NÖROTENSİN GENİNİN 3' KODLAMA YAPMAYAN BÖLGESİNDEKİ SEKANS VARYANTLARININ ŞİZOFRENİ İLE İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra BOZTEPE

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROTENSİN GENİNİN 3' KODLAMA YAPMAYAN BÖLGESİNDEKİ SEKANS VARYANTLARININ ŞİZOFRENİ İLE İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra BOZTEPE
0009-0007-9921-8091

Doç. Dr. Dilek PİRİM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÖROTENSİN GENİNİN 3’ KODLAMA YAPMAYAN BÖLGESİNDEKİ SEKANS VARYANTLARININ ŞİZOFRENİ İLE İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra BOZTEPE

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Dilek PİRİM

Şizofreni (SCZ), dünya çapında nüfusun %1'ini etkileyen karmaşık nöropsikiyatrik bir bozukluktur. SCZ'nin etiyolojisi, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile açıklanmaktadır. Genetik risk faktörlerinin SCZ oluşum riskinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ve bu faktörlerin etkisi popülasyonlara özgü sekans varyantları nedeniyle farklılık gösterebilir. Çalışmamızda dopaminle ilgili patofizyolojik olaylarda rol oynadığı bilinen Nörotensin (*NTS*)’in 3' kodlama yapmayan (3'UTR) bölgesindeki sekans varyantları SCZ tanısı konmuş 50 hasta ve 50 sağlıklı bireyin dahil edildiği toplam 100 bireyde incelenmiştir. Genomik DNA izolasyonu için periferik kan örnekleri kullanılmıştır. *NTS*’nin 3'UTR'sinin sekanslanması Sanger sekanslama ile gerçekleştirilmiştir. Sekanslama verileri BioEdit ve DNAbaser uygulamaları kullanılarak analiz edilmiştir. Hardy-Weinberg dengesi ve genotiplerin alel frekansları Haploview programı ile değerlendirilmiştir. Tespit edilen varyantların genotip ve minör alel frekanslarının (MAF) dağılımı ve anlamlılığı SPSS yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Toplam örneklemde iki bilinen sekans varyantı (rs11117072, rs139226362) tespit edilmiştir; bunlardan rs11117072-A minör alel frekansı 0,025 olup, A alelinin dağılımı hastalar (MAF=0,020) ve sağlıklı grup (MAF=0,030) arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. rs139226362 ise bir indel (delGATT) olup vaka ve kontrol grupları arasında anlamlı MAF dağılımları gözlenmemiştir. Biyoinformatik analiz sonuçlarımıza göre genin 3'UTR'sinde bulunan iki varyantın gene miRNA bağlanma bölgesi kazandırarak veya kaybettirerek gen düzenlemelerinde rol oynayabilecek dizilerde yer aldığı bulunmuştur. Sonuç olarak bulgularımız bu varyantları SCZ ile ilişkilendirememiştir. Ancak ileride yapılacak daha geniş kohort çalışmalarında 3'UTR/*NTS*'nin SCZ üzerindeki işlevsel öneminin değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Şizofreni, 3’UTR, Nörotensin, Sanger sekanslama.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ASSOCIATIONS OF SEQUENCE VARIANTS IN THE 3' UNTRANSLATED REGION OF THE NEUROTENSIN GENE WITH SCHIZOPHRENIA

