürütülen bir çalışma sonunda aktif epilepsi prevalansı %0,85, yaşamboyu epilepsi prevalansı ise %1,22 olarak bulunmuştur (Calisir ve ark 2006). Epilepsinin en seyrek görüldüğü ülke olan Japonya'da prevalans binde 1,5 olarak bildirilmiştir (Sato 1964). Epilepsi prevalansının en yüksek olduğu topluluk, Panama'nın kırsal bölgelerinde yaşayan Guaymi yerlileridir. Bu toplulukta epilepsi görülme sıklığı binde 57'dir (Gracia 1990). Hindistan'da yapılan çalışmalara göre kırsal alanlarda prevalans binde 2,2-9 arasındadır (Gourie-Devi ve ark. 1995). Epilepsi prevalansı Pakistan'da binde 9,9 olarak bildirilmiştir (Khatri ve ark. 2003). Çin'de epilepsi prevalansı binde 3,5-4,8 arasındadır (Zhu ve ark. 2005).

Epilepsinin insidansı toplumdan topluma değişmekle birlikte genellikle yılda yüzbinde 20-50 olarak bildirilmektedir (Pedley ve ark. 2000). Yaşam boyu kümülatif insidans ise yaklaşık %3 olarak saptanır ki bu farklılık epilepsinin bazı hastalarda geçici bir doğası olmasından kaynaklanmaktadır (<http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm>). Tüm dünyada yaklaşık 50 milyon kişinin epilepsi hastası olduğu tahmin edilmektedir. Epilepsiye bağlı morbidite gelişmiş ülkelerde binde 5-10 civarındadır (Sander, 2003). Epilepsiye erkeklerde kadınlardan 1,0-2,4 kez daha sık rastlanır (Guvener 1995). Ailesinde epileptik üyeler bulunan kişilerde epilepsi gelişme olasılığı daha yüksektir (Seğmen, 2005).

Epilepsi sınıflandırması konusu epilepsi uzmanları tarafından hala çalışılmaktadır ve ne yazık ki hala ideal bir sınıflandırma yapılamamıştır. Epilepsiyle Savaş Birliği'nin (International League Against Epilepsy; ILAE) 1981 yılındaki sınıflandırmasında nöbetler

kabaca parsiyel, jeneralize ve sınıflandırılmayan olmak üzere üç ana gruba ayrılmış ve bunların alt grupları oluşturulmuştur. 1989 yılında ise Tablo 1'deki gibi sınıflandırılmıştır (Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes, 1989).

**Tablo 1.** Epilepsilerin ve epileptik sendromların uluslararası sınıflaması

<p><b>I. Lokalizasyona bağlı ( fokal, lokal,parsiyel) epilepsiler ve sendromlar</b></p> <p><b>1.1. İdyopatik (yaşa bağlı başlangıç)</b> *Sanctotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi *Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi *Primer okuma epilepsisi</p> <p><b>1.2. Semptomatik</b> *Temporal lob epilepsisi *Frontal lob epilepsisi *Parietal lob epilepsisi *Oksipital lob epilepsisi *Çocukluk çağının kronik progresif epilepsia parsialis kontinuası *Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar</p> <p><b>1.3. Kriptojenik</b></p>
<p><b>II. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar</b></p> <p><b>2.1. İdyopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)</b> *Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları *Selim yenidoğan konvülsiyonları *Süt çocukluğunun selim miyoklonik epilepsisi *Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi) *Jüvenil absans epilepsisi *Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit mal) *Uyanırken gelen grand mal nöbetli epilepsi *Diğer jeneralize idyopatik epilepsiler *Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler</p> <p><b>2.2. Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)</b> *West sendromu (infantil spazmlar, Blitz-Nick-Salaam Kraempfe) *Lennox-Gastaut sendromu *Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi *Miyoklonik absanslı epilepsi</p> <p><b>2.3. Semptomatik</b></p> <p><b>2.3.1. Spesifik olmayan etyolojili</b> *Erken miyoklonik ensefalopati *(Suppression-burst)' lu erken infantil epileptik ensefalopati *Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler</p> <p><b>2.3.2. Spesifik sendromlar</b></p>
<p><b>III. Fokal veya jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler</b></p> <p><b>3.1. Jeneralize ve fokal nöbetli epilepsiler</b> *Yenidoğan konvülsiyonları *Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi *Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgali epilepsi *Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu) *Diğer belirlenemeyen epilepsiler</p> <p><b>3.2. Jeneralize veya fokal özelliği ayırtedilemeyenler (uykuda gelen grand mal nöbet olguları gibi)</b></p>

#### IV. Özel (özgün) sendromlar

##### 4.1. Duruma bağlı nöbetler (Gelegenheitsanfaelle)

\*Febril konvülsüyonlar

\*İzole nöbet veya izole status epileptikus

\*Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler

Bu sınıflandırmada kullanılan bazı terimlerin anlamları şu şekildedir.

- Jeneralize epilepsiler: Başlangıçtaki klinik ve EEG değişikliklerinin her iki beyin hemisferini birden tuttuğu jeneralize nöbetlerle seyreden epilepsilerdir.
- Lokalizasyonla ilişkili (lokal,parsiyel,fokal) epilepsiler: Nöbet semiyolojisinin veya inceleme bulgularının lokalize bir kaynağı gösterdiği parsiyel nöbetlerle seyreden epilepsilerdir. Bunlar beynin belli alanlarından çıkan lokalize deşarjlardır.
- Sınıflandırılmayan nöbetler: Hastanın bir arada veya ardı ardına hem fokal hem jeneralize nöbetlerinin izlendiği ve EEG bulgularının olduğu, fokal mi jeneralize mi olduğu belirsiz epilepsilerdir.
- İdiyopatik epilepsiler: Herediter yatkınlık dışında bir sebebi olmayan epilepsilerdir.
- Semptomatik epilepsiler: Sebebi bulunan epilepsilerdir.
- Kriptojenik epilepsiler: Semptomatik olduğu düşünüldüğü halde sebep bulunamayan epilepsilerdir (Seğmen, 2005).

Epileptik nöbet bir semptomdur ve birçok kişi belirli koşullar altında (hipoglisemi, hipoksi, entoksikasyonlar, elektrolit bozuklukları gibi) bir epileptik nöbet geçirebilir. Bu gibi koşullar altında nöbet geçiren hastaya epileptik hasta tanısı konulmamalıdır. Bu tip nöbetlere duruma bağlı nöbet denir. Ayrıca epilepsi dışında geçici bilinç kaybı veya bozukluğu ile giden değişik klinik tablolar olduğu unutulmamalıdır.

İdiyopatik Epilepsiler: Epilepsi etiolojisinde idiyopatik epilepsiler en geniş yeri (%65) tutar. İdiyopatik adı altında pek çok epilepsi sınıflandırılmıştır: Bunlar bilinen bir nedeni olmayan veya genetik olarak belirlendiği varsayılan nöbetleri anlatmada kullanılır. İdiyopatik sendromlara genelde başka bir nörolojik disfonksiyon eşlik etmez, gelişme basamakları normal ilerler, altta gösterilebilen herhangi bir patolojik süreç yoktur; nörolojik muayene ve görüntüleme normaldir. Nöbetler görece daha seyrek ve tedaviye yanıt daha iyidir. EEG interiktal dönemde normal temel aktivite gösterir. İdiyopatik form genelde iyi bir prognoz gösterir ve remisyon olasılığı vardır. Ailesel özellik genellikle dikkat çeker; idiyopatik epilepsili kişilerin akrabalarında da idiyopatik epilepsi için risk mevcuttur. Eğer bir ebeveynde idiyopatik epilepsi varsa çocuğun riski 1/25, semptomatik epilepsi varsa çocuktaki risk 1/67'dir. Her iki ebeveyn de etkilenmişse bu risk 1/25'den yüksektir (Seğmen, 2005).

İdiyopatik jeneralize epilepsi (İJE), genetik temeli olan, iyi prognozlu, EEG'de karakteristik 3 Hz diken dalga paterni görülen, yapısal bir beyin hastalığı ile ilişkisi olmayan sendromlardan oluşmuştur. İJE sendromlarının çoğunda kompleks kalıtım paterni gösterilmiştir (Seğmen, 2005; Berkovic ve ark.1987; Greenberg ve ark. 1992). ILAE sınıflamasına göre İJE'ler başlığı altında incelenen sendromların başlıcaları şunlardır;

- 1) Selim ailesel yenidoğan konvülsüyonları
- 2) Selim yenidoğan konvülsüyonları
- 3) Çocukluk çağı selim miyoklonik epilepsi
- 4) Çocukluk çağı absans epilepsisi
- 5) Juvenil absans epilepsisi
- 6) Juvenil miyoklonik epilepsi
- 7) Uyanırken gelen JK nöbetleri
- 8) Miyoklonik absanslı epilepsi
- 9) Febril nöbet artı jeneralize epilepsi

Geriye kalan nedenler arasında en sık görülenler serebrovasküler hastalıklar (%15), serebral tümörler (%6), alkolle ilişkili nöbetler (%6) ve post travmatik nedenlerdir (%2) (Sisodia ve Duncan 2004).

#### *Yalancı epileptik nöbetler (PNEN)*

Yalancı epileptik nöbetler "psikojenik non-epileptik nöbetler (PNEN)" adıyla da anılan, esas olarak epileptik olmayan, epileptik EEG bozuklukları ile birlikte olmadığı halde epileptik nöbet benzeri görünümde olan, çoğunlukla psikiyatrik kaynaklı bir bozukluk olan klinik durumları anlatmak için kullanılan bir tanımlamadır. Tedaviye dirençli epilepsi ön tanısı ile uzmanlara veya merkezlere gönderilen hastaların en az %20'sinin epileptik olmayan ataklar olduğu ve bu hastaların gereksiz yere araştırıldığı ve gereksiz tedavi aldıkları bildirilmektedir (Betts, 1990). Bazı prevalans hesaplarına göre 70 yaşına kadar olan nüfusta tekrarlayan nöbetleri olanların %2,5'inde yalancı epileptik nöbet vardır (Scott, 1982). Bu rakamlar yurdumuza uyarlandığında yaklaşık 1.200.000 yalancı nöbet oluşturmaktadır. Bu yalancı nöbetler için gereksiz yere binlerce lira tutarında araştırma-ilaç vs. harcaması yapıldığı düşünüldüğünde konunun vahameti ortaya çıkmaktadır (Varlı, 1999).

Psikojenik nöbetlerin iyi bir nöbet gözlemi ile epileptik bir nöbetten ayırt edilebilmesine karşın bu her zaman kolay değildir. Zira, yalancı epileptik nöbetler izole olarak ortaya çıkabileceği gibi, epileptik bir hastada veya serebral bir bozukluğu olan hastada da ortaya çıkabilir (Lesser, 1985). Bu durumda ayırıcı tanı ve gerçek epileptik nöbetlerden ayırt

edilmesi daha da zor olabilir. Epilepsi/yalancı epileptik nöbet ayırımında kullanılabilecek en önemli laboratuvar yöntemlerinden biri de iktal EEG kayıtlarıdır. Nöbet esnasında alınan kayıt olan iktal EEG sırasında epileptik deşarj kaydedilmemiş olması, kesinlikle epilepsi tanısını reddettirir. Bu nedenle yalancı epileptik nöbet tanısında iktal EEG kaydı kesin tanıyı koyduracak bir yöntemdir. Ancak hastayı nöbet sırasında yakalamak ve EEG kaydını almak her zaman mümkün olamayabilir (Varlı, 1999).

Epileptik nöbetlerin patofizyolojisi her zaman tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca tüm epilepsi nöbetlerinde aynı patofizyoloji geçerli değildir. Konvülsüyonlarda belirli bir nöron grubu çeşitli nedenlerle normalden daha fazla elektriksel aktivite gösterebilir; bu hücre grubuna epileptojenik odak denir. Bu odaklarda zaman zaman oluşan çok güçlü elektrik deşarjları hızla komşu hücrelere yayılarak onların aktive olmasına neden olur (Apak ve ark., 1986; Özdamar ve Kumral, 1992). Nöronal aktiviteyi arttıran her türlü faktör epileptojenik olarak kabul edilir. Epileptojenik faktörler arasında elektrolit denge bozuklukları, nörotransmitter yapım ve salınım bozukluğu, enzim-enerji metabolizması bozukluğu, hipertermi, yapısal ve herediter faktörler sayılabilir. Epileptik deşarjların başlamasında rol oynayan nörotransmitterlerden biri de gama aminobütirik asittir (GABA) (Apak ve ark. 1986; Menkes, 1995).

Tüm epilepsilerin %40-60'ının etiolojisinde genetik faktörler rol oynamaktadır. Özellikle idiyopatik epilepsi sendromlarında aile öyküsünün pozitifliği semptomatik epilepsilere oranla daha belirgindir. Özellikle son yıllarda genetikte kaydedilen büyük ilerlemeler sonucunda epilepsi genetiği ile ilgili bilgiler giderek artmaktadır. Epilepsiler, bir çok sık rastlanan sistemik ve nörolojik hastalık gibi kompleks bir kalıtım gösterirler; bu nedenle moleküler genetik çalışmalar bu durumda güçtür. Ancak özellikle otomozomal dominant geçiş gösteren bazı epilepsilerin genetik temelleri son yıllarda bulunmuştur (Tablo 2). Şu anda bilinen ondan fazla epilepsi geninin çoğu iyon kanal subünitelerini kodlamaktadırlar (<http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm>; Lucarini ve ark., 2007). Monogenik kalıtımla geçen nadir epilepsi sendromları voltaj kapılı (sodyum, potasyum, klor kanalları) ve ligand kapılı iyon kanallarının alt tiplerini kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur (Ryan, 1999; Steinlein O.K., Noebels, 2000). Daha spesifik olarak bahsetmek gerekirse; potasyum iyon kanalı genleri KCNJ10 (Buono ve ark., 2004), KCNJ3 (Chioza ve ark., 2002), KCNQ2 (Biervert ve ark., 1998, Singh ve ark., 1998), KCNQ3 (Singh ve ark., 2003) klorür kanalı geni (CLCN2) (Sander ve ark., 2000; Haug ve ark. 2003), sodyum kanalı  $\alpha 1$  alt ünitesi geni (Baulac ve ark. 1999; Moulard ve ark. 1999; Lopes-Cendes ve ark. 2000; Escayg ve ark. 2000), sodyum kanalı  $\beta 1$  alt ünitesi geni (Wallace ve ark. 1998; Wallace ve ark. 2001a, b; Wallace ve ark. 2002), gama aminobütirik asit (GABA) tip A reseptör genleri (Wallace ve



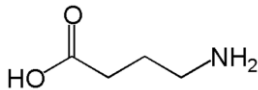
ark. 2001b; Olsen ve ark., 1999; Baulac ve ark., 2001; Cossette ve ark., 2002; Krampfl ve ark., 2005) ve GABA tip B1 geni (Prosser ve ark., 2001; Schuler ve ark., 2001) idiyopatik jeneralize epilepsi veya alt tipleri ile ilişkili bulunmuştur. Ancak, iyon kanalı olmayan bazı proteinlerdeki polimorfizmler de idiyopatik jeneralize epilepsi ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin, haptoglobin (Saccucci ve ark., 2004; Sadrzadeh ve ark., 2004; Langlois ve ark., 1996; Bottini ve ark., 2002), asit fosfataz lokus 1 (ACP1) (Bottini ve ark., 2002) ve malik enzim 2 (ME2) (Durner ve ark., 2001; Greenberg ve ark., 2005) polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi arasında bağlantı olduğu bulunmuştur.

**Tablo 2.** Epilepsilerin Moleküler Genetiğine İlişkin Örnekler  
(<http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm>; Lucarini ve ark., 2007).

Gen	Gen fonksiyonu	Sendrom
KCNJ10	Potasyum kanalı	İdiyopatik jeneralize epilepsi
K J3	Potasyum kanalı	İdiyopatik jeneralize epilepsi
KCNQ2	Potasyum kanalı alt ünitesi	Selim ailesel yenidoğan konvülsyonları
KCNQ3	Potasyum kanalı alt ünitesi	Selim ailesel yenidoğan konvülsyonları
SCN1B	Sodyum kanalı $\beta$ 1 subünitesi	Jeneralize epilepsi febril nöbet plus
SCN1A	Sodyum kanalı $\alpha$ 1 subünitesi	Jeneralize epilepsi febril nöbet plus 2
SCN1A	Sodyum kanalı $\alpha$ 1 subünitesi	Selim ailesel yenidoğan konvülsyonları
SCN1A	Sodyum kanalı $\alpha$ 1 subünitesi	Dravet Sendromu (SMEI) (Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi)
CLCN2	Klor kanalı subünitesi	Çocukluk çağı absans epilepsisi ve febril nöbet
GABRG2	GABA <sub>A</sub> reseptörü $\gamma$ 2 subünitesi	Çocukluk çağı absans epilepsisi ve febril nöbet
GABRG2	GABA <sub>A</sub> reseptör $\gamma$ 2 subünitesi	Jeneralize epilepsi febril nöbet plus
GABRA1	GABA <sub>A</sub> reseptörü $\alpha$ 1 subünitesi	Febril nöbet ve temporal lob epilepsisi
GABRA1	GABA <sub>A</sub> reseptörü $\alpha$ 1 subünitesi	Otozomal dominant juvenil miyoklonik epilepsi

### Gama aminobütirik asit (GABA)

Gama aminobütirik asit (GABA) merkezi sinir sisteminin en önemli inhibitör nörotransmitteridir (Şekil 1). Temel görevi, sinir hücrelerinin hızlı şekilde ateşlenmesini önlemek ve böylece sistemde aşırı yüklemeyi engellemektir.



**Şekil 1.** Gama aminobütirik asitin (GABA) yapısı



Epilepsi etiyolojisinde GABA nörotransmitteri ve GABA reseptörleri sıkça anılmaktadır. Nöronlarda GABA'nın inhibitör etkisinin azalması epileptik nöronlar üzerindeki sinaptik inhibisyonun kalkmasına ve daha kolay eksite olmalarına yol açmakta, dolayısı ile epileptik deşarjlar meydana getirerek nöbet oluşmasına neden olmaktadır. Epileptik bölgelerde GABA konsantrasyonu normalin 10 katı kadar azalmıştır. Azalma hem GABA hem de GABA reseptörleri düzeyinde ortaya çıkar. Bu nörotransmitter GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> adlı iki reseptör üzerinden etkili olur (Rating ve ark., 1983; Petroff ve ark., 1996; Mahmoud ve ark., 1999).

### **GABA<sub>A</sub> reseptörü**

GABA<sub>A</sub> reseptörü, Cl<sup>-</sup> kanalını kontrol eden iyonotrop bir reseptördür. GABA moleküllerinin GABA<sub>A</sub> reseptörüne bağlanmasıyla klor kanalları açılır ve hücre içindeki negatif yük artar. GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin 6 çeşit  $\alpha$ , 4 çeşit  $\beta$ , 4 çeşit  $\gamma$  ve birer çeşit  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  alt ünitesi vardır. Bu alt birimlerden beş tanesi farklı kombinasyonlarla bir araya gelerek GABA<sub>A</sub> reseptörünü oluşturur. Beyinde bulunan GABA<sub>A</sub> reseptörü iki  $\alpha$ , iki  $\beta$  ve bir  $\gamma$  alt ünitesinden oluşmuştur ( $\alpha_2\beta_2\gamma$ ) (Baulac ve ark., 2001). Çok sayıda bağlanma yeri bulunduğu için pek çok ilaç için hedef bölgedir ve pek çok agonist ve antagonist aktivitenin bu bölgeler üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Anti-epileptik ilaçlar da GABA<sub>A</sub> reseptörlerin klorür kanal kompleksini indükleyerek etki gösterirler.