Esra BOZTEPE

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Doç. Dr. Dilek PİRİM

Schizophrenia (SCZ) is a complex neuropsychiatric disorder affecting 1% of the population worldwide. Genetic risk factors are known to play an essential role in the risk of SCZ occurrence and their effect may be diverse in distinct populations due to population specific sequence variations. In our study, the sequence variants in the 3' untranslated region (3'UTR) of the Neurotensin (*NTS*) gene, which is known to play a role in dopamine-related pathophysiological events, were examined in 50 patients diagnosed with SCZ and 50 healthy individuals. The resequencing of the 3'UTRs of the *NTS* was performed by Sanger Sequencing. Hardy-Weinberg equilibrium and allele frequencies of the genotypes were assessed using the Haploview program. The distributions of the genotype and minor allele frequencies (MAF) of the variants were analyzed using SPSS software. We identified two sequence variants (rs11117072, rs139226362) in the total sample, of which the frequency of the rs11117072-A minor allele was 0.025, and the distribution of the A allele was not significantly different between patients (MAF=0.020) and controls (MAF=0.030). The rs139226362 was an indel (delGATT) and we did not observe significantly different MAF distributions between cases and controls. Notably, two variants were found to be residing in sequences that may have roles in gene regulations due to disrupting or creating miRNA binding sites. In conclusion, our findings could not confirm the association of these variants with SCZ, but further studies in larger cohorts are needed to evaluate the functional relevance of the 3'UTR/*NTS* in schizophrenia.

Key words: Schizophrenia, 3' UTR, Neurotensin, Sanger sequencing.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince beni destekleyen, bilim yolunda dahil olduğum tüm çalışmalarda tecrübeleri ile yol gösteren ve en iyisini hedeflemeyi öğreten, bu süre zarfında bana gösterdiği ilgi, alaka ve sabırdan dolayı tez danışmanım Sayın hocam; Doç. Dr. Dilek Pirim'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşebilmesi için şizofreni hasta grubuna ulaşmamızı sağlayan, bu süreçte her zaman gösterdiği ilgi ve alakadan dolayı S.B.Ü. Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Klinisyenlerinden Sayın; Başasistan Uzm. Psk. Dr. Emine Merve Akdağ'a teşekkürlerimi sunarım.

TUBİTAK 2210-A Yüksek Lisans Burs Programı, yüksek lisans bursiyeri olarak eğitimim süresince destek veren TUBİTAK kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü ve Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, yüksek lisans tez projemin başarılı bir şekilde gerçekleşmesine katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Omik Analiz ve Araştırma Laboratuvar ekibinde yer alan, değerli ekip arkadaşlarım Ceren Gümüş, Metehan Yaman ve Fatih Atilla Bağcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, uzmanlık eğitimim de dahil olmak üzere tüm eğitim hayatım boyunca benden ilgi, alaka, sevgi, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiren ve bana umut veren sevgili ailem ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Esra BOZTEPE
27/08/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....viii
ABSTRACT....ix
TEŞEKKÜR....x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xii
1. GİRİŞ....1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI....3
2.1. Şizofreni Hastalığı....3
2.2. Şizofreni Epidemiyolojisi....4
2.2.1. Şizofreni risk faktörleri....6
2.2.1.1. Şizofreni genetik risk faktörleri....8
2.2.1.2 Şizofreni epigenetik risk faktörleri....9
2.3. *NTS* Geni....11
2.3.1. *NTS* gen varyantları....13
2.4. NTS Protein Fonksiyonu....15
2.5. *NTS* Geni ve Kompleks Hastalıklar....16
2.6. Nörodejeneratif ve Nöropsikiyatrik Hastalıklarda NTS'nin Rolü....18
2.6.1. Şizofreni ve NTS ilişkisi....20
2.6.2. Şizofreni miRNA ilişkisi....22
3. MATERYAL ve YÖNTEM....25
3.1. Örnekler....25
3.2. DNA İzolasyonu....26
3.3. Dizi Analizi....27
3.4. Veri Analizi....28
3.4.1. Biyoinformatik analizler....29
4. BULGULAR....32
4.1. Örnekler....32
4.2. DNA İzolasyon Sonuçları....32
4.3. Dizi Analizi Sonuçları....33
4.4. Veri Analizi Sonuçları....34
4.4.1. Biyoinformatik analiz sonuçları....35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ....40
KAYNAKLAR....47
EKLER....58
ÖZGEÇMİŞ....59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
rpm	Bir dakika içerisinde gerçekleşen devir sayısı
dk	Dakika
=	Eşittir
>	Büyüktür
≥	Büyük eşittir
<	Küçüktür
≤	Küçük eşittir
mL	Mililitre
µl	Mikrolitre
nt	Nükleotid
°C	Santigrat derece
sn	Saniye
bp	Baz çifti
~	Yaklaşık
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
AGO2	Argonaute 2
AH	Alzheimer Hastalığı
Akt	Protein kinase B
Aβ	Amiloid-β
BCL11B	BCL11 Transcription Factor B
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BP	Bipolar
BPRS	Kısa Psikiyatrik Derecelendirme Ölçeği
CACNA1C	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C
ClinVar	Klinik Genom Kaynağı
CNTN4	Contactin 4
CNV	Kopya Sayısı Varyasyonu
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CPLANE1	Ciliogenesis And Planar Polarity Effector Complex Subunit 1
CRC	Kolorektal Kanseri
dbSNP	Tek Nükleotid Polimorfizm Veri Ttabanı
DCC	DCC Netrin 1 Receptor
DGCR8	DGCR8 Microprocessor Complex Subunit
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DISC1	Disrupted In Schizophrenia 1 Protein
Dicer	Dicer Ribonuclease
DisGeNET	Gen-Hastalık İlişkileri Veri Ttabanı (gene-disease associations)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRD2	Dopamine receptor D2
DROSHA	Drosha ribonuclease III
DSM-5	Mental bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı, beşinci baskı

EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ENCODE	DNA Elementleri Ansiklopedisi
eQL	Ekspresyon Kantitatif Özellik Lokusları
ErbB4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
FAM120A	Family With Sequence Similarity 120 Member A
FC	Fold change
FOXP1	Forkhead Box P1
GABA	Gama aminobütirik asit
GBD	Küresel Hastalık Yükü
gnomAD	Genom Agregasyon Veri Ttabanı
GRIN2A	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A
GTEx Portal	Genotip-Doku İfadesi projesi
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HWE	Hardy-Weinberg dengesi
HCC	Karaciğer Kanseri
IN	Uyarılmış Nöronlar
İndel	İnsersiyon ve Delesyon
MAF	Minör Alel Frekansı
MDB	Majör Depresif Bozukluk
miRISC	MicroRNA induced silencing complex
MiRNA	Mikro RNA
MirSNP	MikooRNA ile İlişkili Tek Nükleotid Polimorfizmi
MTR	MiRNA target region
MYT1L	Myelin Transcription Factor 1 Like
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NMDA	N-metil-D-aspartat
NTS	Nörotensin
NTSR	Nörotensin Reseptörü
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
P13K	Phosphoinositide 3-kinase
PANSS	Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDAC	Pankreas Kanseri
PDB	Protein Data Bank
PH	Parkinson Hastalığı
Pro-NTS	Pronörotensin
PRS	Poligenik Risk Skoru
RERE	Arginine-Glutamic Acid Dipeptide Repeats
RNA	Ribonükleik asit
SCZ	Şizofreni
SLC39A8	Solute Carrier Family 39 Member 8
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SP4	Sp4 Transcription Factor
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Programı
STAG1	STAG1 Cohesin Complex Component
UTR	Kodlama Yapmayan Bölge
ZNF804A	Zinc Finger Protein 804A

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Şizofreniye yatkınlıkla ilişkili değişkenler	7
Şekil 2.2.	Şizofrenide gen-çevre etkileşimi (GXE) ve çevre-çevre etkileşimini (EXE) gösteren şema	7
Şekil 2.3.	NTS ve NTS Reseptörleri şematik gösterimi	12
Şekil 2.4.	*NTS* geninin (Chromosome 12 - NC_000012.12) bulunduğu kromozom bölgesi	12
Şekil 2.5.	*NTS* gen varyantlarının varyant türüne göre gruplandırılması	14
Şekil 2.6.	*NTS* 3'UTR gen varyantlarının varyant türüne göre gruplandırılması	14
Şekil 2.7.	NTS'nin 40 farklı yapısal konformasyonunun 3D görüntüsü	16
Şekil 2.8.	MiRNA-mRNA hibrit bölgeleri	23
Şekil 2.9.	MiRNA biyogenezi ve 22q11.2 delesyonunun SCZ'deki düzensizliği	24
Şekil 3.1.	Uygulanacak yöntemlerin iş akışı şeması	28
Şekil 4.1.	Tespit edilen rs11117072 (G>A) genotiplerinin kromotogram görüntüsü	33
Şekil 4.2.	Tespit edilen indel rs139226362 (delGATT/dupGATT) genotiplerinin kromotogram görüntüsü	34
Şekil 4.3.	rs139226362'nin farklı dokularda *RASSF9* ve *MGAT4C* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	2.1.	DisGeNET verilerine göre *NTS* geni ile ilişkili hastalıklar	20
Çizelge	3.1.	PCR işlemi için dizayn edilen spesifik primerler	27
Çizelge	3.2.	PCR amplifikasyonu için kullanılan protokol ve reaktifler	27
Çizelge	3.3.	Hedef bölgenin amplifikasyonunda kullanılan PCR protokolü	28
Çizelge	4.1.	Hasta ve kontrol grubuna ait sosyodemografik ve klinik veriler	32
Çizelge	4.2.	Çalışmada incelenen varyantlar ve analiz sonuçları (n=100)	34
Çizelge	4.3.	Çalışmada analiz edilen varyantların örnek gruplarına ait MAF değerleri	35
Çizelge	4.4.	PANSS ve BPRS skorlarının hasta grubuna ait genotiplerle korelasyonu	35
Çizelge	4.5.	GTEx ve RegulomeDB veri tabanlarından alınan rs11117072 ve rs139226362 verisi	36
Çizelge	4.6.	Tespit edilen varyantların 50 bp çevresindeki miRNA'lar	37
Çizelge	4.7.	miRNASNP-v3 verilerine göre rs11117072 (G>A) varlığında bağlanma bölgesi kazanan ve kaybeden miRNA'lar	38
Çizelge	4.8.	miRNASNP-v3 verilerine göre rs11117072 varlığında bağlanma bölgesi kazanan ve kaybeden miRNA'ların gösterimi	38
Çizelge	4.9.	RegVar sonuçlarına göre rs11117072'nin dokuya özgü gen düzenlenmesindeki etki skorları	39

1. GİRİŞ

Şizofreni (SCZ), global nüfusun yaklaşık %1'ini etkileyen, kompleks nöropsikiyatrik bir hastalıktır (Zoupa vd., 2022). SCZ, halüsinasyonlar ve sanrılar, sosyal geri çekilme, bilişsel ve yürütücü işlevlerdeki eksikliklerle karakterize edilen bir hastalıktır. Bu semptomlar genellikle erken yetişkinlik döneminde başlayıp yüksek bir nüksetme seyri gösterir. Hastaların yaşam kalitesini düşürmesinin yanında, ailelerin ve toplumun üzerinde önemli derecede sosyoekonomik yük oluşturur (Maxwell ve Rao, 2022). Bu nedenle son yıllarda kişiye özel tanı ve erken müdahale önlemleri tasarlamak için SCZ gelişimini anlamak büyük önem taşımaktadır. SCZ, etiyolojisi henüz tam olarak çözülmemiş çok faktörlü bir hastalıktır. Etiyolojisinde, genetik, çevresel, psikososyal ve diğer faktörler rol oynasa da gelişiminin kesin patofizyolojik mekanizmaları hala belirsizliğini korumaya devam etmektedir. SCZ tanısı öncelikle pozitif (halüsinasyonlar, deliryum, düzensiz konuşma, psikomotor bozukluklar), negatif (duygusal tepkisizlik, aloji, avolisyon, asosyallik ve anhedoni) ve bilişsel (hafıza ve yürütücü işlev bozuklukları) olarak sınıflandırılan semptomlara dayanmaktadır. SCZ semptomlarından özellikle bilişsel semptomlar, dopaminerjik topoloji, serotonerjik topoloji ve beyin ağlarının moleküler yapısıyla ilişkilidir. Nöropsikiyatrik bozuklukların araştırılmasındaki temel amaç hastalığın mevcut teşhis ve tedavi seçeneklerinin anlaşılmasını geliştirmek için beyinde meydana gelen patofizyolojik süreçleri aydınlatmaktır (Sánchez-Florentino vd., 2024).