GABA nörotransmitter iletim yolunda veya GABA<sub>A</sub> reseptöründeki bir aksaklığın epilepsiye yol açtığı yıllardır tahmin edilmesine rağmen bulgular ancak son 10 yılda gelmiştir. GABA<sub>A</sub> reseptörleri ile epilepsi arasındaki ilişkiye dair ilk kanıt 2001 yılında Baulac ve ark. (2001) tarafından yayınlanmıştır. Bu araştırmada üç nesildir *jeneralize epilepsi febril nöbet plus* (GEFS+) fenotipi gösteren bir ailede GABA<sub>A</sub> reseptörünün  $\gamma 2$  alt ünitesinde bir mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyon reseptörün 289. aminoasitinin lizin yerine metiyonin olarak kodlanmasına neden olmaktadır (Lys289Met). Bu mutasyonun GABA tarafından aktive edilen akımlarda azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur (Baulac ve ark., 2001). Wallace ve ark (2001b) tarafından *çocukluk çağı absans epilepsisi ve febril nöbet* görülen bir ailede yapılan incelemede, GABA<sub>A</sub>  $\gamma 2$  alt ünitesinin geninde 43. aminoasitin argininden glutamine dönüşmesine neden olan bir tek nükleotit değişimi (245 numaralı nükleotitte A-G dönüşümü) tespit edilmiştir. 43 numaralı aminoasit olan arginin benzodiazepinin bağlandığı bir bölgede olduğu için, bu mutasyonun GABA<sub>A</sub>  $\gamma 2$  alt ünitesinin benzodiazepin tarafından potansiasyonunun ortadan kalkması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Wallace ve ark., 2001b).

*Jüvenil miyoklonik epilepsi* görülen Fransız-Kanadalı bir ailenin üyelerinde yapılan çalışmada GABA<sub>A</sub> reseptör geninde 322. aminoasitin alanininden aspartata dönüşmesine

neden olan bir mutasyon tespit edilmiştir (Ala322Asp). Bu mutasyonun epilepsi hastası 8 aile üyesinde olduğu ancak sağlıklı aile bireylerinde bulunmadığı açıklanmıştır (Cossette ve ark., 2002). Bu amino asit değişikliğinin reseptörün aktivitesini ciddi biçimde düşürdüğü belirtilmektedir (Krampfl ve ark., 2005). Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise juvenil miyoklonik epilepsili 35 ailede bu mutasyon gösterilememiştir (Kapoor ve ark., 2003). Daha yakın zamanda yapılan, juvenil miyoklonik epilepsili, Kafkas ırkına mensup 54 ailede GABA<sub>A</sub> α1 alt ünitesinin incelendiği çalışmada da herhangi bir mutasyon bulunamamıştır (Ma ve ark., 2006).

Bir başka çalışmada ise GABA<sub>A</sub> reseptörünün α1 alt ünitesindeki IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizminin epilepsi için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Kumari ve ark. 2010). Ancak bu çalışmada herhangi bir epilepsi alt tipinden bahsedilmemiştir.

### **GABA<sub>B</sub> reseptörü**

GABA<sub>B</sub> reseptörü G proteini ile K<sup>+</sup> kanallarına bağlanan transmembran metabotropik bir reseptördür. Bu reseptör, K<sup>+</sup> kanallarının açılmasını tetikleyerek nöronun hiperpolarize olmasına neden olabilir. Bu durum sodyum kanallarının açılmasını ve aksiyon potansiyelinin başlamasını, dolayısı ile de nörotransmitter salınımını engeller. Bu yüzden GABA<sub>B</sub> reseptörleri inhibitör reseptörler olarak bilinir. GABA<sub>B</sub> reseptörleri aynı zamanda adenilil siklaz aktivitesini düşürerek hücrenin Ca<sup>+</sup> geçirgenliğini azaltabilir. Bu reseptörler merkezi ve periferik otonom sinir sisteminde bulunmaktadır. GABA<sub>B</sub> reseptörlerinin B1 ve B2 olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır (Bettler ve ark., 2004). Bu iki reseptörün nöron hücre zarında heterodimer şeklinde birleştiği düşünülmektedir. GABA<sub>B1</sub> alt ünitesi GABA için bağlanma bölgesini içermekte (Pin ve ark., 2004), GABA<sub>B2</sub> alt ünitesi ise GABA<sub>B1</sub> alt ünitesinin sentezlendikten sonra endoplazmik retikulumdan hücre zarına ulaşmasını ve aktif hale gelmesini sağlamaktadır (Thuault ve ark., 2004).

Yüksek dozlardaki GABA<sub>B</sub> reseptörü antagonistlerinin miyoklonik ve tonik-klonik kasılmaları tetikleyebildiği gözlenmiştir (Badran ve ark., 1997). Öte yandan, GABA<sub>B</sub> antagonistlerinin spontane olarak absans epilepsi nöbeti geçiren lh/lh letarjik farelerde (Hosford ve ark., 1992) ve genetik absans epilepsili sıçanlarda (Marescaux ve ark., 1992; Liu ve ark., 1992) görülen absans kasılmaları baskıladığı ve agonistlerin ise absans epilepsiyi şiddetlendirdiği de gözlenmiştir (Liu ve ark., 1992; Crunelli ve ark., 2002; Gervasi ve ark., 2003; Snead ve ark., 1992). GABA<sub>B</sub> reseptör aktivitesindeki farklılıklar hem

insanlarda hem de hayvanlarda absans türü epilepsi ile bağlantılı bulunmuştur (Bettler ve ark., 2004).

GABA<sub>B</sub> reseptörünün B1 alt tipi geni (GABA<sub>B1</sub>) 6. kromozomun p21.3 bölgesinde yer almaktadır. Bu bölge aynı zamanda idiyopatik jeneralize epilepsi için bir yatkınlık odağı (EJM1) içermektedir. GABA<sub>B1</sub> reseptörünün jeneralize epilepsi oluşumundaki rolünü araştırmak için Prosser ve ark. (Prosser ve ark., 2001) tarafından gen hedefleme yöntemi ile GABA<sub>B1</sub> reseptörü çıkarılmış (knockout) fareler üretilmiştir. Bu farelerin beyinlerinde sinaps öncesi ve sinaps sonrası tüm GABA<sub>B</sub> reseptör faaliyetlerinin yok olduğu görülmüştür. Bu gözlem, GABA<sub>B1</sub> alt ünitesinin tüm GABA<sub>B</sub> reseptör faaliyetleri için elzem olduğunu ortaya koymuştur. GABA<sub>B1</sub> reseptörü çıkarılmış fareler doğduklarında normal olsalar da, 4. haftadan itibaren gelişimleri duraklamış, jeneralize epilepsi gelişimi gözlenmiş ve sonuçta bu fareler ölmüştür (Prosser ve ark., 2001).

Deneysel temporal lob epilepsisi olan rodentlerde yapılan çalışmalarda GABA<sub>B1</sub> reseptörünün rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur. Schuler ve ark. (2001) GABA<sub>B1</sub> reseptörü genetik olarak çıkarılmış (knockout) farelerin, spontane epileptik nöbetlerle karakterize insan temporal lob epilepsi hastalığına benzer belirtiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Schuler ve ark., 2001).

GABA<sub>B1</sub> reseptör genindeki G1465A tek nükleotit polimorfizmi ile temporal lob epilepsi arasındaki ilişki yoğun olarak çalışılmıştır. G1465A, GABA<sub>B1</sub> reseptör geninin kodlayan bölgesinde, 7. eksonda yer almaktadır. Bu tek nükleotit değişikliği, amino asit dizisinde 489. pozisyonda glisin yerine serin eklenmesine neden olur. 489. amino asit, reseptörün alt ünitelerinin birleşmesi için gerekli olan N-ucunda hücre dışı bölümünde yer almaktadır, dolayısı ile reseptörün liganda bağlanmasını etkileyebilir. Temporal lob epilepsi ile G1465A polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma vardır. Gambardella ve ark. (2003) tarafından yapılan ilk çalışmada, İtalya'da 141 temporal lob epilepsi hastası ve 372 kontrolde GABA B1 reseptöründeki G1465A polimorfizmi incelenmiş, GABA B1 G1465A polimorfizminin mezial temporal lob epilepsisi (MTLE) için yatkınlığı artırmakla kalmayıp aynı zamanda hastalığın derecesini de etkilediği bildirilmiştir (Gambardella ve ark., 2003). Bu sonuçları destekleyen bulgular Kauffman ve ark. (2008) tarafından 2008'de yayınlanmıştır. Hipokampal sklerozu (HS) bulunan Arjantin'li 102 mezial temporal lob epilepsi hastası ve 71 kontrol üzerinde yapılan çalışma sonucunda GABA<sub>B1</sub> reseptörünün G1465A polimorfizmini heterozigot olarak taşıyan bireylerin diğerlerine göre MTLE-HS olma riskinin 10 kat fazla olduğu ortaya konmuştur. Bulunan bu pozitif sonuçlara rağmen, 2005-2006 arasında

yayınlanmış 7 çalışmada (Ma ve ark., 2005; Cavalleri ve ark., 2005; Stogmann ve ark., 2006; Salzman ve ark., 2005; Tan ve ark., 2005; Ren ve ark., 2005; Wang ve ark., 2008) ise GABA<sub>B1</sub> G1465A polimorfizmi ile TLE arasında bağlantı bulunamamıştır.

GABA<sub>B1</sub> reseptör genindeki G1465A polimorfizmi ile temporal lob epilepsi arasındaki ilişki çok yoğun çalışılmış olmasına rağmen bu polimorfizm ile idiyopatik jeneralize epilepsi arasında bir bağlantı olup olmadığı ile ilgili sadece iki klinik çalışma vardır. Bu çalışmaların ilkinde Peters ve ark. (1998) tarafından juvenil miyoklonik epilepsi hastalarında GABA<sub>B1</sub> geninin kodlayan bölgesinde mutasyon taraması yapılmıştır. Amino asit değişikliğine de yol açan iki mutasyonun (C59T ve G1465A) tüm hastalarda bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, aynı mutasyonların epilepsisi olmayan aile üyelerinde de bulunması nedeniyle bu amino asit varyasyonlarının idiyopatik jeneralize epilepsiye yol açmadığına karar verilmiştir. İkinci çalışmada ise, Sander ve ark. (1999) GABA<sub>B1</sub> reseptör geninin 1a1, 7 ve 11 nolu eksonlarında bulunan C59T, G1465A ve T1974C tek nükleotit polimorfizmlerini juvenil miyoklonik epilepsili ve idiyopatik absans epilepsili hastalarda incelemiştir. Sonuçta, GABA<sub>B1</sub> reseptörünün varyantları ile çalışılan idiyopatik jeneralize epilepsi tipleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Sander ve ark., 1999).

Öte yandan literatürde GABA<sub>B2</sub> reseptörünün epilepsi ile ilişkisini inceleyen sadece bir çalışma vardır (Wang ve ark., 2008). 2008 yılında Wang ve ark. Çin popülasyonunda 318 mezial temporal lob epilepsi hastası ve 315 kontrol üzerinde yaptıkları bir çalışmada GABA<sub>B2</sub> reseptör geninin intron bölgelerinde bulunan rs1999501, rs967932, rs3780428 ve rs944688 tek nükleotit polimorfizmlerini incelemişlerdir. Bu polimorfizmlerin transkripsiyon sonrası ön-mRNA'dan intronların çıkarılıp eksonların uç uca eklenmesi sırasında farklı mRNA'ların oluşmasına, dolayısı ile GABA<sub>B2</sub> reseptörünün fonksiyonunda farklılıklara neden olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada GABA<sub>B2</sub> reseptörünün rs967932 A alelinin mezial temporal lob epilepsi riskini artırdığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008). Bu polimorfizmlerden herhangi birinin idiyopatik jeneralize epilepsi için risk faktörü olup olmadığı ise hiç çalışılmamış bir konudur.

GABA reseptörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin görülme sıklığı toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. Örneğin, GABA<sub>B2</sub> rs3780428 A alelinin frekansı bir Çinli popülasyonunda 0,042 iken, Afrika'nın Sahra bölgesindeki bir popülasyonda 0,817'dir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Türk popülasyonunda ise GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B1</sub> ve GABA<sub>B2</sub> reseptörlerinin genetik polimorfizmleri daha önce hiç çalışılmamıştır; dolayısı ile Türk popülasyonunda bu polimorfizmlerin görülme sıklığı bilinmemektedir.

Bu nedenlerle bu çalışmada Türk popülasyonunda idiyopatik jeneralize epilepsi hastalarında ve sağlıklı kontrollerde GABA reseptörlerinden A, B1 ve B2'yi kodlayan genlerdeki bazı genetik polimorfizmlerin görülme sıklığının PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile incelenmesi ve bu polimorfizmlerle idiyopatik jeneralize epilepsi arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca GABA reseptör genlerindeki polimorfizmlerin yalancı epileptik nöbetlerin ayırıcı tanısındaki rolü araştırılacaktır.

### **3. Gereç ve Yöntem**

#### **3.1 Örneklem ve kanların toplanması**

Proje önerisinde bu çalışmaya 200 İJE hastası, 100 PNEN geçiren birey ve 100 kontrol birey dahil edilmesi planlanmıştır. 1 yıllık süre içerisinde GATA Nöroloji Kliniğine 196 İJE hastası başvurmuş, dolayısı ile hasta sayısı 200 rakamına çok yaklaşmıştır. Daha önce proje önerisi B planı başlığı altında da belirtmiş olduğumuz gibi minimum 100 hasta elde edildiğinde çalışmada elde edilen sonuçlar (teorik olarak) istatistiksel olarak sunulabilir nitelikte olacaktır. Kontrol gruplarında ise sayı yönünden problemle karşılaşmamış, hedeflenen 100 rakamı geçilerek 107 PNEN ve 109 bayılma yakınması olmayan kontrol birey çalışmamıza dahil edilmiştir.

196 İJE, 107 PNEN ve 109 kontrol bireyden antikoagulan (EDTA) içeren tüplere alınan kan örnekleri ODTÜ Biyoloji Bölümü'ndeki laboratuvarımıza getirilerek DNA izolasyonu yapılanaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Kan örnekleri toplanırken nörolojik muayene bulgusu olan ve/veya serebral görüntüleme yöntemlerinde intrakranial patolojisi bulunan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır ve tüm hastaların nöbet semiyolojisine ait bilgileri (aile hikayesi, hastalığın başlangıç zamanı, ne kadar sık nöbet geçirdiği, ortalama nöbet süresi, ilaç kullanımı, ilaçlardan fayda görüp görmediği) kaydedilmiştir.

#### **3.2 DNA izolasyonu ve DNA'nın kalitatif ve kantitatif analizleri**

Tam kan örnekleri ODTÜ Biyoloji Bölümü'ndeki laboratuvarımıza getirilerek DNA izolasyonları, Lahiri ve Schnabel (1993) tarafından tarif edilen DNA izolasyonu metodunun laboratuvarımızda daha önce modifiye edilmiş hali kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, DNA

izolasyonu için 500 µL tam kan ile KCl, EDTA ve MgCl<sub>2</sub> içeren pH 7.6 da tamponlanmış Tris-HCl solüsyonu (TKEM) karıştırılıp ve Triton X-100 eklendikten sonra tüpler hafif hareketlerle çalkalanarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Tüpler oda sıcaklığında santrifüjlendikten sonra supernatant atıldı, pellet iki kez daha TKEM solüsyonu ile yıkanıp, TKEM içinde çözüldü. Sodium dodecyl sulfate (SDS) eklendikten sonra 58°C'de 10 dakika inkübe edilip, soğuk ve doymuş NaCl çözeltisi ile ekstraksiyonu yapıldı; böylece proteinler organik fazda ayrılırken genomik DNA da sıvı fazda toplandı. Tüpler santrifüjlenerek proteinlerin pellete çökmesi sağlanıp, pellet atıldı. Sıvı fazdaki DNA %100'lük saf alkol ile çöktürüldü ve pH 8.0'de tamponlanmış Tris-EDTA solüsyonunda çözülüp, saklandı.

DNA izole edildikten sonra, kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı. Kantitatif analiz için izole edilmiş olan DNA'nın 260 nm'deki abzorbansı Shimadzu UV160-A spektrofotometre ile (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan) ölçüldü. DNA konsantrasyonu şu formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abzorbans}_{260\text{nm}} \times 50 (\mu\text{g/mL}) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

İzole edilen genomik DNA'nın saflık ve bütünlük açısından kalitatif analizi için iki yöntem kullanıldı. Saf olup olmadığını anlamak için öncelikle izole edilmiş DNA örneğinin 280 nm'deki abzorbansı ölçüldü. Daha önce kantitatif analiz için 260 nm'de ölçülen abzorbansı, 280 nm'deki abzorbansına bölüldüğünde ( $A_{260}/A_{280}$ ) elde edilen değer 1,8 ise DNA'nın saf olduğu düşünülürdü.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1,8'den yüksekse RNA kontaminasyonu, düşükse protein kontaminasyonu olduğu düşünülürdü. DNA'nın bütünlüğü ise agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Etidyum bromür içeren % 0,5 agaroz jeli, yatay agaroz jel elektroforez ünitesinde hazırlandı, 5 µL DNA örneği bromofenol mavisini içeren yükleme tamponu ile karıştırılıp, jelin deliklerine yüklendi. Tankın kapağı kapatılıp jel 100 Voltta 45 dk. yürütüldü. Jel UV ışığı altında Vilber Lourmat Gel Imaging System (Marre La Vallee, Cedex, France) kullanılarak görüntülendi ve Bio-Capture (Version 99.03) bilgisayar yazılımı yardımı ile fotoğrafı çekildi. Agaroz jelde saf DNA örneklerinin tek bir bant olarak görüldüğü, RNA ile kontamine olmuş örneklerin ise iki bant verdiği bilinmektedir. Yayılmış, bulanık görünen bir bant ise DNA'nın kırıldığını gösterir.

### 3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Her bir epilepsi hastası ve kontrolden elde edilen genomik DNA kullanılarak ayrı bir PCR karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı kalıp DNA, dNTPler, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimeraz, uygun tampon çözeltisi, ajirojen steril su ve çoğaltılacak bölge için özel primerleri

çermektedir. Bu çalışma kapsamında, bugüne kadar optimizasyon çalışmaları başarı ile tamamlanan GABA<sub>B2</sub> rs1999501, rs967932, rs3780428, rs944688; GABA<sub>B1</sub> G1465A, C59T; GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020); GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesi için kullanılan primerlerin sekansı, PCR sırasında primerlerin kalıp DNA'ya yapışması için uygulanan sıcaklık (T<sub>m</sub>), PCR ürününü kırmak için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi ve kırılma ürünlerinin uzunluğu Tablo 3'de verilmektedir. Bu bölgelere ait optimizasyon koşulları ilerde daha ayrıntılı anlatılmaktadır.

**Tablo 3.** GABA<sub>A</sub> α1, GABA<sub>A</sub> α2, GABA<sub>A</sub> α3, GABA<sub>B1</sub> ve GABA<sub>B2</sub>'nin genetik polimorfizmlerinin belirlenmesi; primerlerin sekansı, PCR sırasında primerlerin kalıp DNA'ya yapışması için uygulanan sıcaklık (T<sub>m</sub>), PCR ürününü kırmak için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimi ve kırılma ürünlerinin uzunluğu

Gen	SNP	Primerler	PCR-T <sub>m</sub> (°C)	PCR ürün uzunluğu (bç)	Restriksiyon endonükleaz	Kırılma ürünlerinin uzunluğu (bç)
GABA <sub>A</sub> α1	IVS11+15 A>G (rs2279020)	F5'GCTATGGATTGGTTTATTGCCGTG TG3' R5'ATAATATTGATGTACTACAG <sup>G</sup> *GAC3'	60.0	165	Avall	141+24
GABA <sub>A</sub> α2	rs17852044	F5'ACAGCAGAGTCCCATCATCCTGAA3' R5'AGCTTATCCCCTCTCCAAGCAGC3'	59	538	SatI	456+61+21
GABA <sub>A</sub> α3	rs79829085	F5'CTTGCCATTGTGGAAGAAGG3' R5' GGCATATGAGCCCTTACCA3'	60	202	HpaII	172+30
GABA <sub>B1</sub>	G1465A (rs1805057)	F5'AACAGTAACACAAACCATCC3' R5'GCATGTTTGTAGAAGGTGCC3'	58.0	441	EagI	258+183
	C59T (rs1805056)	F5'GGGTGCGGGCCGCGCCG3' F5'AGAAATGAGGAGATGCAGG3'	58.0	213	Hin6I	97+11+25+67+12
GABA <sub>B2</sub>	rs1999501	F5'TTCTCTAACTCCAGGTCCAA3' R5'TCAGGGTCACAAACACAAAG3'	56.0	370	BsaAI	221+149
	rs967932	F5'AGAACGGGCTCCAACTAAAA3' R5'GCTGAGATATTCACCCACCA3'	58.5	348	ScrFI	282+66
	rs3780428	F5'AGACTTTCATCTGGGCTCAA3' R5'AAACTTGGCTGATGCTTGGT3'	55.5	255	Sau96I	156+99
	rs944688	F5'CCTAATGTCTGCTATCACCA3' R5'AGGGTAAGTTTTTAACAGAGT <sup>#</sup> T3'	51.0	137	HpaI	22+115

\* Avall için tanıma bölgesi oluşturmak için eklenmiştir.