Bu çalışmada, Sağlık Bilimleri Üniversitesi (S.B.Ü.) Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğinde Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı DSM-5'e (American Psychiatric Association, 2013) dayalı yapılan psikiyatrik değerlendirme neticesinde SCZ tanısı alan bireylerden ve herhangi bir psikiyatrik hastalığı bulunmayan genel popülasyondan toplanan örneklerde, dopaminle ilişkili patofizyolojik olaylarda, bağırsak yapısının ve işlevinin korunmasında, yağ metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen ve SCZ ile ilişkili olduğu çalışmalarla desteklenmiş Nörotensin (*NTS*) geninin 3′ kodlama yapmayan bölgesinde (3'UTR) yer alan sekans varyantları incelenmiştir (Boules vd., 2014). Genlerin 3′UTR'ı mRNA stabilitesinde, protein fonksiyonunun regülasyonunda ve gen ekspresyonunun

düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bunun yanı sıra 3'UTR bölgelerinde bulunan ve son zamanlarda yapılan araştırmalarla önemi daha iyi anlaşılan mikroRNA ile ilişkili tek nükleotid değişimleri (mirSNP) hedef gene küçük kodlama yapmayan RNA (miRNA) bağlanma bölgesi kazandırabilir veya kaybettirebilir. Bu etkileşimle beraber 3'UTR'de bulunan ve miRNA bağlanma bölgesini etkileyen varyasyonlar mRNA stabilitesinde, protein fonksiyonunun ve gen ekspresyonun düzenlenmesinde etkili olabilir (Gong vd., 2012; Mohamed ve Freude, 2024). Güncel çalışmalarla önemi daha iyi anlaşılan *NTS* geninin 3'UTR'sini içeren biyoinformatik analizlerinin de dahil olduğu bu vaka-kontrol çalışması SCZ patogenezine katkıda bulunabilir. Ayrıca bu çalışma, sonrasında yapılacak çalışmalar için de ön veri sunma niteliğindedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Şizofreni Hastalığı

SCZ, dünya çapında etkili ve genellikle erken yetişkinlik döneminde gelişen kompleks ve kronik psikiyatrik bir bozukluktur. Erken yetişkinlik döneminde başlaması ve biyopsikososyal bir hastalık olmasından dolayı bireylerin yaşadığı ekonomik zorluklar ve yaşam kalitesindeki düşüş, kendilerine ve topluma sosyoekonomik bir yük teşkil etmektedir. Hastalığın başlangıç yaşı genellikle ergenlik dönemidir; çocukluk ve geç yaş başlangıcı (45 yaş üstü) daha az yaygındır. SCZ'nin görülme sıklığı erkeklerde daha yüksektir ve hastalık kadınlarda erkeklere göre daha geç yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Ayari vd., 2024). Hastalığın ortalama başlangıç yaşı erkeklerde 18-25, kadınlarda ise 25-35 arasındadır (Peng vd., 2023). Erkeklerde prognozun daha kötü olduğuna dair bazı göstergeler de mevcuttur. SCZ'de gerçekliği algılama yeteneği bozulur, kişi bilişsel işlevlerini, psikososyal becerilerini ve genel refahını olumsuz yönde etkileyen bir dizi psikiyatrik semptom yaşar.

SCZ, halüsinasyon ve sanrılar gibi pozitif semptomlar, amotivasyon ve sosyal geri çekilme gibi negatif semptomlar ve bozulmuş bilişsel işlevlerle karakterize edilir. SCZ tanısı koyulmadan önce semptomların en az bir ay boyunca mevcut olması gerekir ancak semptomlar genellikle çok daha uzun süre devam etmektedir. Psikoz SCZ'nin genellikle tanıya yol açan ilk belirtisidir. Psikoz, tipik olarak ergenlik ve genç yetişkinlik döneminde başlasa da psikotik semptomların hastalık için teşhis konulmadan önce başladığı ve bunun altında yatan biyolojik değişiklikleri gösteren veriler olduğu bilinmektedir (Lubotzky vd., 2022; Zoupa vd., 2022; Howes vd., 2024). SCZ tanısı klinik olarak psikiyatrik semptomlara dayanılarak konulmaktadır; klinikte kullanılan moleküler bir biyobelirteç, patofizyolojiye dayalı tanı şeması ve tedaviler mevcut değildir. Patolojiye dayalı tanı ve tedavilerin geliştirilmesi için de patogenezin aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. SCZ patofizyolojisinin aydınlatılmasında tüm genom kopya sayısı varyasyon (CNV) analizi ve tüm genom/ekzom dizileme analizi ile tespit edilen nadir CNV'ler, nadir tek nükleotid varyantları (SNV'ler) ve GWAS (Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları) çalışmaları ile tespit edilen yaygın tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) büyük önem

taşımaktadır. Büyük ölçekli genetik çalışmalar ise hem nadir hem de yaygın genetik varyantların bu hastalıkta önemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Psikiyatrik Genom Çapında İlişki Çalışması Konsorsiyumu SCZ için yapılan GWAS'lara öncülük etmiştir. SCZ ile ilişkili bugüne kadarki en kapsamlı GWAS'ta, 69 369 SCZ hastası ve 236 642 kontrol bireyden elde edilen veriler analiz edilmiştir. Bu çalışmada, 270 bağımsız lokusta yer alan 329 SNP'nin SCZ ile ilişkili olduğu ve bu hastalığın etiyolojisinde 130 genin rol oynadığı belirlenmiştir. Bu çalışmalara dayanarak, tespit edilen SNP'lerin SCZ kalıtsallığının %24'ünü açıkladığı tahmin edilmektedir (Kato vd., 2023). Bu nedenle günümüzde erken tanı ve tedavi müdahalelerine olanak sağlayacak biyobelirteçlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

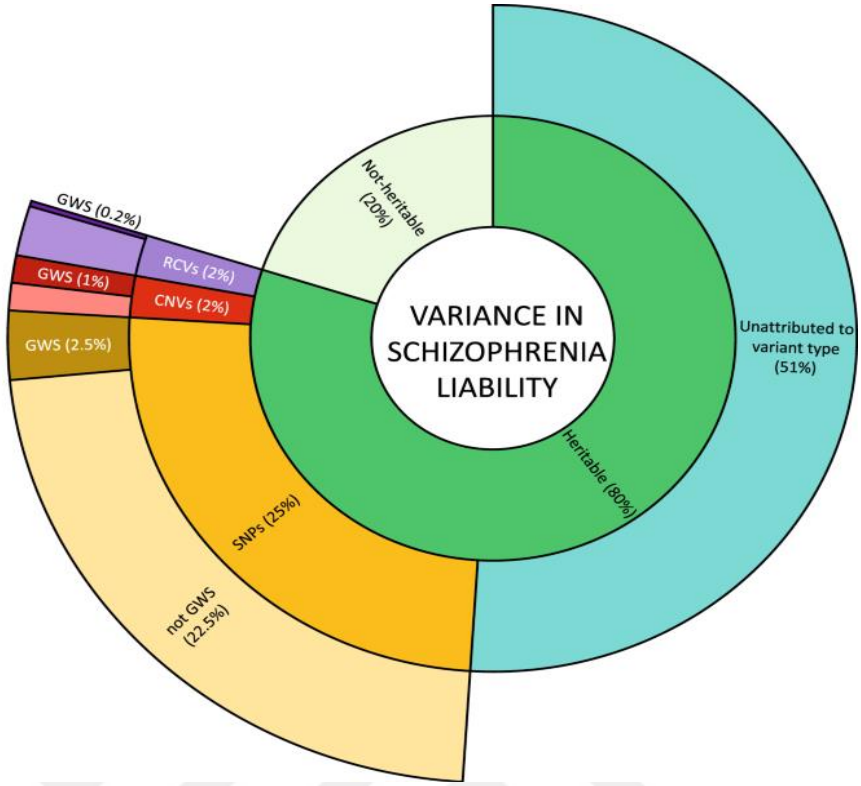
2.2. Şizofreni Epidemiyolojisi

Küresel nüfusun yaklaşık %1'ini etkileyen bu hastalık prevelansı düşük bir hastalık olmasına rağmen küresel hastalık yükünün ilk 10 nedeni arasında yer almaktadır (Velligan ve Rao, 2023). SCZ görülme sıklığının 100 000 kişide 15,2 olduğu raporlanmıştır. Son yıllarda biriken kanıtlar SCZ'nin dağılımının ve hastalık seyrinin cinsiyetler arasında önemli ölçüde farklılık gösterebileceğini belirtmiştir. Hastalığın kadınlara kıyasla erkeklerde 1,4 kat daha fazla görüldüğü raporlanmıştır. Ayrıca erkeklerde başlangıç yaşı daha erken, hastalık öncesi işlevsellik daha kötü, olumsuz belirtiler daha şiddetli, alkol ve madde bağımlılığı daha yüksektir. Buna ek olarak, erkekler körelmiş bir duygulanım sergileme ve sosyal geri çekilme gibi belirgin belirtiler gösterme eğilimindedir. SCZ'nin de içinde bulunduğu Şizofreni spektrum bozukluklarının 14, 18 ve 25 yaşından önce başladığı bireylerin oranı sırasıyla %3, %12,3 ve %47,8'dir; hastalığın ortaya çıkışında en yüksek dağılım yaşı 20,5'tir ve ortalama başlangıç ise yaşı 25'tir (Solmi vd., 2023). Hastaların büyük bir kısmı 25 ila 54 yaş aralığındadır ve bu genel olarak çoğu bireyin hayatındaki en verimli yıllara karşılık gelir. Üretkenlik kaybıyla ilişkili maliyetler, tıbbi bakımla bağlantılı olanlarla birleştiğinde yalnızca 2020'de hastalığın mali yükünün Amerika Birleşik Devletleri'ne yaklaşık 281,6 milyar dolara mal olduğu açıklanmıştır. 25 yaşında SCZ tanısı konan her kişi için ekonomiye yaşam boyu toplam maliyet yaklaşık 3,8 milyon dolar veya yıllık 92 000 dolar olarak hesaplanmıştır (Velligan ve Rao, 2023).