GABA<sub>A</sub> reseptörünün  $\alpha$ 1 alt ünitesini kodlayan gendeki IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizminin belirlenmesi için kullanılan primer dizisi Kumari ve ark. (2010) yayınından alınmıştır. GABA<sub>B1</sub> genindeki G1465A ve GABA<sub>B2</sub> tek nükleotit polimorfizmleri için kullanılan primerlerin dizileri Wang ve ark (2008) tarafından yayımlanmış olan makaleden alınmıştır. GABA<sub>B1</sub> genindeki C59T tek nükleotit polimorfizminin belirlenmesi için kullanılan primer dizisi Peters ve ark. (1998) yayınından alınmıştır. GABA<sub>A</sub> reseptörünün  $\alpha$ 2 ve  $\alpha$ 3 ünitesini kodlayan genlerdeki tek nükleotit polimorfizmleri için kullanılan primer dizileri tarafımızca dizayn edilmiştir. GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2 ve  $\alpha$ 3 genindeki tek nükleotit polimorfizmlerine Ensembl veritabanından bakılarak, aminoasit değişikliğine yol açan ve RFLP tekniğine uygun olarak restriksiyon enzimi bulunan, sırasıyla rs17852044 ve rs79829085 seçildi. Uygun restriksiyon enzimi NEB Cutter programı kullanılarak belirlendi. Primer dizaynı da NCBI veritabanındaki Primer-Blast programı kullanılarak yapıldı.

Reaksiyon ortamında kullanılan primerlerin, MgCl<sub>2</sub>'nin, dNTP'lerin, Taq polimerazın ve kalıp DNA'nın miktarı Tablo 4'de verilen konsantrasyonlar denenerek optimize edildi.

**Tablo 4.** Polimeraz zincir reaksiyonu optimizasyonu için denenmiş MgCl<sub>2</sub>, dNTP, primer, Taq DNA polimeraz ve DNA konsantrasyonları.

	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyon
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	0.25 mM - 0.50 mM - 0.75 mM - 1.00 mM - 1.25 mM - 1.50 mM - 1.75 mM - 2.00 mM
<b>dNTP</b>	10 mM	100 $\mu$ M- 200 $\mu$ M- 300 $\mu$ M
<b>Primerler</b>	10 pmol/ $\mu$ L	0.2 pmol- 0.8 pmol- 3 pmol- 5 pmol
<b>Taq DNA polimeraz</b>	5 u/ $\mu$ L	1.5 u- 2 u- 2.5 u- 3 u
<b>DNA</b>	değişken	~200 ng

Ayrıca amplifikasyon koşulları da optimize edildi. PCR reaksiyonu için laboratuvarımızda bulunan Eppendorf Mastercycler (Hamburg, Germany) kullanıldı. İlk etapta, primer dizilerinin verildiği kaynak makalelerde verilen amplifikasyon koşullarından başlayarak, bu programdaki basamakların süreleri ve uygulanacak sıcaklık gibi parametrelerde değişiklik yapılarak en düzgün PCR bantını veren en uygun amplifikasyon programları belirlendi.



PCR sonucunda elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelendi. Bu amaçla, elde edilmesi planlanan PCR bantının büyüklüğünü görmemizi sağlayacak yoğunlukta bir agaroz jel (% 2) hazırlandı. PCR ürünlerinin öngörülen büyüklüğü Tablo 3'de verilmektedir. PCR ürününün 8 µL'si bromofenol mavisini içeren bir yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Aynı zamanda 50-1000 bp arasında bantlar veren bir DNA belirteci (DNA ladder) de jele yüklendi, böylece elde edilen bantın büyüklüğü tahmin edilebildi. Tablo 3'de verilen uzunlukta tek bir bant elde edildiğinde PCR başarılı olmuş sayılıp, bir sonraki aşamaya, PCR ürününün restriksiyon enzimiyle kırılması aşamasına geçildi.

GABA<sub>B2</sub>, GABA<sub>B1</sub>, GABA<sub>A</sub> α1, GABA<sub>A</sub> α2 ve GABA<sub>A</sub> α3 genlerindeki tek nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesi için belirlenen en uygun optimizasyon koşulları ve yapılan PCR işlemleri aşağıda daha detaylı anlatılmaktadır.

### 3.3.1 GABA<sub>B2</sub> rs1999501 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rs1999501 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 2'de gösterilmiştir.

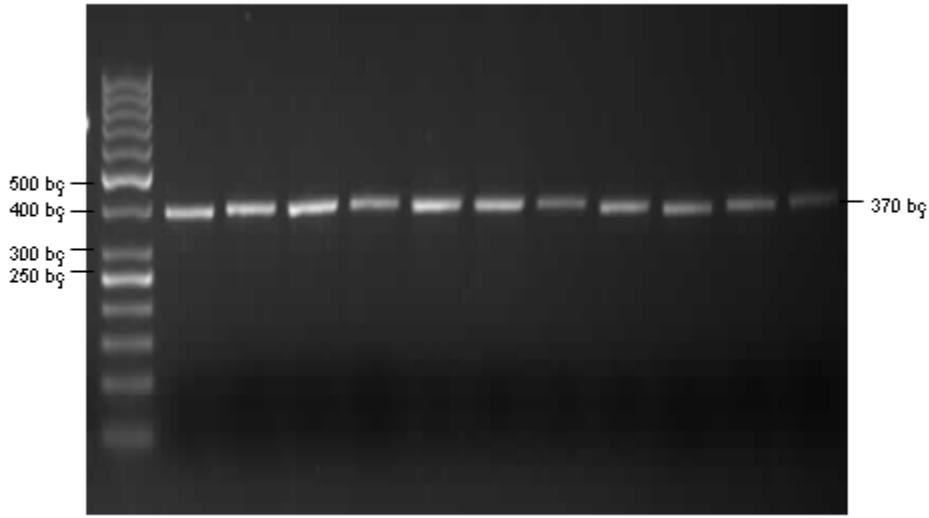
```
CGTTTCCTAATTAGCTGTCAGTAAGCCTCCCCACATATGCAGGTGTGACATTTTTAA
AAGTCAGGGTCACAAACACAAAGTGTACTCGGGCTGCCGATCAGGAGAGGGGGTG
CTCTTTTCTGCAGGTTTGTGCAAATATCACATGTTGGCAGCCCTTCTCCGGGGGGTG
GGGGCTGGATCGCCCTCTTAAGAGATAACAACTCCAAC TACAGTG TGCCACCAAG
CCATCGCCACTCCTTTCCATTCCACATTTGTGGGGCACATTGGTTCAACATTGGCT
GGGCGCCTGAGCTAGGTAGGGGAAGATGAGATGGGTAAGACTGGGTCCTTGCTC
TCATGGGATTTATAATGTGGAGTGGGTGAGAGACATGGAAATAATTTAGCAACATG
TAGTAAATGGTGTAATGGAGGGT TGGACCTGGAGTTAGAGAA TATTCATTCATCCC
ATAAACGCACCCTGGGTGATGAAGAACCAGGTCTCATGGTAGATGCTGAAGACGCA
```

**Şekil 2.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs1999501 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, BsaI restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir. (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon sonucunda, rs1999501 bölgesi için reaksiyon ortamında 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz kullanılmasının ve Tablo 5'deki gibi bir döngü programı uygulanmasının en düzgün sonuçların elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Elde edilen PCR ürünü Şekil 3'deki %2'lik agaroz jel elektroforez fotoğrafında 370 bp'lik bir bant şeklinde görülmektedir.

**Tablo 5.** GABA<sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	56 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 3.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs1999501 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.2 GABA<sub>B2</sub> rs967932 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GABA<sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 4'te gösterilmiştir.

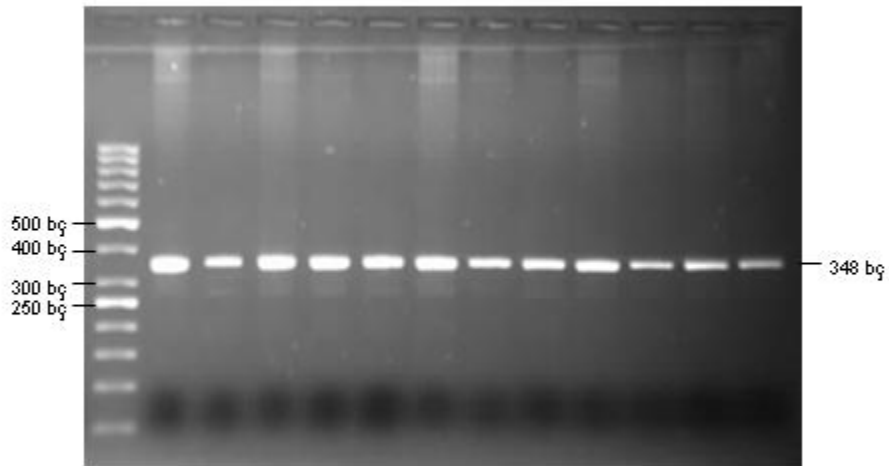
CATGGGCAACTGCAGTTCCTACTGGGCACTCGGAGGGGAGAGGGAGCTGAGATAT  
**TCACCCACCA**ACCCTGCCAGCCACTGCTGTGAGATCCTAGCAGAGGGAAATTGCCA  
**AGG**GCAGCATGCAACGGCATAGAGAGTGCCCAAGAGCGATGGATGGGGCAGCGAC  
 AGGGGTGGCTACACAGTTCTAGACAAAAGTCATTTCTCCATGGAATCTGCTTTTC  
 TGCTCTGCCATGCTCAATACTCACGTGCCACACAGGCACACAGAGGTGTCATGGT  
 TCCAGTTGCATAGTGGACATTCTTTCCACTGTCTTTGTTCTGAAATTCAGTATAGA  
 AAGATTTTAAGAGAGAAGAGAGCCTATTCTGCCTTTA**TTTTAGTTGGAGCCCGTTCTT**  
 TTCTTT

**Şekil 4.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs967932 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *ScrFI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon sonucunda, rs967932 bölgesi için reaksiyon ortamına 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz konularak, termal döngü cihazında Tablo 6'da verilen şekilde bir amplifikasyon programı uygulanması en uygun koşullar olarak belirlendi. Süre sonunda elde edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülerek Şekil 5'deki 348 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 6.** GABA<sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotid polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	58.5 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 5.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs967932 tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.3 GABA<sub>B2</sub> rs3780428 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GABA<sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 6'da gösterilmiştir.

```
TGCAGAAAAACTTGGCTGATGCTTGGTTAAGAGAAAAGGGCATTTCATTTTTTC
AAAAAACTTGAGATTTTCTGACCTATTCAGACTGGCCTTCCACTAGAGGCCAACTCAT
TTCTTCAGGGAACACCATTTCAGGAGGAATACAGCATGGATGGTGCCCTGGGGCTG
AGCTCTCCTGTCGTCTTTAGATGGCAGATGCTTCATGACAGCTGCTAAAAGCCCTCA
GCATTTTCCTTAAGTTGAGCCCAGATGAAAGTCTGAGGGTTTATCCTCAGGTGCTTT
TCCCACTCATGTTATT
```

**Şekil 6.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs3780428 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *Sau96I* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

GABA<sub>B2</sub> rs3780428 bölgesi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda PCR reaksiyon ortamı için en iyi koşullar 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 0.6 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz olarak belirlendi. Kullanılmasına karar verilen amplifikasyon koşulları da Tablo 7'de verilmektedir. Sonuçta, Şekil 7'deki %2'lik agaroz jel elektroforez fotoğrafındaki 255 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 7.** GABA<sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotid polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	55.5 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 7.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs3780428 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.4 GABA<sub>B2</sub> rs944688 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

GABA<sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 8’de gösterilmiştir.

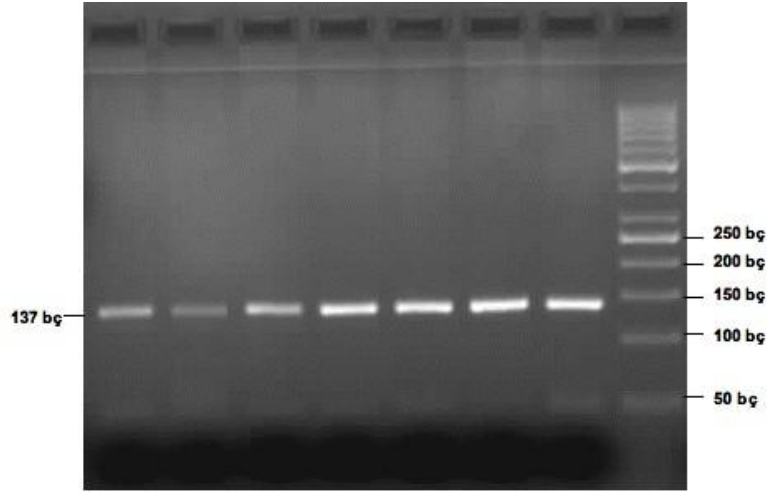
```
CTGCACTCCAACCTGGAGGATGAAGCGAGACCCTGTCTCTTAAAAAAGA  
AAATAATAAATGAAATAAATAAATCAATAAACAAATCCTAATGTCTGCTA  
TCACCACAATTTAATTTTTAAAGGACATAAGAAGGAAGGAGGAGGAGGG  
AAGGGAAGGCACCATCTCAAAGTGAAGGGTGTCTTTAAACAACAAAGT  
CAG*CTCTGTAAAACTTACCCTTATTTTCCTCAGGGCACCATGGTCTCT
```

**Şekil 8.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs944688 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *HpaI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon sonucunda, rs944688 bölgesi için reaksiyon ortamına 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1.0 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz konularak, termal döngü cihazında Tablo 8’de verilen şekilde bir amplifikasyon programı uygulanması en uygun koşullar olarak belirlendi. Sonuçta, Şekil 9’daki %2’lik agaroz jel elektroforez fotoğrafındaki 137 bç’lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 8.** GABA<sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	51 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 9.** GABA<sub>B2</sub> geninin rs944688 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.5 GABA<sub>B1</sub> G1465A Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

G1465A tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 10'da gösterilmiştir.

```

AAGAAGTAACTGAGAAAAACAGAGAATGCATGTTTGTAGAAGGTGCCCTCTGGGAG
TCTCTCTCAAGATTGGGAAGACAGGGGAGTATGAAGGAAGTTTTAACTCACAGAGAC
ACCTCAAAGGACGAAGAGTTCATTGCCCGGTAGATTTGGTCGGTAATGGTCTGGTT
GTTGTAGTTGAAGTCCTCCAGGCGCACACCAGAACGGCCGCCTCCTCCAGATGTCT
TGTTCAAGGCCAGTGCCAAGGCCAGATGGCATCATAGGCCAGCGGTGCCTCCTG
GAAGCCTCCTGTCTCCTCAGGGTGTCTTTTCAGTCGCTTGGTTAGTTTCTCCACAAA
TTCCTGGGATGTCTTGGGAGGAAAAAATCATGAGGAAAGAACTGAAATGTGTGTGG
GTGTGGGGGAAGGGGTGCAATCCAATTCTGACTCAATCACTTCTACTTGAATGGATG
GTTTGTGTTACTGTTGTCAGATTGGACACATGTACATTCAAATCTTTA

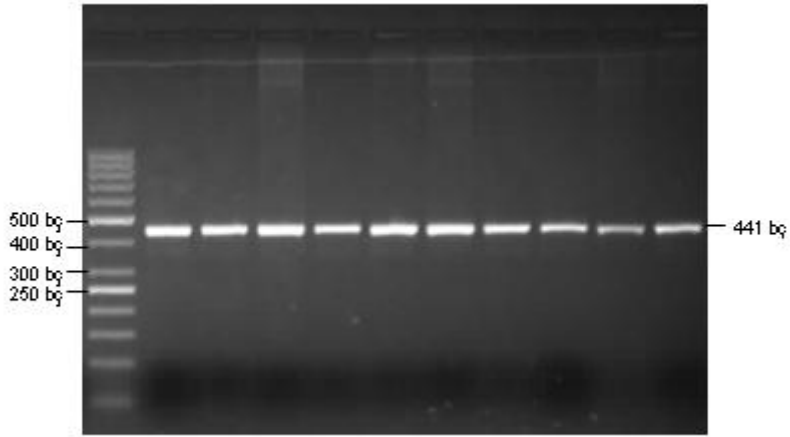
```

**Şekil 10.** GABA<sub>B1</sub> geninin G1465A tek nükleotit polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *EagI* restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir. (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon sonucunda GABA<sub>B1</sub> G1465A bölgesi için PCR reaksiyonu ortamı 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 0.6 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz olarak belirlendi. Amplifikasyon koşullarının ise Tablo 9'daki gibi olmasına karar verildi. Sonuçta, Şekil 11'deki %2'lik agaroz jel fotoğrafındaki 441 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 9.** GABA<sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	58 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 11.** GABA<sub>B1</sub> geninin G1465A tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.6 GABA<sub>B1</sub> C59T Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

C59T tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 12'de gösterilmiştir.

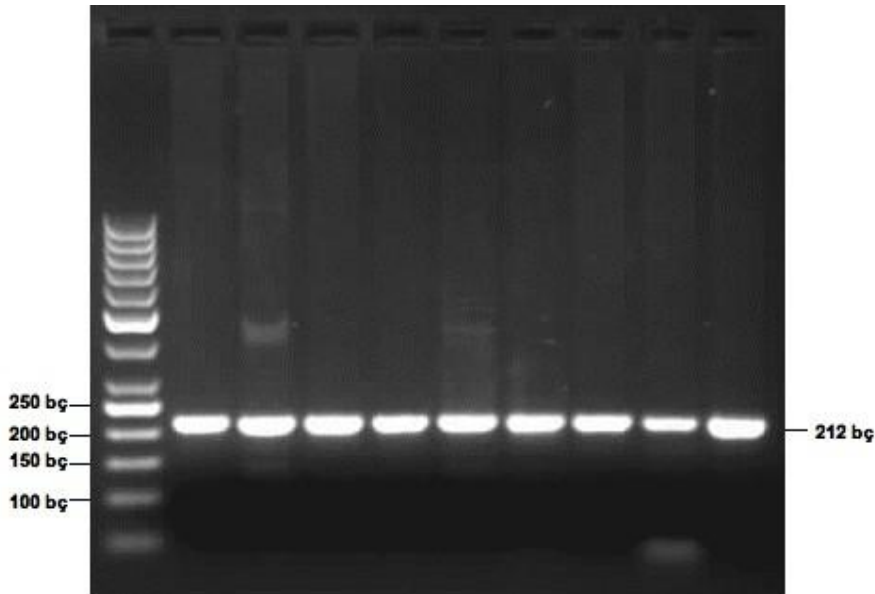
GAGGCAACCGGCAAGAGGTCGAGTAGTCTCCGGGTGCGGGCCGCGCCGGC  
GGGGCTCGGTCCAGTCCTCATGGCCGCCTCTCACTTAGATGTTGCTGCTG  
CTGCTACTGCGGC CACTCTTCTCCGCCCCCGGGCGCGGGGCGGCA  
GACCCCAACGCCACCTCAGAAGGTGCATCCTTCTTCGACGACCTCCGGC  
CCTCCTTCGCTCCACTTCCCTTTCCCTGCATCTCCTCATTCTGGTCCTC

**Şekil 12.** GABA<sub>B1</sub> geninin C59T tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *Hin*6I restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölgeler sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotit de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir. (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

Optimizasyon sonucunda GABA<sub>B1</sub> C59T bölgesi için PCR reaksiyonu ortamı 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 0.6 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz olarak belirlendi. Amplifikasyon koşullarının ise Tablo 10'daki gibi olmasına karar verildi. Sonuçta, Şekil 13'deki %2'lik agaroz jel fotoğrafındaki 212 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 10.** GABA<sub>B1</sub> C59T tek nükleotid polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

Denatürasyon	95 °C	30 sn.	} 35 döngü
Primer bağlanması	58 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	



**Şekil 13.** GABA<sub>B1</sub> geninin C59T tek nükleotid polimorfizmini içeren PCR ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü



### 3.3.7 GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rs2279020 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 14'de gösterilmiştir.