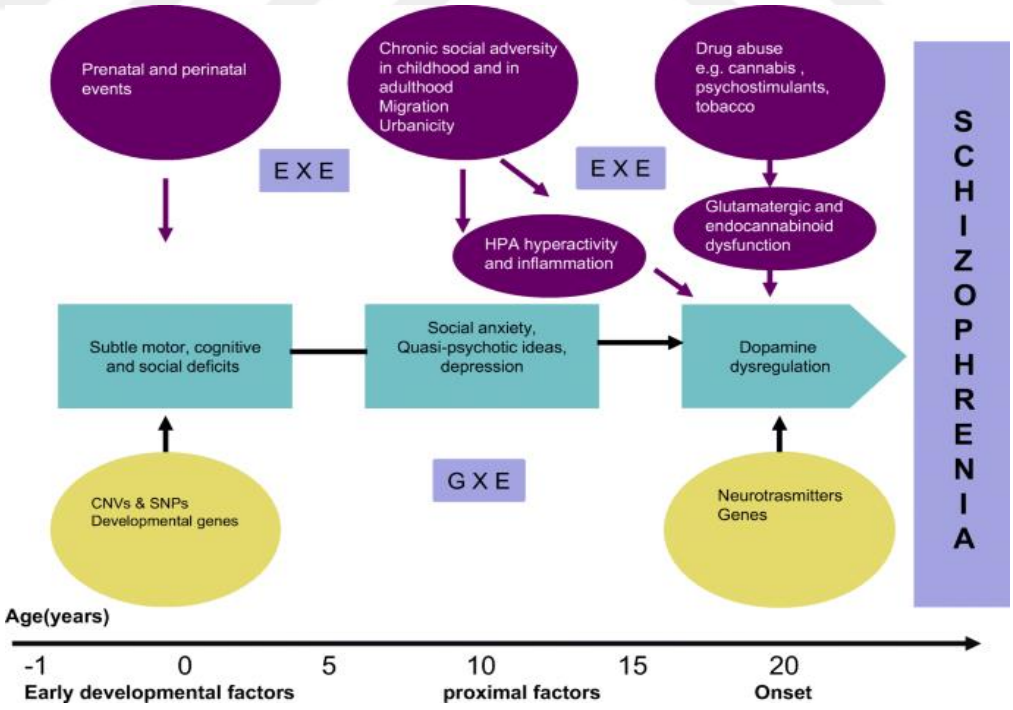
Küresel olarak, 1990'dan 2019'a kadar SCZ'nin prevalansı %65'in üzerinde (14,2'den 23,6 milyona) ve insidansı %37,11'in üzerinde (941 000'den 1,3 milyona) bir artış göstermiştir ancak yaşa göre hesaplanan prevalans ve insidans tahminleri hafif bir düşüş göstermiş olmasına rağmen küresel yükü değişmemiştir (Solmi ve vd., 2023). Küresel hastalık yük (GBD) bölgeleri genelinde en yüksek yaygınlık, görülme sıklığı ve yük, yüksek gelirli ülkelerde ortaya çıkmıştır (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020). SCZ'nin epidemiyolojisi ve küresel yükü açısından erkek/kadın oranı son 30 yılda değişmemiştir ancak genç yaş gruplarından ileri yaş gruplarına doğru azalmaktadır. Ek olarak SCZ hastalarında, fiziksel olarak eşlik eden hastalıklar, sağlıksız yaşam tarzı ve çok sayıda kardiyovasküler risk faktörleri bulunur; bunların yanı sıra fiziksel sağlık hizmetlerinde eşitsizlikler ve hastalıkla ilgili semptomlar önemli yüke ve erken ölüme neden olur. SCZ'de bireyin günlük yaşamdaki işlevsellik yeteneğini bozma derecesi önemli ölçüde değişiklik gösterir; bazıları yüksek düzeyde işlevselliğe sahipken diğerlerinin ciddi şekilde işlevselliği azalmıştır. Klinik verilere ve sosyal işlevsellik göstergelerine bakıldığında yaklaşık 7 SCZ vakasından yalnızca 1'i iyileşir. Genel nüfusla karşılaştırıldığında SCZ hastalarında erken ölüm riski 3,7 kat daha fazladır. Bunun yanında SCZ hastalarında intihar riski çok