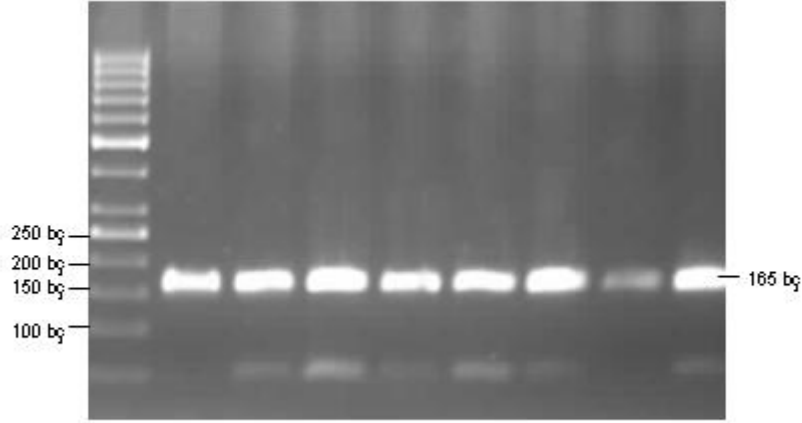
```
TTCTTTACAGGAGTAACAACACTGTGCTCACCATGACAACATTGAGCATCAGTGCCAGA
AACTCCCTCCCTAAGGTGGCTTATGCAACAGCTATGGATTGGTTTATTGCCGTGTGC
TATGCCTTTGTGTTCTCAGCTCTGATTGAGTTTGCCACAGTAACTATTTCACTAAGA
GAGGTTATGCATGGGATGGCAAAAGTGTGGTTCCAGAAAAGGTAAATGCTTTAATGG
TCACTGTAGTACATCAATATTATGTCTCTTTAAACCTATGAAATGAGATGTTTTGGCC
TGTGGTATTGGATGGAGTATGCAGAATAATAAGGATTCTTTTTTCTTATGTCGTAAA
CAATTAAGTGCCATGATAATTTGTTATTGATAAAGGGAGAGGTCATTTAGGTGAATA
GATGTACAAAGTG
```

**Şekil 14.** GABA<sub>A</sub> α1 geninin rs2279020 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, Avall restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 bölgesi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi sonuçların PCR reaksiyon ortamına 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1.0 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz konulduğunda elde edildiğine karar verildi. En iyi sonucu veren termal döngü programı ise Tablo 11'de verilmektedir. Süre sonunda elde edilen PCR ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde Şekil 15'deki 165 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 11.** GABA<sub>A</sub> IVS11 + 15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	60 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	7 dk.	



**Şekil 15.** GABA<sub>A</sub> α1 geninin rs2279020 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.8 GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rs17852044 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 16'da gösterilmiştir.

```
AGATTGGCTGGTTGTTTAATACATGAAAATTTCTCAGTATATAAATACAT
CACATCAAACCTAAAAACATACCTCATGGTATACAGCAGAGTCCCATCAT
CCTGAATTCGAAGCAACTTATTTGGCATTGTCATATTATGAGCTACTGAT
TTTTTCCCATTTGTGAAAAAAGGTATCTGGAGTCCAGATTTTGCTAGCCAT
TAAATTGTTTAGTTCGAAGGATATTCATAGGACCTTTAAATTTTAAACGTT
CATCTTTCCATTTTTGTGCGAAAGAAAACATCAATTGTATATTCCTGAAAT
AAAAAATAGAATTTTTTTGAAAATAGTAAATGTTGTAGACACAAGACACG
GTAAAATTCAAAATAATATTCTAATTAATTTAAACAGAGAGAGCTATAT
TGAAAGGAAAACATTTTTAATCAGAAAGATTACTCCTTTGGCTTATCAAT
ACATGTTGCCACATACAATGGGATAAAGTACGTCTGTGTATACTATTAGC
TATATATTCTTCTGAAAAGAAGAAGTAAATTCACTTTGGCCTCTTTTAGTT
GAACAAGGTCTCAGTCAAAGTCTCCACTACATCCTGTAGTTTAGAGCT
GCTTGGAGAGGGGATAAGCTTGAGCAGGGTCTGGTTGAATTATTTTAAAG
```

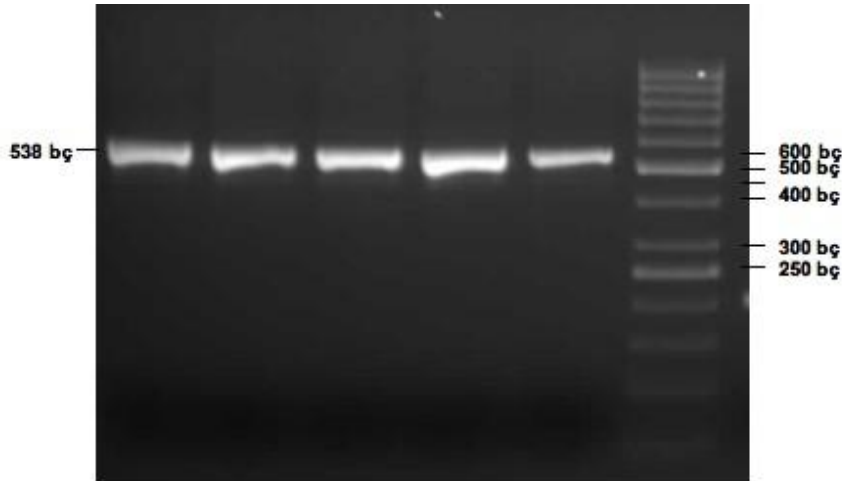
**Şekil 16.** GABA<sub>A</sub> α2 geninin rs17852044 tek nükleotit polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, Safl restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 bölgesi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi sonuçların PCR reaksiyon ortamına 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1.0 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz konulduğunda elde edildiğine karar

verildi. En iyi sonucu veren termal döngü programı ise Tablo 12'de verilmektedir. Süre sonunda elde edilen PCR ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde Şekil 17'deki 538 bç'lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 12.** GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Primer bağlanması	59 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	30 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 17.** GABA<sub>A</sub> α2 geninin rs17852044 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3.9 GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 Tek Nükleotit Polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rs79829085 tek nükleotit polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin bağlandığı bazlar ve restriksiyon enziminin tanıdığı bazlar Şekil 18'de gösterilmiştir.

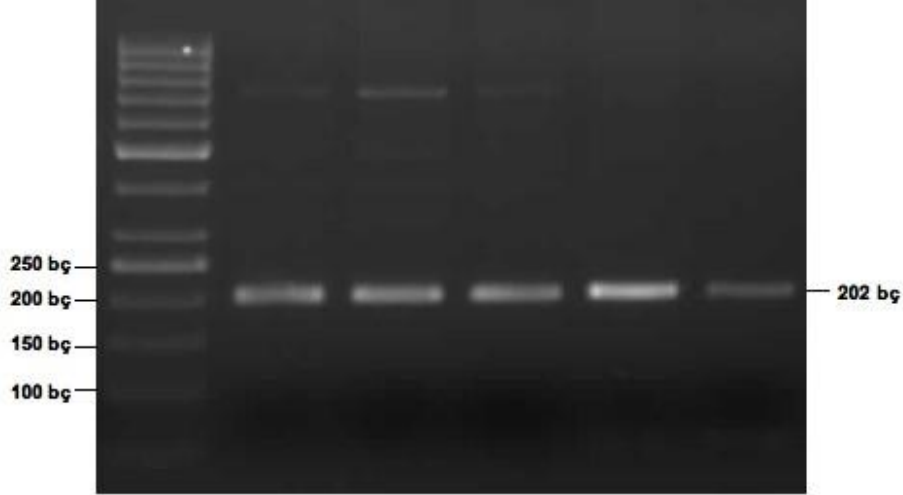
GGAACCACCACTCTCTGACCTCATTGTATAGAGGAGGGTTCCGTTGTCCA  
CCAATCTGAGCAGCTTGTGGGCGTGGTCATGTTATGAGCCACTGATTTC  
**TTGCCATTGTGGA**AGAAGGTGT**CCGG**TGTCCAGATCTTACTAGCCAGGA  
GATTGTTCAAGTGAAGGATCTTCATGGGGCCATCAAATTTTCAGTCTTTTCAT  
CATGCCATGTCTGCCGAAAAAATACATCAATAGTGTACTCCTAGGGGTGA  
AAAGAGAGAAAACAATGTTTCAGTTGAGTTCT**TGGTAAGGGCTCATAGTGC**  
**CCTTAGCAAATATTAATTACCTTGCAGTATTTCTCTGATGCAGAGAAGCA**

**Şekil 18.** GABA<sub>A</sub> α3 geninin rs79829085 tek nükleotid polimorfizmi içeren bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen sekansı. İleri ve geri primerler koyu renkli ve altı çizili olarak, *Hpa*I restriksiyon enziminin tanıdığı ve kestiği bölge sarı renkli olarak ve polimorfik nükleotid de kırmızı renkli olarak belirtilmiştir (Sekans <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> kaynağından alınmıştır).

GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 bölgesi için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi sonuçların PCR reaksiyon ortamına 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dNTP, 1.0 pmol/µL primer, yaklaşık 200ng kalıp DNA ve 3u Taq DNA polimeraz konulduğunda elde edildiğine karar verildi. En iyi sonucu veren termal döngü programı ise Tablo 13’de verilmektedir. Süre sonunda elde edilen PCR ürünü %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde Şekil 19’daki 202 bç’lik bant elde edilmiştir.

**Tablo 13.** GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmini çalışmak için kullanılan amplifikasyon programı

İlk denaturasyon	95 °C	5 dk.	} 30 döngü
Denatürasyon	94 °C	20 sn.	
Primer bağlanması	60 °C	30 sn.	
Sentez	72 °C	40 sn.	
Son uzama	72 °C	10 dk.	



**Şekil 19.** GABA<sub>A</sub> α3 geninin rs79829085 tek nükleotit polimorfizmini içeren PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.4 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kırılması

PCR sonucunda elde edilen DNA'lar Tablo 3'de verilen spesifik restriksiyon endonükleaz enzimi ile birlikte inkübe edildi. Kullanılacak restriksiyon enziminin miktarı, inkübasyonun süresi ve sıcaklığı gibi kriterler optimize edildi. Restriksiyon süresi sonunda örnekler %3'lük agaroz ve Nu-micropor agaroz jellerinde analiz edildi.

Aşağıda çalışılan tüm tek nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesi için yapılan restriksiyon endonükleaz enzim kesim işlemleri daha detaylı anlatılmaktadır.

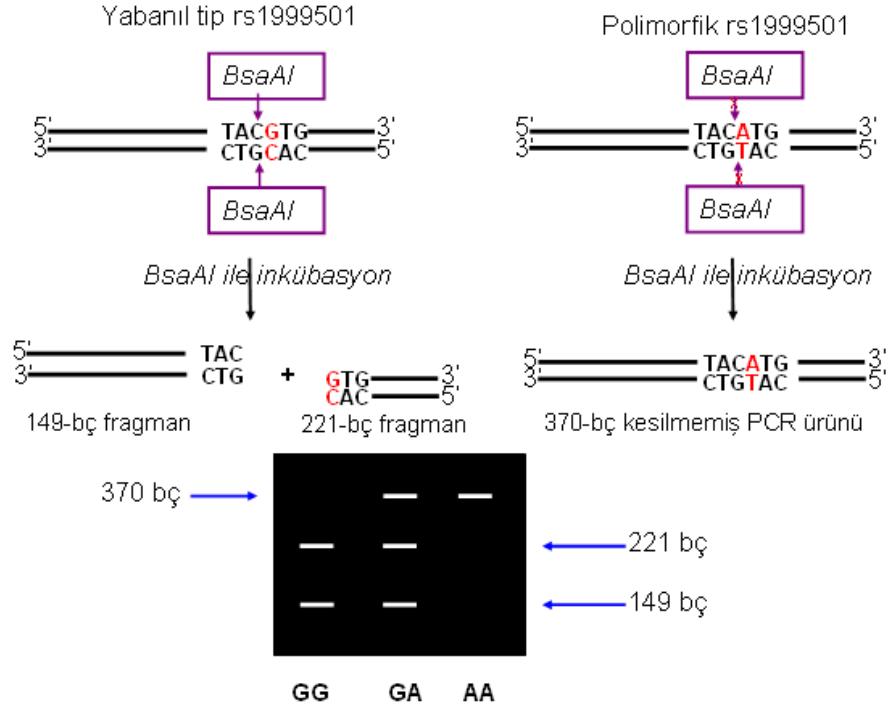
#### 3.4.1 GABA<sub>B2</sub> rs1999501 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B2</sub> rs1999501 genotipleri, BsaAI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B2</sub> rs1999501 bölgesinin BsaAI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 4 unite BsaAI enzimiyle 16 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmesi ile elde edildiği belirlenmiştir. BsaAI enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



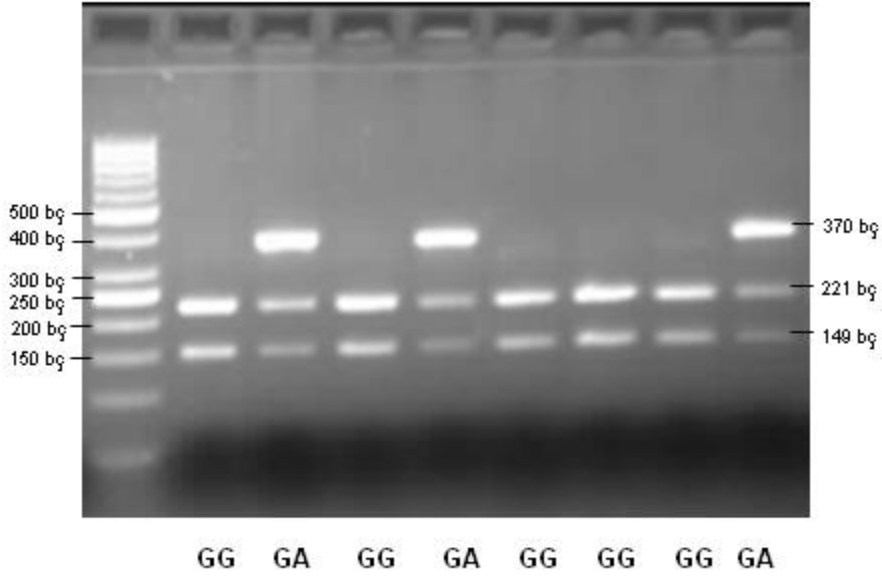
GABA<sub>B2</sub> rs1999501 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 20'de açıklanmıştır. GABA<sub>B2</sub> rs1999501 genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürününde bu bölge varsa, PCR ürünü BsaAI ile bekletildiğinde 370 bç'lik PCR ürününün 221 bç ve 149 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 221 bç ve 149 bç

boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmekte ise bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B2</sub> rs1999501 genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 20.** GABA<sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

PCR ürünüde *BsaAI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 370 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (*BsaAI* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 370 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (GA) olan bireylerde *BsaAI* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 370 bç, 221 bç ve 149 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 21'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *BsaAI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



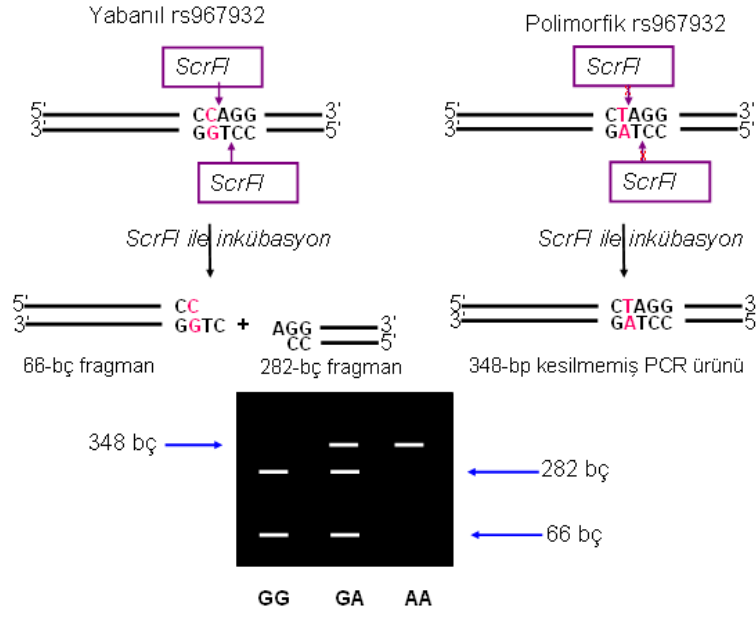
**Şekil 21.** GABA<sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 3.4.2 GABA<sub>B2</sub> rs967932 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B2</sub> rs967932 genotipleri, *ScrFI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B2</sub> rs967932 bölgesinin *ScrFI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 10 unite *ScrFI* enzimiyle 16 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmesiyle elde edildiği belirlenmiştir. *ScrFI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

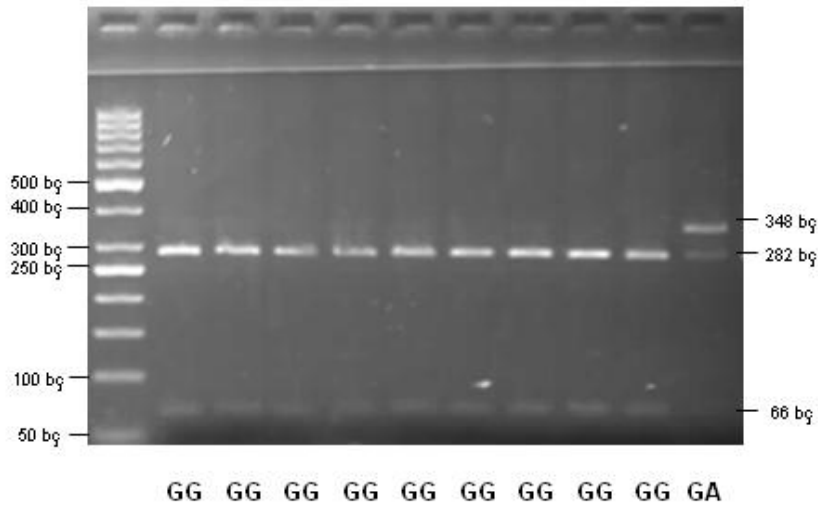


GABA<sub>B2</sub> rs967932 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 22'de açıklanmıştır. GABA<sub>B2</sub> rs967932 genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürününde bu bölge varsa, PCR ürünü *ScrFI* ile bekletildiğinde 348 bç'lik PCR ürününün 282 bç ve 66 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 282 bç ve 66 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmektedir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B2</sub> rs967932 genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 22.** GABA<sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

PCR ürününde *ScrFI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 348 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (*ScrFI* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 348 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot olan bireylerde *ScrFI* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 348 bç, 282 bç ve 66 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 23'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *ScrFI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.

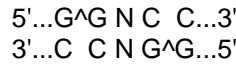


**Şekil 23.** GABA<sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

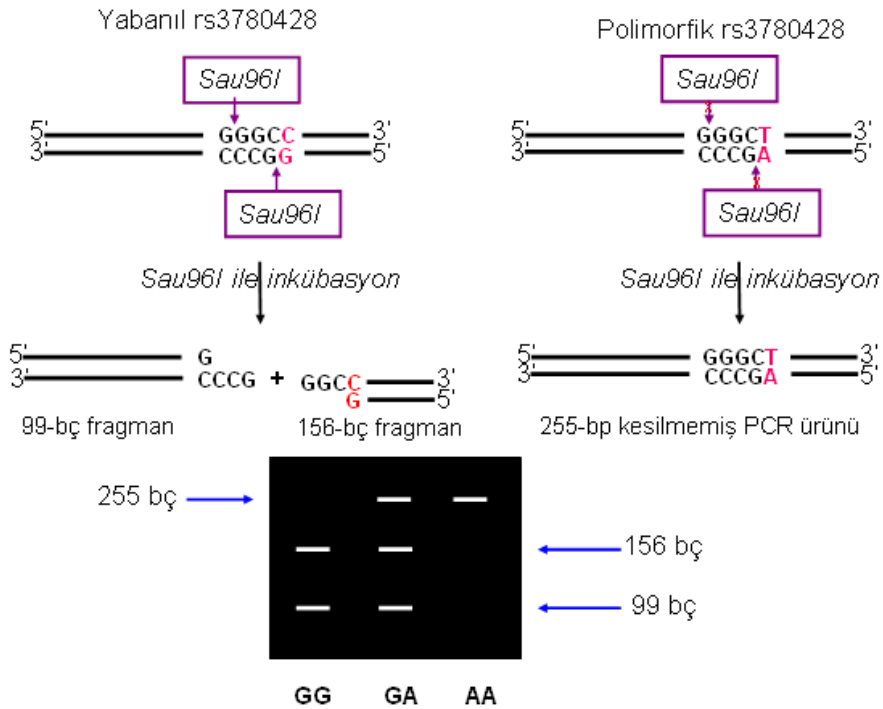


### 3.4.3 GABA<sub>B2</sub> rs3780428 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B2</sub> rs3780428 genotipleri, restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B2</sub> rs3780428 bölgesinin Sau96I restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürünününün 3 unite Sau96I enzimiyle 16 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmesiyle elde edildiği belirlenmiştir. Sau96I enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

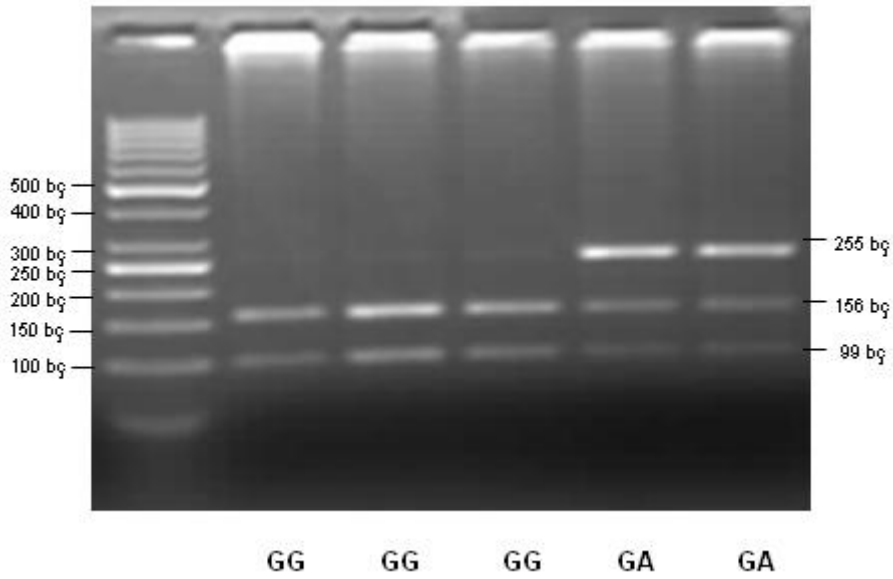


GABA<sub>B2</sub> rs3780428 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 24'de açıklanmıştır. GABA<sub>B2</sub> rs3780428 genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürününde bu bölge varsa, Sau96I PCR ürünü ile bekletildiğinde 255 bç'lik PCR ürünününün 156 bç ve 99 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 156 bç ve 99 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmektedir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B2</sub> rs3780428 genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 24.** GABA<sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

PCR ürününe Sau96I enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 255 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 255 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (AG) olan bireylerde Sau96I enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 255 bç, 156 bç ve 99 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 25'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin Sau96I restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



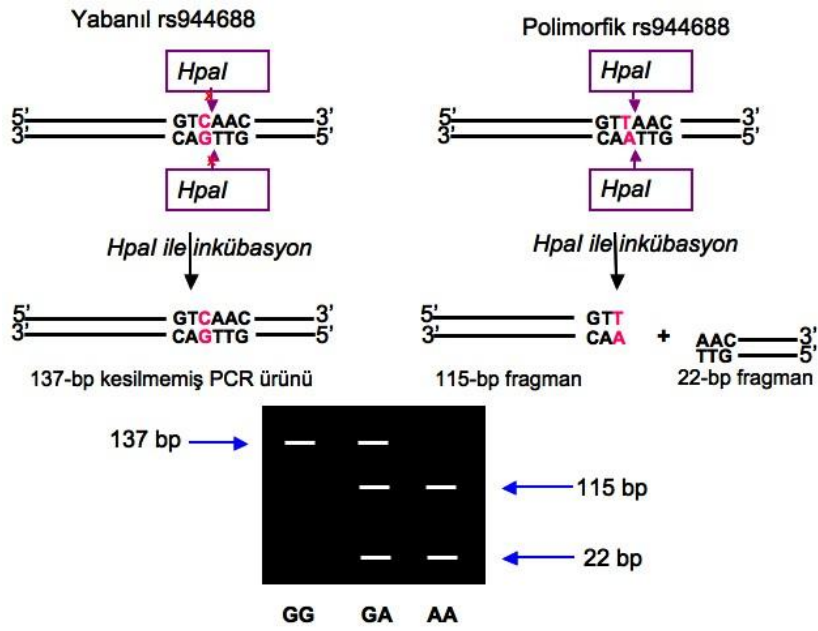
**Şekil 25.** GABA<sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

#### 3.4.4 GABA<sub>B2</sub> rs944688 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B2</sub> rs944688 genotipleri, restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B2</sub> rs944688 bölgesinin *HpaI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 3 unite *HpaI* enzimiyle 16-saat boyunca 37°C'de inkübe edilmesiyle elde edildiği belirlenmiştir. *HpaI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

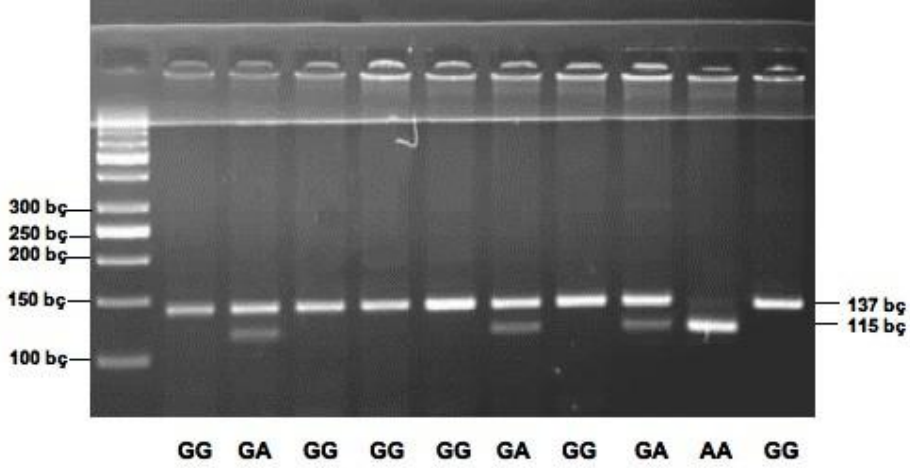
5'...G T T<sup>^</sup>A A C...3'  
3'...C A A<sup>^</sup>T T G...5'

GABA<sub>B2</sub> rs944688 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 26'da açıklanmıştır. GABA<sub>B2</sub> rs944688 genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürünüde bu bölge varsa, *Hpa*I PCR ürünü ile bekletildiğinde 137 bç'lik PCR ürününün 115 bç ve 22 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Nu-micropor agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 115 bç ve 22 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmektedir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B2</sub> rs944688 genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 26.** GABA<sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü.

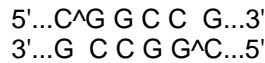
PCR ürünüde *Hpa*I enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 137 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 137 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (GA) olan bireylerde *Hpa*I enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 137 bç, 115 bç ve 22 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 27'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *Hpa*I restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



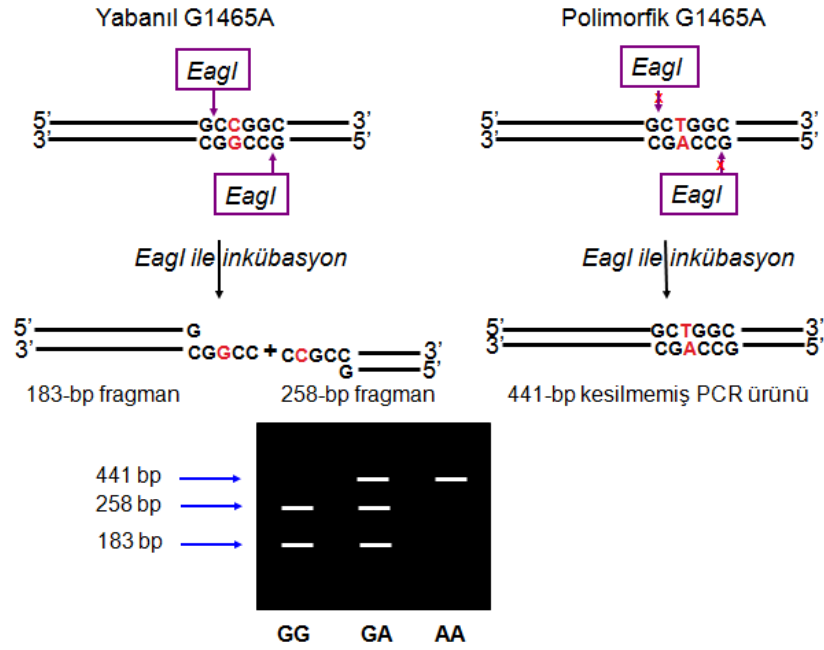
**Şekil 27.** GABA<sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 3.4.5 GABA<sub>B1</sub> G1465A bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B1</sub> G1465A genotipleri EagI restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B1</sub> G1465A bölgesinin EagI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 4 unite Sau96I enzimiyle 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. EagI enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

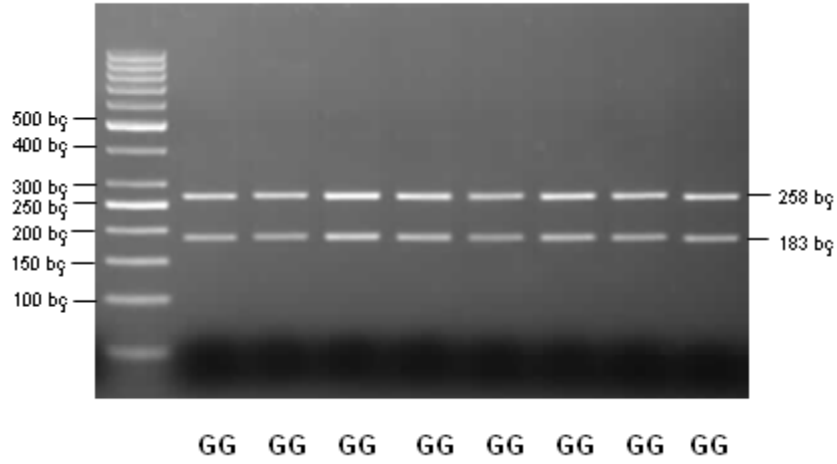


GABA<sub>B1</sub> G1465A genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 28'de açıklanmıştır. GABA<sub>B1</sub> G1465A genetik polimorfizmini belirlemek için üretilen PCR ürününde bu bölge varsa, PCR ürünü ile bekletildiğinde 441 bç'lik PCR ürününün 258 bç ve 183 bç'lik iki parçaya ayrılması beklenir. Agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş olan restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü, 258 bç ve 183 bç boyutlarında iki ayrı bant şeklinde görünmektedir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B1</sub> G1465A genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 28.** GABA<sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

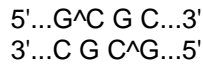
PCR ürününe *EagI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 441 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiştir (*EagI* restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 441 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (AG) olan bireylerden elde edilmiş olan genomik DNA'dan elde edilen PCR örneklerinden bazılarında enziminin kesim bölgesi varken, bazılarında ise kesim yeri bulunmamaktadır. Bu yüzden *EagI* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 441 bç, 258 bç ve 183 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 29'da laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *EagI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



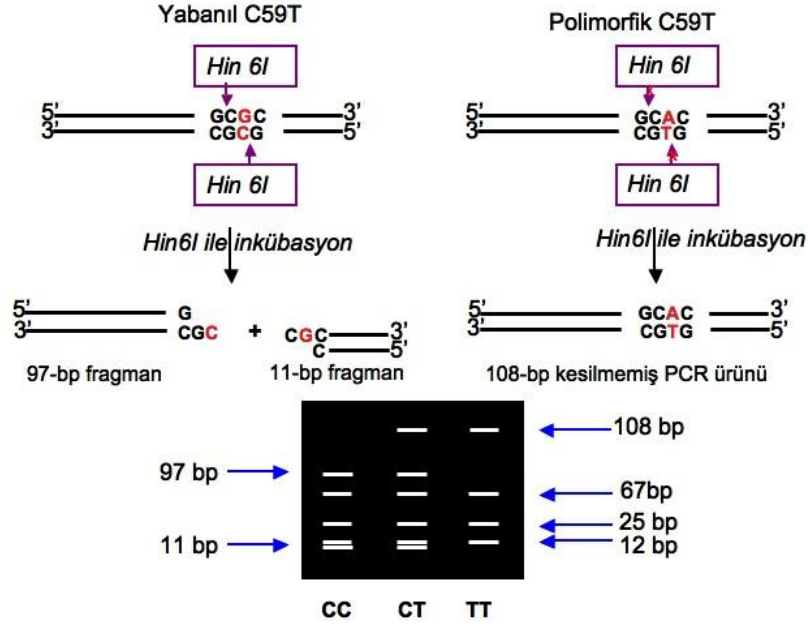
**Şekil 29.** GABA<sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 3.4.6 GABA<sub>B1</sub> C59T bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>B1</sub> C59T genotipleri *Hin6I* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>B1</sub> C59T bölgesinin *Hin6I* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 3 unite *Hin6I* enzimiyle 16 saat boyunca 37<sup>0</sup>C'de inkübasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. *Hin6I* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

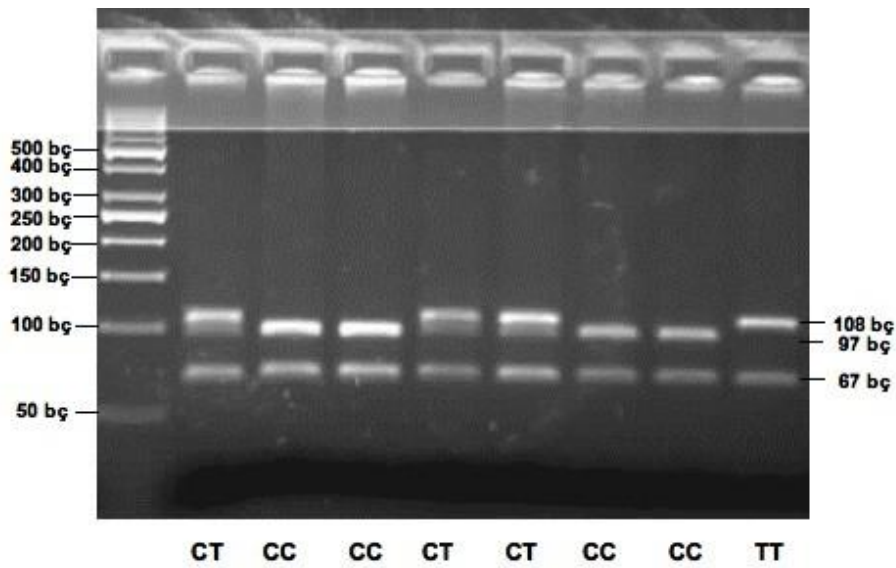


GABA<sub>B1</sub> C59T genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 30'da açıklanmıştır. *Hin6I* enzimi polimorfik nükleotiti belirme dışında PCR ürününü 3 bölgeden tanıyıp 67-bç, 25-bç ve 12-bç'lik bantlara ayırmaktadır. GABA<sub>B1</sub> C59T genetik polimorfizmini belirlemek için yabancı bireylerde 108 bç'lik PCR bandı 97 bç ve 11 bç'lik iki parçaya ayrılmaktadır. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>B1</sub> C59T genotipinin CC olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 30.** GABA<sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

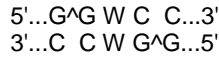
Polimorfik bireylerde, PCR ürününde *Hin6I* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı için 108 bç'lik PCR bandı kesilmeyip, bu bireylerin genotipinin TT olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot (CT) olan bireylerde *Hin6I* enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 108 bç, 97 bç, 67 bç, 25 bç, 12 bç ve 11 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 31'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *Hin6I* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



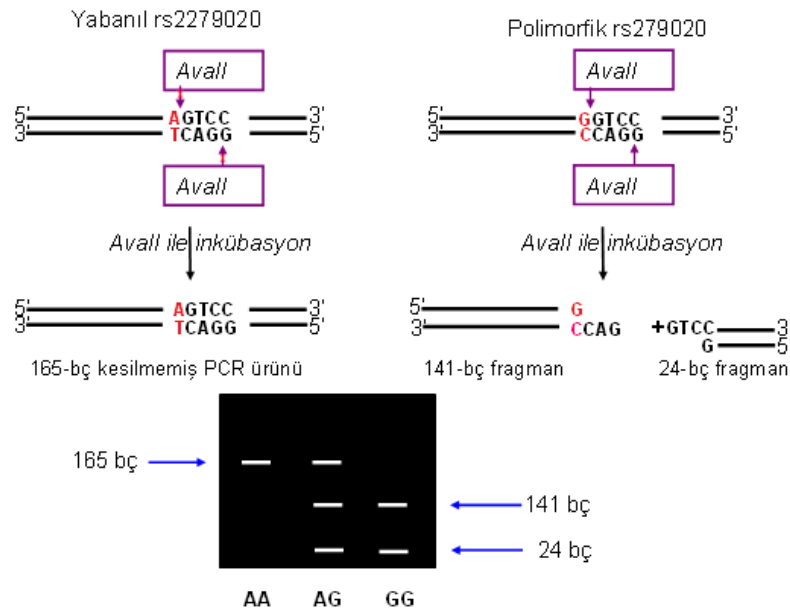
**Şekil 31.** GABA<sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 3.4.7 GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) genotipleri, Avall restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 bölgesinin Avall restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 3 unite Avall enzimiyle 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. Avall enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 32'de açıklanmıştır. PCR ürünüde bu bölge varsa, Avall ile bekletildiğinde, 165 bç'lik PCR ürünü 141 ve 24 bç şeklinde iki parçaya kesilir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.

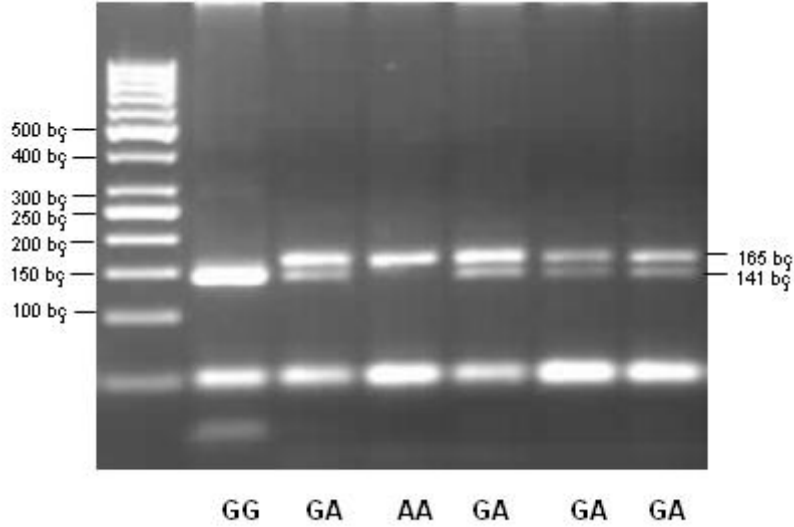


**Şekil 32.** GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

PCR ürünüde Avall enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı takdirde, 165 bç'lik PCR ürünü kesilmeyip, agaroz jel elektroforezinde, kontrol amacıyla jele yüklenmiş (Avall restriksiyon enzimiyle muamele edilmemiş) 165 bç boyutundaki PCR örneğiyle aynı büyüklükte bir bant olarak görünmektedir. Bu durumda bu bireyin genotipinin AA olduğuna



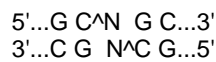
karar verilmiştir. Heterozigot olan bireylerden elde edilmiş olan genomik DNA'dan elde edilen PCR örneklerinden bazılarında Avall enziminin kesim bölgesi varken, bazılarında ise kesim yeri bulunmamaktadır. Bu yüzden Avall enzimiyle muamele edilmiş PCR ürünü jele yüklendiğinde 165 bç, 141 bç ve 24 bç boyutlarında üç bant elde edilmiştir. Şekil 33'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin Avall restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



**Şekil 33.** GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 IVS11+15 A>G (rs2279020) tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

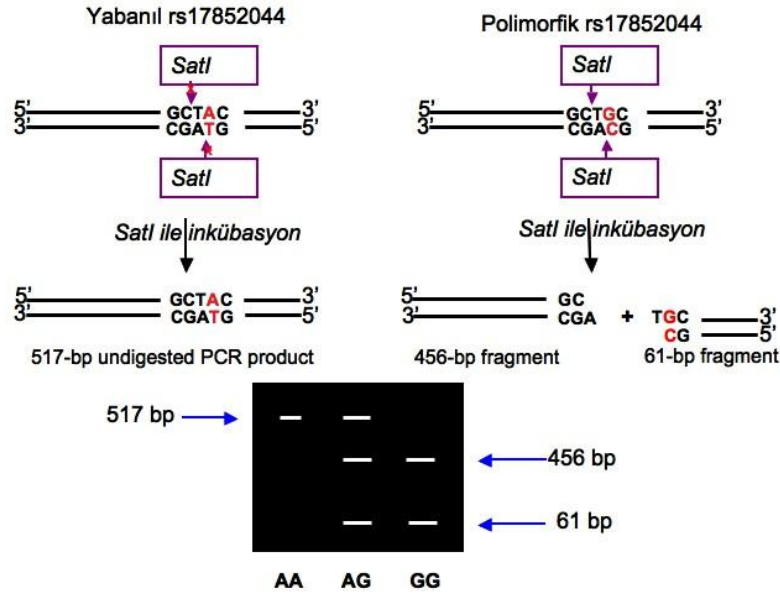
#### 3.4.8 GABA<sub>A</sub> $\alpha$ 2 rs17852044 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2 rs17852044 genotipleri, *Safl* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2 rs17852044 bölgesinin *Safl* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10 $\mu$ L PCR ürününün 3 unite *Safl* enzimiyle 16 saat boyunca 37<sup>0</sup>C'de inkübasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. *Safl* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:



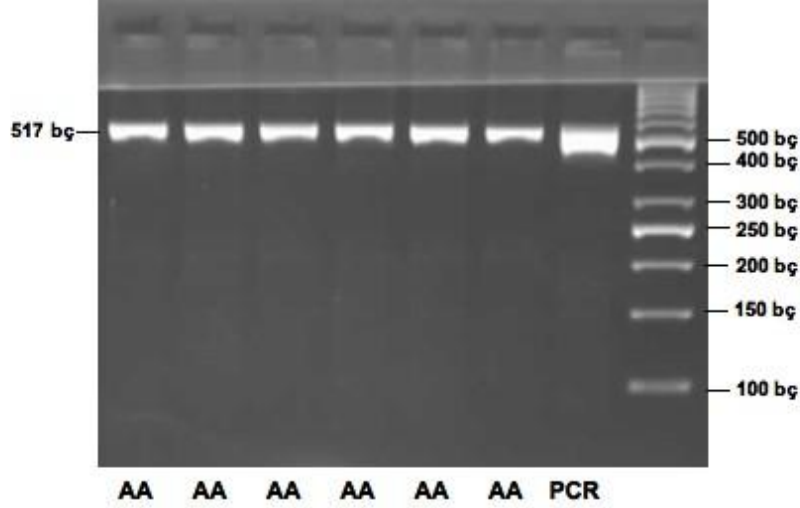
GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2 rs17852044 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 34'te açıklanmıştır. PCR ürününde polimorfik nükleotit dışında *Safl* enzimi

tarafından tanınan bölge sayesinde bütün 538 bç'lik PCR ürünleri 517 bç ve 21 bç olarak kesilmektedir. Yabani tip bireylerin PCR ürünleri *SatI* ile bekletildiğinde, 538 bç'lik PCR ürünü sadece tek bölgeden kesilerek 517 bç ve 21 bç bantlar olarak görülmesi beklenmektedir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 34.** GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

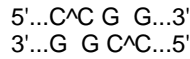
Polimorfik bireylerde, *SatI* enziminin tanıdığı ekstra bir nükleotit dizisi bulunduğu için 456 bç, 61 bç ve 21 bç'lik bantlar görünmesi beklenmektedir. Bu durumda bu bireylerin genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot olan bireylerde 517 bç, 456 bç, 61 bç ve 21 boyutlarında dört bant elde edilmesi beklenmiştir. Şekil 35'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *SatI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



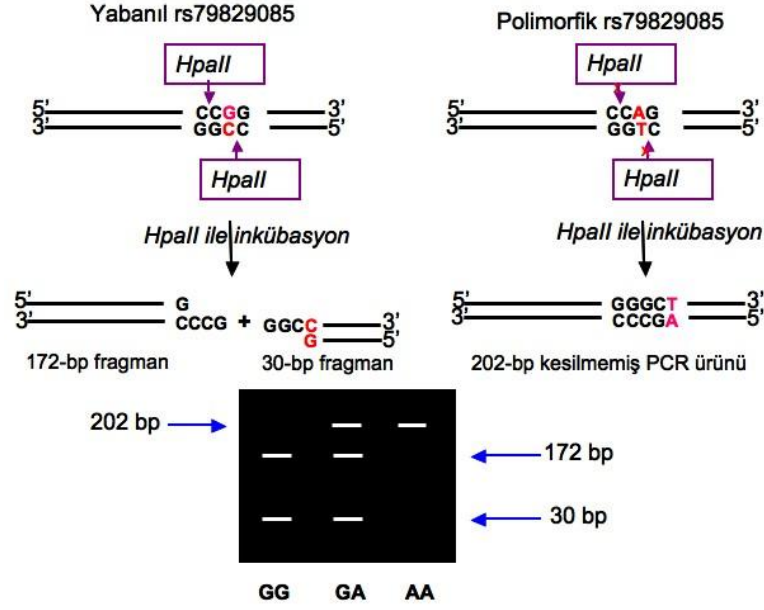
**Şekil 35.** GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 3.4.9 GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimiyle kırılması

GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 genotipleri, *HpaI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle muamele edilip, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda gözlenen bantların büyüklüğüne göre belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 bölgesinin *HpaI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesinde en iyi sonuçların 10µL PCR ürününün 3 unite *HpaI* enzimiyle 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. *HpaI* enziminin tanıma bölgesi aşağıdaki gibidir:

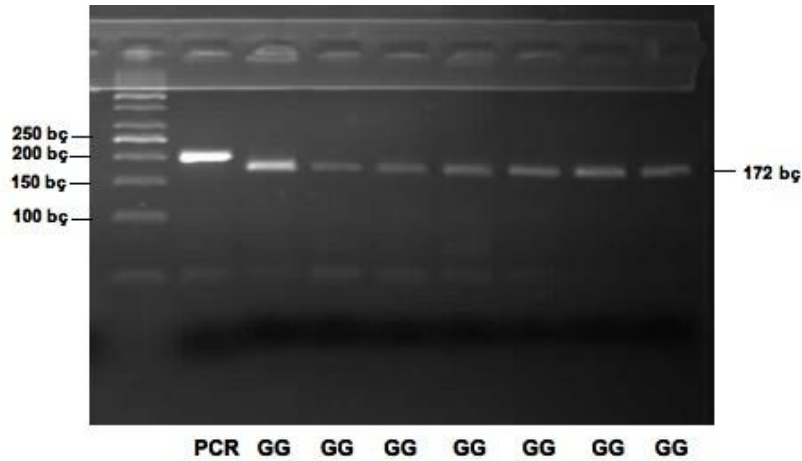


GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 genetik polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi şematik olarak Şekil 36'da açıklanmıştır. Yabani tip bireylerin PCR ürünleri *HpaI* ile bekletildiğinde, 202 bç'lik PCR ürünü 172 bç ve 30 bç şeklinde iki parçaya kesilmesi beklenir. Bu durumda bu PCR ürününün elde edildiği DNA örneğinin alındığı bireyin GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 genotipinin GG olduğuna karar verilmiştir.



**Şekil 36.** GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmine ait genotiplerin belirlenmesi; şematik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Polimorfik bireylerde, *HpaI* enziminin tanıdığı nükleotit dizisi bulunmadığı için PCR ürünü kesilmeyerek, Nu-micropor agaroz jelde 202 bç'lik bant görülmektedir. Bu durumda bu bireylerin genotipinin AA olduğuna karar verilmiştir. Heterozigot olan bireylerde 202 bç, 172 bç ve 30 bç boyutlarında üç bant elde edilmesi beklenmiştir. Şekil 37'de laboratuvarımızda PCR ürünlerinin *HpaI* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonucu elde edilen Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



**Şekil 37.** GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizminin restriksiyon enzim kırılması sonuçlarının Nu-micropor agaroz jel elektroforez görüntüsü.

#### 4. Bulgular

Şimdiye kadar GATA Nöroloji Bölümünce toplanıp ODTÜ Biyoloji Bölümündeki laboratuvarımızda DNA izolasyonu tamamlanan toplam 412 kan örneğinde, yukarıda belirtilen 9 polimorfizmin genotipleme çalışması tamamlanmıştır.

##### 4.1 GABA<sub>B2</sub> rs1999501 tek nükleotit polimorfizmi

GABA<sub>B2</sub> rs1999501 polimorfizmi için 196 epileptik hasta, 107 PNEN ve 109 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 14’de verilmektedir. Homozigot polimorfik genotip her üç grupta da bulunmamıştır. Polimorfik A alelinin frekansı epileptik (İJE) hastalarda 0.092, PNEN geçiren bireylerde 0.061, kontrollerde 0.092 olarak hesaplanmıştır. Polimorfik alel (A) frekansı epilepsi ve kontrollerde aynı bulunmuştur.

**Tablo 14.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş ve kontrol bireylerin GABA<sub>B2</sub> rs1999501 genotip ve alel frekansları

rs 1999501	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>GG</b>	160 (81.6)	94 (87.8)	79 (72.5)	0.889 <sup>a</sup> (0.483- 1.635)	0.704 <sup>a</sup>
<b>GA</b>	36 (18.4)	13 (12.2)	20 (27.5)	1.627 <sup>b</sup> (0.821-3.222)	0.160 <sup>b</sup>
<b>AA</b>	0	0	0		
<b>Aleller</b>					
<b>G</b>	0.908	0.939	0.908	0.900 <sup>c</sup> (0.506-1.600)	0.720 <sup>c</sup>
<b>A</b>	0.092	0.061	0.092	1.564 <sup>d</sup> (0.331-1.234)	0.180 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>A vs. G, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>A vs. G, epileptik vs. PNEN

##### 4.2 GABA<sub>B2</sub> rs967932 tek nükleotit polimorfizmi

196 epileptik hasta, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol bireyin rs967932 genotip ve alel frekansları Tablo 15’de verilmektedir. Bu polimorfizm için de yine homozigot polimorfik genotipe (AA) rastlanmamıştır. Heterozigot genotip riskli kabul edilip homozigot yabancı tipe göre hesap yapıldığında, epileptik bireylerle PNEN geçirmiş bireyler karşılaştırıldığında, heterozigot genotipin, epilepsi riskini 2 kat arttırdığı görülmüştür ( $P=0.083$ ), epilepsi hastalarıyla kontrol bireyleri karşılaştırıldığında bu riskin 1.5 kat olduğu görülmüştür ( $P=0.342$ ).

Polimorfik alelin (A) frekansı epilepsi hastalarında (0.059), PNEN geçirmiş bireylere (0.028) göre daha yüksek bulunmuştur ( $P=0.035$ ). Kontrol bireylerde ise A alelinin frekansı 0.041 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 15.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş ve kontrol bireylerin GABA<sub>B2</sub> rs967932 genotip ve alel frekansları

rs 967932	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>GG</b>	173 (88.3)	101 (94.4)	100 (91.7)	1.477 <sup>a</sup> (0.658-3.317)	0.342 <sup>a</sup>
<b>GA</b>	23 (11.7)	6 (5.6)	9 (8.3)	2.238 <sup>b</sup> (0.882-5.680)	0.083 <sup>b</sup>
<b>AA</b>	0	0	0		
<b>Aleller</b>					
<b>G</b>	0.941	0.972	0.959	1.447 <sup>c</sup> (0.658-3.186)	0.356 <sup>c</sup>
<b>A</b>	0.059	0.028	0.041	2.161 <sup>d</sup> (0.866-5.392)	0.091 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>A vs. G, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>A vs. G, epileptik vs. PNEN

#### 4.3 GABA<sub>B2</sub> rs3780428 tek nükleotit polimorfizmi

196 epileptik hasta, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol bireyin rs3780428 genotip ve alel frekansları Tablo 16'da verilmektedir. Genotip frekansları yönünden gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Polimorfik alel (A) frekansı hesaplandığında kontrol grubunda 0.263, epileptik hastalarda 0.234 ve PNEN geçirmiş bireylerde 0.252 olarak bulunmuştur. Polimorfik alel frekansının epilepsi riskini PNEN geçirmiş bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık 2 kat arttırdığı görülmüştür ( $P=0.002$ ).

**Tablo 16.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA<sub>B2</sub> rs3780428 genotip ve alel frekansları

rs 3780428	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>GG</b>	110 (56.1)	65 (60.7)	61 (56)	0.994 <sup>a</sup> (0.620-1.593)	1.0 <sup>a</sup>
<b>GA</b>	69 (35.2)	34 (31.8)	41 (37.6)	1.210 <sup>b</sup> (0.749-1.955)	0.436 <sup>b</sup>
<b>AA</b>	17 (8.7)	8 (7.5)	7 (6.4)		
<b>Aleller</b>					
<b>G</b>	0.737	0.766	0.748	1.056 <sup>c</sup> (0.723-1.544)	0.777 <sup>c</sup>
<b>A</b>	0.263	0.234	0.252	1.169 <sup>d</sup> (0.793-1.724)	0.430 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>A vs. G, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>A vs. G, epileptik vs. PNEN

#### 4.4 GABA<sub>B2</sub> rs944688 tek nükleotit polimorfizmi

196 epileptik hasta, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol bireyin rs944688 genotip ve alel frekansları Tablo 17’de verilmektedir. Genotip frekansları yönünden gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Polimorfik alel (A) frekansı hesaplandığında kontrol grubunda 0.196, epileptik hastalarda 0.257 ve PNEN geçirmiş bireylerde 0.252 bulunmuştur.

**Tablo 17.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA<sub>B2</sub> rs944688 genotip ve alel frekansları

rs 944688	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>GG</b>	120 (61.2)	61 (57)	68 (62.4)	1.050 <sup>a</sup> (0.648-1.702)	0.842 <sup>a</sup>
<b>GA</b>	75 (38.3)	37 (34.6)	34 (31.2)	0.840 <sup>b</sup> (0.520-1.355)	0.474 <sup>b</sup>
<b>AA</b>	1 (0.5)	9 (8.4)	7 (6.4)		
<b>Aleller</b>					
<b>G</b>	0.804	0.743	0.780	0.866 <sup>c</sup> (0.577-1.299)	0.486 <sup>c</sup>
<b>A</b>	0.196	0.257	0.220	0.707 <sup>d</sup> (0.476-1.049)	0.084 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>GA+AA vs. GG, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>A vs. G, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>A vs. G, epileptik vs. PNEN

#### 4.5 GABA<sub>B1</sub> G1465A tek nükleotit polimorfizmi

Bu çalışmada G1465A polimorfizmine rastlanmamıştır. Çalışılan 412 birey yabancı genotipte bulunmuştur.

#### 4.6 GABA<sub>B1</sub> C59T tek nükleotit polimorfizmi

196 epileptik hasta, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol bireyin C59T genotip ve alel frekansları Tablo 18’de verilmektedir. Heterozigot genotip riskli kabul edilip homozigot yabancı tipe göre hesap yapıldığında, epileptik bireylerle PNEN geçirmiş bireyler karşılaştırıldığında, heterozigot genotipin, epilepsi riskini 1.5 kat arttırdığı görülmüştür ( $P=0.164$ ). Polimorfik alel frekansı epilepsi hastaları (0.102) ve kontrollerde (0.110) yakın bulunmuştur, PNEN geçirmiş bireylerde (0.065) ise daha düşük bulunmuştur.

**Tablo 18.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA<sub>B1</sub> C59T genotip ve alel frekansları

C59T	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>CC</b>	158 (80.6)	93 (86.9)	87 (79.8)	0.951 <sup>a</sup> (0.529-1.710)	0.867 <sup>a</sup>
<b>CT</b>	36 (18.4)	14 (13.1)	20 (18.3)	1.598 <sup>b</sup> (0.822-3.104)	0.164 <sup>b</sup>
<b>TT</b>	2 (1.0)	0	2 (1.8)		
<b>Aleller</b>					
<b>C</b>	0.898	0.935	0.890	0.919 <sup>c</sup> (0.538-1.569)	0.756 <sup>c</sup>
<b>T</b>	0.102	0.065	0.110	1.623 <sup>d</sup> (0.862-3.057)	0.130 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>CT+TT vs. CC, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>CT+TT vs. CC, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>T vs. C, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>T vs. C, epileptik vs. PNEN

#### 4.7 GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 tek nükleotit polimorfizmi

GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020 polimorfizmi için 196 epileptik hasta, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol bireyin genotip ve alel frekansları Tablo 19'da verilmektedir. Homozigot polimorfik genotip (GG), epileptik hastalarda %18.9, PNEN geçirmiş bireylerde %27.1, kontrollerde %18.3 olarak görülmüştür. Polimorfik alel (G) frekansı ise epileptik hastalarda 0.457, PNEN geçirmiş bireylerde 0.453 ve kontrollerde 0.427 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 19.** Epileptik hastalar, PNEN geçirmiş birey ve kontrol bireylerin GABA<sub>A</sub> α1 IVS11+15 A>G (rs2279020) genotip ve alel frekansları

rs 2279020	Epileptik (n=196)	PNEN (n=107)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>Genotipler, n (%)</b>					
<b>AA</b>	54 (27.6)	39 (36.4)	36 (33)	1.297 <sup>a</sup> (0.781-2.154)	0.315 <sup>a</sup>
<b>AG</b>	105 (53.6)	39 (36.4)	53 (48.6)	1.508 <sup>b</sup> (0.912-2.494)	0.108 <sup>b</sup>
<b>GG</b>	37 (18.9)	29 (27.1)	20 (18.3)		
<b>Aleller</b>					
<b>A</b>	0.543	0.547	0.573	1.130 <sup>c</sup> (0.809-1.577)	0.475 <sup>c</sup>
<b>G</b>	0.457	0.453	0.427	1.014 <sup>d</sup> (0.725-1.416)	1.0 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>AG+GG vs. AA, epileptik vs. kontrol

<sup>b</sup>AG+GG vs. AA, epileptik vs. PNEN

<sup>c</sup>G vs. A, epileptik vs. kontrol

<sup>d</sup>G vs. A, epileptik vs. PNEN

#### 4.8 GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 tek nükleotit polimorfizmi

Bu çalışmada rs17852044 polimorfizmine rastlanmamıştır. Çalışılan 412 birey yabancı genotipte bulunmuştur.



#### 4.9 GABA<sub>A</sub> α3 rs79829085 tek nükleotit polimorfizmi

Bu çalışmada rs79829085 polimorfizmine rastlanmamıştır. Çalışılan 412 birey yabancı genotipte bulunmuştur.

#### 4.10 Kombine genotipler

##### 4.10.1 GABA<sub>B1</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri

Bu çalışmada GABA<sub>B1</sub> geninden G1465A ve C59T polimorfizmleri çalışılmıştır. G1465A polimorfizmi için bütün bireyler yabancı genotipte bulunduğu için GABA<sub>B1</sub> geni için kombine genotip hesaplaması yapılamamıştır.

##### 4.10.2 GABA<sub>B2</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri

Bu çalışmada GABA<sub>B2</sub> geninden rs1999501, rs967932, rs3780428 ve rs944688 tek nükleotit polimorfizmleri çalışılmıştır. Bütün genotip kombinasyonlarına bakılıp, istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçlar tablolarda verilmektedir. (Yabancı genotipler Y ile, polimorfik genotipler ise P ile gösterilmiştir).

İJE hastaları ve PNEN geçirmiş bireylerde ikili kombinasyonlara bakıldığında (Tablo 20); rs1999501 için homozigot yabancı (YY) genotip ile rs944688 için polimorfik homozigot (PP) genotip aynı anda taşıyanlara PNEN geçirmiş bireyler arasında, İJE grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha fazla rastlanmıştır. Buradan elde edilen odds oranı (OR) 1'in altında olduğu için bu kombine genotipin PNEN geçirmiş bireylerde İJE için yaklaşık 15 kat koruyucu bir etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir (OR=0.063, P=0.001). Aynı koruyucu etki rs967932-rs944688 için YYPP genotipi taşıyan bireylerde de görülmüştür.

**Tablo 20.** İJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin ikili genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	PNEN (n=107)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501 ve rs944688</b>				
YYPP	1 (0.5%)	8 (7.5%)	0.063 (0.008-0.515)	0.001*
<b>rs967932 ve rs944688</b>				
YYPP	1 (0.5%)	8 (7.5%)	0.063 (0.008-0.515)	0.001*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

İJE hastaları ve kontrol bireylerinde ikili kombinasyonlara bakıldığında (Tablo 21); rs1999501 homozigot yabancı (YY) genotip ile rs944688 homozigot polimorfik (PP) genotipin aynı kişide bulunmasının kontrol bireylerinde İJE için yaklaşık 12 kat koruyucu bir etki gösterdiği görülmüştür ( $P=0.009$ ). Benzer şekilde, rs967932-rs944688 için YYPP genotipi taşıyan bireylerde de İJE'ye karşı 13 katın üzerinde koruyucu etki görülmüştür.

**Tablo 21.** İJE hasta ve kontrol bireylerin ikili genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501 ve rs944688</b>				
YYPP	1 (0.5%)	6 (5.5%)	0.088 (0.010-0.741)	0.009*
<b>rs967932 ve rs944688</b>				
YYPP	1 (0.5%)	7 (6.4%)	0.075 (0.009-0.616)	0.004*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

İJE hastaları ve PNEN geçirmiş bireylerde üçlü kombinasyonlara bakıldığında (Tablo 22); rs1999501 ve rs967932 için homozigot yabancı (YY) tipteyken, homozigot rs944688 polimorfizmi (PP) olan bireylerde bu genotip kombinasyonu PNEN geçirmiş bireylerde İJE için yaklaşık 15 kat koruyucu bir etki göstermiştir ( $P=0.001$ ).

**Tablo 22.** İJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin üçlü genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	PNEN (n=107)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501-rs967932-rs944688</b>				
YYYYPP	1 (0.5%)	8 (7.5%)	0.063 (0.008-0.515)	0.001*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

İJE hastaları ve kontrol bireylerde üçlü kombinasyonlara bakıldığında (Tablo 23); rs1999501 ve rs967932 için homozigot yabancı (YY) tipteyken, homozigot rs944688 polimorfizmi (PP) olan bireylerde bu genotip kombinasyonu kontrol bireylerinde İJE için yaklaşık 12 kat koruyucu bir etki göstermiştir ( $P=0.009$ ).

**Tablo 23.** İJE hasta ve kontrol bireylerin üçlü genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501-rs967932-rs944688</b>				
YYYYPP	1 (0.5%)	6 (5.5%)	0.088 (0.010-0.741)	0.009*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

İJE hastaları, PNEN geçirmiş bireyler ve kontrol bireylerinde dördü kombinasyonlara bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Çin popülasyonunda yapılan çalışmada rs1999501-rs967932-rs3780428-rs944688 (YPYY) haplotip kombinasyonunun mesial temporal lob epilepsisi için risk oluşturabileceği bulunmuştur (WANG, 2008). Bizim çalışmamızda bu haplotipi verebilecek genotip kombinasyonlarına bakıldığında rs967932 için heterozigot olup diğer polimorfizmleri bulundurmayan 4 İJE hastası varken, PNEN geçirmiş ya da kontroller arasında bu haplotipi verebilecek bireye rastlanmamıştır (Tablo 24, 25).

**Tablo 24.** İJE hasta ve PNEN geçirmiş bireylerin dördü genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	PNEN (n=107)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501-rs967932-rs3780428-rs944688</b>				
YYYPYYYY	4 (2.0%)	0 (0%)	-	0.301*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

**Tablo 25.** İJE hasta ve kontrol bireylerin dördü genotip kombinasyonları

	IJE (n=196)	Kontrol (n=109)	OR (95% CI)	P
<b>rs1999501-rs967932-rs3780428-rs944688</b>				
YYYPYYYY	4 (2.0%)	0 (0%)	-	0.301*

\*Fisher exact test uygulanmıştır.

#### 4.10.3 GABA<sub>A</sub> polimorfizmleri kombine genotipleri

Bu çalışmada GABA<sub>A</sub> α1 rs2279020, GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3 geninde bulunan rs79829085 polimorfizmleri çalışılmıştır. GABA<sub>A</sub> α2 rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3

rs79829085 polimorfizmleri için bütün bireyler yabancı genotipte bulunduğu için GABA<sub>A</sub> geni için kombine genotip hesaplaması yapılamamıştır.

## 5. Tartışma

Epilepsi, nöbetler tarafından karakterize edilen bir hastalıktır. Epileptik nöbetlerin en bilindik nedenleri arasında voltaj kapılı ve ligand kapılı iyon kanallarında meydana gelen mutasyonlar bulunmaktadır. GABA nörotransmitteri ve reseptörünün de epileptik nöbet oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda da GABA reseptörlerinde meydana gelen mutasyonların epilepsiyle ilişkisi ispatlanmıştır (STEINLEIN, 2004).

İdiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) türünün genetik nedenleri olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada idiyopatik jeneralize epilepsi ile GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B1</sub> ve GABA<sub>B2</sub> gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır.

### *GABA<sub>A</sub> reseptör polimorfizmleri*

GABA<sub>A</sub> reseptör genindeki mutasyonların, GABA molekülünün bağlanmasını engelleyip, İJE nöbetlerine yol açtığı bilinmektedir (MACDONALD, 2004). GABA<sub>A</sub> α1 reseptöründeki A322D mutasyonunun juvenil myoklonik epilepsiye yol açtığı bilinmektedir (KRAMPFL, 2005).

Bu projede çalışılan, GABA<sub>A</sub> α1 geninde bulunan rs2279020 tek nükleotit polimorfizminin alkol bağımlılığı (PARK, 2006) ve duygudurumu hastalıklarıyla (YAMADA, 2003) ilişkisi bulunmuştur. Ayrıca Kuzey Hindistan'da yapılan bir çalışmada rs2279020 polimorfizminin epilepsi duyarlılığıyla ilişkisi bulunmuştur (KUMARİ, 2010). Bu çalışmada epileptik bireylerle PNEN geçirmiş bireyler karşılaştırıldığında, rs2279020 polimorfizminin İJE riskini PNEN geçirmiş bireylerde 1,5 kat arttırdığı görülmüştür, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.108$ ). Polimorfik alel frekansları üç grupta da birbirine yakın bulunmuştur; epileptik bireylerde 0.457, PNEN geçirmiş bireylerde 0.453 ve kontrol bireylerde 0.427. Türk popülasyonunda ilk defa çalışılan rs2279020 polimorfizminin frekansının yüksek olduğu görülmüştür, fakat İJE ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır.

GABA<sub>A</sub> α2 geninde bulunan rs17852044 ve GABA<sub>A</sub> α3 geninde bulunan rs79829085 tek nükleotit polimorfizmleri ilk defa bu projede çalışılmıştır. Her iki polimorfizme de Türk popülasyonunda rastlanmamıştır.

### *GABA<sub>B1</sub> reseptör polimorfizmleri*

GABA<sub>B1</sub> altbirimi, GABA<sub>B</sub> reseptörünün ligand aktivasyonunda rol alırlar. G1465A polimorfizmi GABA<sub>B1</sub> geninin ekzon 11 bölgesinde yer alır ve glisin aminoasitini serine çevirir (Gly489Ser). Bu bölge GABA reseptörünün bağlanma bölgesini içinde bulundurur (FRENCH, 2003). Böylece G1465A polimorfizminin reseptör fonksiyonları etkilediği düşünülmektedir.

G1465A polimorfizminin epilepsiyle olan ilişkisine ilk olarak temporal lob epilepsisinde rastlanmıştır (GAMBARDELLA, 2003). Ancak daha sonrada bu ilişkiyi çalışan gruplar G1465A ile temporal lob epilepsi arasında bir ilişki bulamamıştır (REN, 2005; STOGMANN, 2006; WANG, 2008). Yapılan bir diğer çalışmada G1465A ile İJE ilişkisine bakılmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (SANDER, 1999).

Türk popülasyonunda G1465A polimorfizmi ile uyku apnesi sendromu ilişkisi çalışılmış ve bu polimorfizme Türk popülasyonunda rastlanmamıştır (BAYAZIT, 2007). Bu çalışmada, Türk popülasyonunda ilk defa İJE ve G1465A arasındaki ilişki çalışılmış fakat benzer bir şekilde bütün bireyler yabancıl genotipte bulunmuştur.

GABA<sub>B1</sub> geninde bulunan C59T polimorfizmi, alanin amino asitini valin amino asitine çevirir (Ala20Val) ve GABA<sub>B1</sub> geninin ekzon1a1 bölgesinde yer alır. Yapılan bir çalışmada İJE hastası olan iki ailenin C59T polimorfizmi taşıdığı saptanmıştır. Ancak sağlıklı akrabaların da bu polimorfizmi taşıdığı görüldüğü için İJE ve C59T arasında bir ilişki sunulamamıştır (SANDER, 1999).

C59T ile İJE ilişkisi Türk popülasyonunda ilk kez çalışılmıştır. Epileptik bireylerle PNEN geçiren bireyler karşılaştırıldığında, C59T polimorfizminin İJE riskini PNEN bireylerinde 1.5 kat arttırdığı görülmüştür, fakat sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $P=0.164$ ). C59T polimorfizminin frekansı kontrol bireylerde bu çalışmada 0.110 olarak bulunmuştur.

GABA<sub>B1</sub> geninde bulunan G1465A ve C59T polimorfizmleri amino asit değişikliğine yol açtığı için ve reseptörde fonksiyonel bir değişiklik yaratabileceği için bu çalışmada bakılmıştır. Fakat İJE ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

*GABA<sub>B2</sub> reseptör polimorfizmleri*

GABA<sub>B2</sub> reseptör altbirimi G-protein kenetli reseptör sinyalizasyonunda rol alır. Çinlilerde yapılan bir çalışmada rs3780428-rs1999501-rs967932-rs94688 polimorfizmlerinin oluşturduğu bir haplotipin mesial temporal lob epilepsisiyle ilişkisi bulunmuştur (WANG, 2008). Bu dört polimorfizmin IJE ile ilişkisine ilk defa bu çalışmada bakılmıştır.

GABA<sub>B2</sub> rs1999501 polimorfizminde homozigot polimorfik bireye rastlanmamıştır. Heterozigot bireyler riskli grup alındığında, epileptik ve PNEN geçirmiş bireyler karşılaştırıldığında, rs1999501 polimorfizminin IJE riskini 1.5 kat arttırdığı görülmüştür ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.160$ ). Bu polimorfizmin mesial temporal lob epilepsisiyle de ilişkili bulunmamıştır (WANG, 2008). GABA<sub>B2</sub> rs1999501 polimorfizminin frekansı bu çalışmada 0.092 olarak bulunmuştur, aynı polimorfizmin frekansı Çin popülasyonunda 0.441 (WANG, 2008) ve NCBI veritabanında 0.200 olarak verilmiştir.

GABA<sub>B2</sub> rs967932 polimorfizminde de homozigot polimorfik bireye rastlanmamıştır. Heterozigot bireyler riskli grup alındığında, epileptik ve PNEN geçirmiş bireyler karşılaştırıldığında, rs967932 polimorfizminin IJE riskini 2 kat arttırdığı görülmüştür ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.083$ ). Epileptik hastalarla kontroller karşılaştırıldığında IJE riskinin 1.5 kat arttığı görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P=0.342$ ). GABA<sub>B2</sub> rs1999501 polimorfizminin frekansı bu çalışmada 0.041 olarak bulunmuştur, aynı polimorfizmin frekansı Çin popülasyonunda 0.416 (WANG, 2008) ve NCBI veritabanında 0.177 olarak verilmiştir.

GABA<sub>B2</sub> rs3780428 polimorfizminde de istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca rastlanmamıştır. Polimorfik alel frekansları üç grupta da birbirine yakın bulunmuştur. Bu polimorfizm mesial temporal lob epilepsisiyle de ilişkili bulunmamıştır (WANG, 2008). GABA<sub>B2</sub> rs3780428 polimorfizminin frekansı bu çalışmada 0.252 olarak bulunmuştur, aynı polimorfizmin frekansı Çin popülasyonunda 0.175 (WANG, 2008) ve NCBI veritabanında 0.320 olarak verilmiştir.

GABA<sub>B2</sub> rs944688 polimorfizminde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca rastlanmamıştır. Polimorfik alel frekansları üç grupta da birbirine yakın bulunmuştur. Bu polimorfizm mesial temporal lob epilepsisiyle de ilişkili bulunmamıştır (WANG, 2008). GABA<sub>B2</sub> rs3780428 polimorfizminin frekansı bu çalışmada 0.220 olarak bulunmuştur, aynı polimorfizmin frekansı Çin popülasyonunda 0.105 (WANG, 2008) ve NCBI veritabanında 0.303 olarak verilmiştir.

#### *Genotip kombinasyonları*

GABA<sub>B2</sub> genindeki rs1999501, rs967932, rs3780428 ve rs944688 tek nükleotit polimorfizmleri için genotip kombinasyonlarına bakıldığında rs944688 için polimorfik homozigot, rs967932 ve rs1999501 için ise yabanıl tip genotipe sahip olmanın PNEN geçirmiş bireylerde İJE için yaklaşık 15 kat koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır ( $P=0.001$ ). Aynı genotip kombinasyonlarının kontrol gruplarında da İJE için yaklaşık 12 kat koruyucu bir etki gösterdiği görülmektedir ( $P=0.009$ ).

Bu verilerden yola çıkarak, bu üçlü genotip kombinasyonunun psikojenik nöbetler geçiren (PNEN) bireylerle gerçek epileptik nöbetlerin ayırımında kullanılabileceğini önerebiliriz. İlerideki çalışmalarda buradan yola çıkılarak, GABA reseptör genlerinde veya başka genlerde bulunan genetik farklılıklar incelenerek PNEN-epilepsi ayırımını yapmaya yarayacak daha başka genotip kombinasyonları da bulunabilir. Bu sayede, psikojenik nöbetlerin epilepsi gibi ele alınıp tedavi yoluna gidilmesi yüzünden gereksiz tıbbi harcamalar yapılmasının önüne geçilebilecektir.

Çin popülasyonunda yapılan çalışmada rs1999501-rs967932-rs3780428-rs944688 (YPPY) genotip kombinasyonunun mesial temporal lob epilepsisi için risk oluşturabileceği bulunmuştur (WANG, 2008). Bizim çalışmamızda bu haplotipi verebilecek genotip kombinasyonlarına bakıldığında rs967932 için heterozigot olup diğer polimorfizmleri bulundurmayan 4 İJE hastası varken, hiç PNEN geçirmiş ya da kontrol bireyine rastlanmamıştır, bu yüzden istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç sunulamamıştır.

Proje sonunda elde ettiğimiz tüm verileri bilimsel 2 makale şeklinde literatüre kazandırmak için makale yazım çalışmalarına başlamış bulunmaktayız.

Sonuç olarak, yol açtığı bireysel yıkım, çevrenin yüklenmesi gereken görevler ve tıbbi yardım harcamalarının ülke ekonomisine getirdiği yük nedeniyle önemli bir sağlık problemi olan epilepsinin, güçlü genetik temelleri olduğuna inanılan bir türü olan idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) ile GABA reseptör polimorfizmlerinin ilişkisini araştırdığımız bu projemizde daha önce Türk popülasyonunda hiç çalışılmamış polimorfizmler İJE riski açısından incelenmiştir. Bu polimorfizmlerden bazıları tüm dünyada da İJEde ilk kez bu çalışma kapsamında ele alınmıştır. Elde edilen verilere göre, incelenen polimorfizmlerin hiçbirisi tek başına risk teşkil etmezken, bazı genotiplerin birlikte bulunmasının İJE riskini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Önerimiz, daha uzun süreli ve birkaç merkezin birlikte katıldığı daha büyük ölçekli bir çalışma yapılarak bu polimorfizmlerin etkilerinin teyit edilmesi uygun olabilir.

### Kaynaklar:

- Apak S., Özmen M., Özaktaş B., *Pediatric Epileptoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul (1986). Pp:131-750.
- Aziz H., *Epilepsy: prevalence, stigma, treatment status and psychosocial problems*. Neurology and Public Health. Reports of a WHO Meeting, ed: Kirbas D., Leonardi M., İstanbul, (1995). Pp: 19–28.
- Badran S., Schmutz M., Olpe H.R., *Comparative in vivo and in vitro studies with the potent GABAB receptor antagonist, CGP 56999A*, *Eur. J. Pharmacol*, 333, 135-142, (1997).
- Baulac S., Gourfinkel-An I., Picard F., et al., *A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33*, *Am J Hum Genet*, 65, 1078-85, (1999).
- Baulac S., Huberfeld G., Gourfinkel-An I., et al., *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: A mutation in the gamma-2-subunit gene*, *Nat Genet*, 28, 46-8, (2001).
- Baykan B., Gürses C., Gökyiğit A., *Epilepsi. Nöroloji. İ.Ü. Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları*. ed. Öge A.E., Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. (2004). Pp: 279-309.
- Berkovic S.F., Anderman F., Anderman E., Gloor P., *Concepts of absence epilepsy: discrete syndromes or biological continuum?* *Neurology*, 37, 993-1000, (1987).
- Betts T., *Pseudoseizures: seizures that are not epilepsy*, *The Lancet*, 21, 163-164, (1990).
- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M., *Molecular Structure and Physiological Functions of GABA<sub>B</sub> Receptors*, *Physiol. Rev*, 84, 835-867, (2004).
- Biervert C., Schroeder B.C., Kubisch C., Berkovic S.F., Propping P., Jentsch T.J., Steinlein O.K., *A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy*, *Science*, 279, 403-6, (1998).
- Bolat E., *Epilepsi Hastalarında Psikiyatrik Komorbidite Depresyon, Anksiyete Düzeyleri ve Yaşam Kalitesi*, (Uzmanlık tezi), İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, (2007).
- Bottini N., Saccucci P., Piciullo A., et al., *Convulsive disorder and the genetics of signal transduction: A study of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase in a pediatric sample*, *Neurosci Lett*, 333,159-62, (2002).
- Buono R.J., Lohoff F.W., Sander T., Sperling M.R., O'Connor M.J., Dlugos D.J., Ryan S.G., Golden G.T., Zhao H., Scattergood T.M., Berrettini W.H., Ferraro T.N., *Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility*, *Epilepsy Res*, 58, 175-83, (2004).
- Cavalleri G.L., Lynch J.M., Depondt C., Burley M.W., Wood N.W., Sisodiya S.M., Goldstein D.B., *Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here?* *Brain*, 128, 1832-1840, (2005).





Çalışır N., Bora I., Irgil E., Boz M., Prevalence of Epilepsy in Bursa City Center, an Urban Area of Turkey. *Epilepsia*, 47(10), 1691–1699, (2006).

Chioza B., Osei-Lah A., Wilkie H., Nashef L., McCormick D., Asherson P., Makoff A.J., Suggestive evidence for association of two potassium channel genes with different idiopathic generalised epilepsy syndromes, *Epilepsy Res*, 52,107-16, (2002).

Cossette P., Liu L., Brisebois K., et al., Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy, *Nat Genet*, 31, 184-9, (2002).

Crunelli V., Leresche N., Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons, and networks, *Nat. Rev., Neurosci*, 3, 371–382, (2002).

de Bittencourt P.R.M., Adamolekun B., Bharuca N., Carpio A., Cossio O.H., Danesi M.A., Dumas M., Meinardi H., Ordinario A., Senanayake N., Epilepsy in tropics I. epidemiology; socioeconomic risk factors and etiology, *Epilepsia*, 37, 1121-1127, (1996).

Durner M., Keddache M.A., Tomasini L., et al., Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: Evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type, *Ann Neurol*, 49, 328-35, (2001).

Escayg A., MacDonald B.T., Meisler M.H., et al., Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2, *Nat Genet*, 24, 343-5, (2000).

French, J. A gene polymorphism associated with temporal lobe epilepsy? *Epilepsy currents / American Epilepsy Society*, 3(4):123-124, (2003).

Gambardella, A., Manna, I., Labate, A., Chifari, R., La Russa, A., Serra, P., Cittadella, R., Bonavita, S., Andreoli, V., LePiane, E., Sasanelli, F., Di Costanzo, A., Zappia, M., Tedeschi, G., Aguglia, U., and Quattrone, A. GABA(b) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 60(4):560–563, (2003).

Gervasi N., Monnier Z., Vincent P., Paupardin-Tritsch D., Hughes S.W., Crunelli V., Leresche N., Pathway-specific action of gamma-hydroxybutyric acid in sensory thalamus and its relevance to absence seizures, *J. Neurosci*, 23, 11469–11478, (2003).

Gourie-Devi M., Gururaj G., Satischandra P., Neuroepidemiology in India, a perspective. Recent advances in tropical neurology. ed: Rose F.C., Elsevier. Amsterdam, (1995). Pp: 17–30.

Gracia F.J., Loo S., Castillo L., Epidemiology of epilepsy in Guaymi Indians from Bocas del Toro province, Republic of Panama, *Epilepsia*, 31, 718-723, (1990).

Greenberg D.A., Durner M., Delgado-Escueta A.V., Evidence for multiple gene loci in the expression of the common generalised epilepsies, *Neurology*, 42, 56-62, (1992).

Greenberg D.A., Cayanis E., Strug L., et al., Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy, *Am J Hum Genet*, 76, 139-46, (2005).

Guvener A., Isik A., Ilbars Z. ve ark. Epidemiological, clinical and sociocultural aspects of epilepsy as determined by a community-based survey in Central Anatolia. Neurology and Public Health. Reports of a WHO Meeting, ed: Kirbas D., Leonardi M., Istanbul, (1995). Pp: 128–140.

Hauser W.A., Hesdorffer D.C., Incidence and prevalence. Epilepsy: frequency, causes and consequences, ed: Hauser WA, Hesdorffer DC Demos, New York, (1990). Pp: 1–51.

Haug K., Warnstedt M., Alekov A.K., et al., Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies, *Nat Genet*, 33, 527-32, (2003).

Hosford D.A., Clark S., Cao Z., Wilson Jr. W.A., Lin F.H., Morrisett R.A. , Huin A., The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice, *Science* 257, 398-401, (1992).



- Kapoor A., Vijai J., Ravishankar H.M., Satishchandra P., Radhakrishnan K., Anand A., Absence of GABRA1 Ala322Asp mutation in juvenile myoclonic epilepsy families from India, *J Genet*, 82, 17-21, (2003).
- Kauffman M.A., Levy E.M., Consalvo D., Mordoh J., Kochen S., GABABR1 (G1465A) gene variation and temporal lobe epilepsy controversy: new evidence, *Seizure*, 17(6), 567-71, (2008).
- Khatri I.A., Iannaccone S.T., Ilyas M.S., Abdullah M., Saleem S., Epidemiology of Epilepsy in Pakistan: review of literature, *J Pak Med Assoc*, 53(12), 594-6, (2003).
- Krampfl, K., Maljevic, S., Cossette, P., Ziegler, E., Rouleau, G. A., Lerche, H., and Bufler, J. Molecular analysis of the A322D mutation in the GABA receptor alpha-subunit causing juvenile myoclonic epilepsy, *Eur J Neurosci*, 22(1), 10–20, (2005).
- Kumari R., Lakhan R., Kalita J., Misra U.K., Mittal B., Association of alpha subunit of GABA(A) receptor subtype gene polymorphisms with epilepsy susceptibility and drug resistance in north Indian population. *Seizure*, 19(4), 237-41, (2010).
- Lahiri D.K., Schnabel B., DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality, *Biochem Genet*, 31(7-8), 321-8, (1993).
- Langlois M.R., Delanghe J.R., Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans, *Clin Chem*, 42, 1589-600, (1996).
- Lesser R.P., Psychogenic seizures. Recent advances in epilepsy 2, ed: Pedley TA, Meldrum BS, Churchill Livingstone, Edinburgh, (1985). Pp: 273-296.
- Liu Z., Vergnes M., Depaulis A., Marescaux C., Involvement of intrathalamic GABAB neurotransmission in the control of absence seizures in the rat, *Neuroscience*, 48, 87–93, (1992).
- Lucarini N., Verrotti A., Napolioni V., Bosco G., Curatolo P., Genetics and Idiopathic Generalized Epilepsies, *Pediatr Neurol*, 37(3), 157-64, (2007).
- Lopes-Cendes I., Scheffer I.E., Berkovic S.F., Rousseau M., Andermann E., Rouleau G.A., A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2, *Am J Hum Genet*, 66, 698-701, (2000).
- Ma S., Abou-Khalil B., Sutcliffe J.S., Haines J.L., Hedera P., The GABBR1 locus and the G1465A variant is not associated with temporal lobe epilepsy preceded by febrile seizures, *BMC Med. Genet*, 6, 1-5, (2005).
- Ma S., Blair M.A., Abou-Khalil B., Lagrange A.H., Gurnett C.A., Hedera P., Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy, *Epilepsy Res*, 71, 129-34, (2006).
- MacDonald, R., Gallagher, M., Feng, H., and Kang, J. GABA receptor epilepsy mutations. *Biochemical Pharmacology*, 68(8):1497-1506, (2004).
- Mahmoud A.T., Abdel-Tawab A.M., Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Glutamate Levels in the CSF of Epileptic Children, *Alexandria Journal of Pediatrics*, 13 (2), 423-427, (1999).
- Marescaux C., Vergnes M., Depaulis A., Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg—A review, *J. Neural Trans.*, Suppl. 35, 37–69, (1992).
- Moulard B., Guipponi M., Chaigne D., Mouthon D., Buresi C., Malafosse A., Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33, *Am J Hum Genet*, 65,1396-400, (1999).



Menkes J.H., Paroxysmal Disorders, Textbook of Child Neurology, Williams and Wilkins, Baltimore-USA, Fifth edition. (1995). 12, 725-760.

Olsen R.W., DeLorey T.M., Gordey M., Kang M.H., GABA receptor function and epilepsy, *Adv Neurol*, 79, 499-510, (1999).

Onal A.E., Tumerdem Y, Ozturk MK., Gurses C, Baykan B, Gokyigit A, Ozel S., Epilepsy prevalence in a rural area in Istanbul., *Seizure*, 11, 397–401, (2002).

Ozdemir Z. Prevalence and clinical features of epilepsy in a rural area of Sivas province, Turkey (In Turkish). Neurology and Public Health. Reports of a WHO Meeting ed: Kirbas D., Leonardi M., Istanbul, (1995). Pp: 141-143.

Özdamar N., Kumral K., Epilepsi, Nöroloji-Nöroşiruji. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1992). Pp: 318-323.

Park, C.-S. S., Park, S.-Y. Y., Lee, C.-S. S., Sohn, J.-W. W., Hahn, G.-H. H., and Kim, B.-J. J. Association between alcoholism and the genetic polymorphisms of the GABAA receptor genes on chromosome 5q33-34 in korean population. *Journal of Korean medical science*, 21(3):533–538, (2006).

Pedley T.A., Bazil C.W., Morrell M.J., Epilepsy. Merritt's neurology. Ed: Rowland L.P., 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2000). Pp: 8123–8133.

Peters H.C., Kämmer G., Volz A., Kaupmann K., Ziegler A., Bettler B., Epplen J.T., Sander T., Riess O., Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy, *Neurogenetics*, 2(1), 47-54, (1998).

Petroff O.A., Rothman D.L., Behar K.L., Mattson R.H., Low brain GABA level is associated with poor seizure control, *Ann Neurol*, 40(6), 908-11, (1996).

Pin J.P., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., Duthey B., Havlickova M., Blahos J., Prezeau L., Rondard P., Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor, *Biochem. Pharmacol*, 68, 1565-1572, (2004).

Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, *Epilepsia*, 30(4), 389-99, (1989).

Prosser H.M., Gill C.H., Hirst W.D., Grau E., Robbins M., Calver A., Soffin E.M., Farmer C.E., Lanneau C., Gray J., Schenck E., Warmerdam B.S., Clapham C., Reavill C., Rogers D.C., Stean T., Upton N., Humphreys K., Randall A., Geppert M., Davies C.H., Pangalos M.N., Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA-B1 deficient mice, *Mol Cell Neurosci*, 17, 1059-1070, (2001).

Rating D., Siemes H., Löscher W., Low CSF GABA concentration in children with febrile convulsions, untreated epilepsy, and meningitis, *Journal of Neurology*, 230 (4), 217-225, (1983).

Ren L., Jin L., Zhang B., Jia Y., Wu L., Shen Y., Lack of GABABR1 gene variation (G1465A) in a Chinese population with temporal lobe epilepsy, *Seizure*, 14, 611-613, (2005).

Ryan S.G., Ion channels and the genetic contribution to epilepsy, *J Child Neurol*, 14, 58-66, (1999).

Salzmann A., Moulard B., Crespel A., Baldy-Moulinier M., Buresi C., Malafosse A., GABA receptor 1 polymorphism (G1465A) and temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, 46, 931-933, (2005).

Sander, T., Peters, C., Kämmer, G., Samochowiec, J., Zirra, M., Mischke, D., Ziegler, A., Kaupmann, K., Bettler, B., Epplen, J. T., and Riess, O. Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABAB receptor and idiopathic generalized epilepsy. *American journal of medical genetics*, 88(4):305-310, (1999).

Sander T., Peters C., Kammer G., Samochowiec J., Zirra M., Mischke D., Ziegler A., Kaupmann K., Bettler B., Epplen J.T., Riess O., Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABA-B receptor and idiopathic generalized epilepsy, *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 88, 305-310, (1999).

Sander T., Schulz H., Saar K., et al. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies, *Hum Mol Genet*, 9, 1465-72, (2000).

Sander J.W., The epidemiology of epilepsy revisited, *Curr Opin Neurol*, 16, 165-170, (2003).

Sato S. The epidemiological and clinico-statistical study of epilepsy in Niigata City, part 2, *Clinical Neurology* 4, 413-424, (1964).

Saccucci P., Verdecchia M., Piciullo A., et al., Convulsive disorder and genetic polymorphism. Association of idiopathic generalized epilepsy with haptoglobin polymorphism, *Neurogenetics*, 5, 245-8, (2004).

Sadrzadeh S.M., Saffari Y., Bozorgmehr J., Haptoglobin phenotypes in epilepsy, *Clin Chem*, 50, 1095-7, (2004).

Schuler V., Luscher C., Blanchet C., Klix N., Sansig G., Klebs K., Schmutz M., Heid J., Gentry C., Urban L., Fox A., Spooren W., Jatou A.L., Vigouret J., Pozza M., Kelly P.H., Mosbacher J., Froestl W., Kaslin E., Korn R., Bischoff S., Kaupmann K., Van Der Putten H., Bettler B., Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA-B responses in mice lacking GABA-B1, *Neuron*, 31, 47-58, (2001).

Scott D.F., Recognition and diagnostic aspects of nonepileptic seizures, Pseudoseizures, ed: Riley T.L., Roy A., Williams&Wilkins, Baltimore, (1982). Pp: 21-34.

Seğmen H., İdyopatik jeneralize epilepsilerde genetiğin yeri ve SCN1a geninde D188V mutasyonu (Uzmanlık tezi), Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, (2005).

Singh N.A., Charlier C., Stauffer D., DuPont B.R., Leach R.J., Melis R., Ronen G.M., Bjerre I., Quattlebaum T., Murphy J.V., McHarg M.L., Gagnon D., Rosales T.O., Peiffer A., Anderson V.E., Leppert M., A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns, *Nat Genet*, 18, 25-9, (1998).

Singh N.A., Westenskow P., Charlier C., Pappas C., Leslie J., Dillon J., Anderson V.E., Sanguinetti M.C., Leppert M.F., BFNC Physician Consortium, KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: Expansion of the functional and mutation spectrum, *Brain*, 126, 2726-37, (2003).

Shorvon S.D., Farmer P.J., Epilepsy in developing countries: a review of epidemiological, sociocultural and treatment aspects, *Epilepsia*, 29(suppl 1), 36-54, (1988).

Sisodia S.M., Duncan J., Epilepsy: epidemiological, clinical assessment, investigation and natural history, *Medicine*, 32 (10), 47-51, (2004).

Snead III O.C., Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents, *J. Neural Trans.*, Suppl. 35, 7-19, (1992).

Steinlein, O. K., Mulley, J. C., Propping, P., Wallace, R. H., Phillips, H. A., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E., and Berkovic, S. F. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature genetics*, 11(2):201-203, (1995).

Steinlein O.K., Noebels J.L., Ion channels and epilepsy in man and mouse., *Curr Opin Genet Dev.*, 10, 286-291, (2000).



Stogmann, E., Zimprich, A., Baumgartner, C., Gleiss, A., and Zimprich, F. Lack of association between a GABA receptor 1 gene polymorphism and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 47(2):437-439, (2006).

Tan N.C., Heron S.E., Scheffer I.E., Berkovic S.F., Mulley J.C., Is variation in the GABA(B) receptor 1 gene associated with temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, 46, 778-780, (2005) .

Thuault S.J., Brown J.T., Sheardown S.A., Jourdain S., Fairfax B., Spencer J.P., Restituito S., Nation J.H., Topps S., Medhurst A.D., Randall A.D., Couve A., Moss S.J., Collingridge G.L., Pangalos M.N., Davies C.H., Calver A.R., The GABA(B2) subunit is critical for the trafficking and function of native GABA(B) receptors, *Biochem. Pharmacol*, 68, 1655-1666, (2004).

Topalkara K., Akyüz A., Sümer H., A study on epilepsy prevalence in Sivas city centre performed with stratified sampling method (In Turkish). *Epilepsi*, 5(1), 24–29, (1999).

Topalkara K., Ozkul Y., Dener S. ve ark., A study on epilepsy prevalence at Alibaba District, Sivas (In Turkish). *C. U. Medical Faculty Journal*, 16, 211–215, (1994).

Varlı K., Yalancı Epileptik Nöbetler, *Klinik Psikiyatri* 2, 101-104, (1999).

Wallace R.H., Wang D.W., Singh R., et al., Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B, *Nat Genet*, 19, 366-70, (1998).

Wallace R.H., Scheffer I.E., Barnett S., et al., Neuronal sodiumchannel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus, *Am J Hum Genet*, 68, 859-65, (2001).

Wallace R.H., Scheffer I.E., Parasivam G., et al., Generalized epilepsy with febrile seizures plus: Mutation of the sodium channel subunit SCN1B, *Neurology*, 58, 1426-9, (2002).

Wallace R.H., Marini C., Petrou S., et al., Mutant GABA(A) receptor gamma-2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures, *Nat Genet*, 28, 49-52, (2001).

Wang X., Sun W., Zhu X., Li L., Wu X., Lin H., Zhu S., Liu A., Du T., Liu Y., Niu N., Wang Y., Liu Y., Association between the gamma-aminobutyric acid type B receptor 1 and 2 gene polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy in a Han Chinese population, *Epilepsy Res*, 81(2-3), 198-203, (2008).

Yamada, K. Evidence of association between gamma-aminobutyric acid type a receptor genes located on 5q34 and female patients with mood disorders. *Neuroscience Letters*, 349(1):9–12, (2003).

Zhu Q., Yuan X.R., Sun Z.D., The epidemiological and sociological analysis: current situation and our strategies of the epilepsy, *J Shanxi Med Univ*, 7, 217-220, (2005).

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000011677;r=X:151334706-151620337;t=ENST00000370311](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000011677;r=X:151334706-151620337;t=ENST00000370311) Son erişim tarihi: 01.10.2011

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/> Son erişim tarihi: Son erişim tarihi: 01.10.2011

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> Son erişim tarihi: 01.10.2011

<http://www.itfnoroloji.org/epilepsi/Epilepsi.htm>, Son erişim tarihi 24.11.2009.



## TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No: 210T117</b>
<b>Proje Başlığı:</b> Gama Amino Butirik Asit (GABA) reseptörlerinin genetik polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi arasındaki ilişkinin araştırılması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN (Yürütücü) (Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı) Prof. Dr. Orhan ADALI (Araştırmacı) (ODTÜ Biyoloji Bölümü) Yrd. Doç. Dr. Vedat Semai BEK (Araştırmacı) (GATA Nöroloji Bölümü) Ezgi EROĞLU (Bursiyer) (ODTÜ Biyoloji Bölümü) Yağmur MIÇOOĞULLARI (Bursiyer) (ODTÜ Biyoloji Bölümü)
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (yeni adı: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu) Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye Ankara.</li><li>ODTÜ Biyoloji Bölümü</li><li>GATA Nöroloji Bölümü</li></ul>
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TBAG</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.03.2011-01.03.2012</b>
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Gama aminobütirik asit (GABA) reseptörlerinden GABA <sub>A</sub> , GABA <sub>B1</sub> ve GABA <sub>B2</sub> 'yi kodlayan genlerde bulunan bazı tek nükleotit polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi (İJE) ve/veya psikojenik non-epileptik nöbetler (PNEN) arasında bir ilişki olup olmadığının araştırıldığı bu projeye 196 İJE hastası, 107 PNEN geçirmiş birey ve 109 kontrol dahil edilmiş; elde edilen veriler, Türk popülasyonunda ilk kez incelenen bu polimorfizmlerin tek başına İJE veya PNEN için risk faktörü olmadığını, öte yandan bazı genotiplerin birlikte bulunmasının epilepsi riskini azalttığı ortaya koymuştur.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> gama amino bütirik asit, GABA, idiyopatik jeneralize epilepsi, genetik polimorfizm
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu</b> Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Bildiri-- Ezgi Eroğlu, Yağmur Miçooğulları, Birsen Can Demirdöğen, Güray Koç, Semai Bek, Şeref Demirkaya, Orhan Adalı. The association between GABAB2 receptor gene polymorphisms and idiopathic generalized epilepsy. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi. 29 Kasım-2 Aralık 2011, Adana. Türk Biyokimya Dergisi. 2011; 36 (S). P.131. Yüksek Lisans Tezi-- <b>Ezgi Eroğlu</b> . Gama amino butirik asit (GABA) tip B reseptörlerinin genetik polimorfizmleri ile idiyopatik jeneralize epilepsi arasındaki ilişkinin araştırılması (Association between gamma aminobutyric acid (GABA) type B receptors gene polymorphisms and idiopathic generalized epilepsy). Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı. Şubat 2012.





Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.

## ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

Proje Adı	Proje Yürütücüsü
<p><b>(PROJE ŞEKİL/GRAFİK/ FOTOĞRAF)</b> (En fazla 4 tane – jpg formatında, 35 x 35 cm (300 dpi)): İsimleriyle ve şekil altı açıklamalarıyla birlikte sıralanmış olarak formda belirtilmesi ve 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyaları halinde formun ekleri olarak gönderilmesi gerekmektedir.</p>	Proje No
	Destek Miktarı (TL)
	Proje Başlama-Bitiş Tarihi
	Yürütücü Kuruluş
	<p><b>(PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ FOTOĞRAF)</b> 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyası olarak forma eklenmelidir.</p>
<b>Projenin Amacı ve Önemi</b> (En fazla 150 kelime) (Maddeler halinde sıralayınız)	
<b>Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar</b> (En fazla 200 kelime) <ul style="list-style-type: none"><li>• Projeden uluslararası, etki faktörü yüksek dergilerde yapılan yayın(lar)-(etki faktörünü de veriniz)</li><li>• Proje kapsamında elde edilen ürün, buluş, çıktı vb. için alınacak/alınmış patentler ve/veya gerçekleştirilmiş/gerçekleştirilecek teknolojik/ticari uygulama(lar)</li><li>• Proje kapsamında alınan ödüller/ödül adaylıkları</li><li>• Projenin ülkenin bilimsel ve teknolojik araştırma gücüne, bilim insanı yetiştirilmesi ve yeni yetenekler kazanılmasına sağladığı katkılar</li></ul>	
<b>Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi</b> (En fazla 150 kelime)	

1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:  
Adı – Soyadı : Birsen CAN DEMİRDÖĞEN  
Unvanı : Dr.  
Telefon : 0312 458 21 35  
E-posta adresi : birsencan.demirdogen@gmail.com