yüksektir ve hastaların yaklaşık 3 kişiden 1'inin yaşamları boyunca intihar girişiminde bulunduğu tahmin edilmektedir. SCZ hastaları arasında yaşam boyu intihar oranı yaklaşık %5'tir ve intihar erken ölümün önemli bir nedenidir (Solmi vd., 2023). SCZ hastalarında intihar girişimlerinin yaygınlığının incelendiği bir meta-analiz çalışmasında 16 747 SCZ hastasını içeren 35 çalışma dahil edilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında SCZ hastalarında intihar girişimlerinin yaşam boyu yaygınlığının %26,8 olduğu ve bunun Çin'de yapılan benzer araştırmalara karşılık gelen rakamla karşılaştırıldığında yaklaşık iki kat daha fazla olduğu raporlanmıştır (Lu vd., 2019; Dong vd., 2019). SCZ hastalarında genel nüfusa kıyasla ölüm riskini bildiren 135 çalışmayı içeren başka bir meta-analiz, tüm nedenlere bağlı ölümlerde 2,5 kat, intihara bağlı ölümlerde neredeyse 7 kata kadar riskin artığını göstermiştir (Correll vd., 2022). GBD 2019 çalışması sonuçlarına bakıldığında da SCZ'nin prevalansının, insidansının ve yükünün 1990'dan bu yana artığı görülmektedir (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020).

2.2.1. Şizofreni Risk Faktörleri

Risk faktörleri hastalıkla ilişkilidir ancak nedensel olarak bağlantılı olması şart değildir; hastalık sürecinin bir ölçüsü de olabilirler. SCZ ile ilişkili risk faktörleri, genetik, epigenetik, çevresel, nörogelişimsel, beyin plastisitesinin ve kimyasının düzenleyicileri olarak sınıflandırılabilir. SCZ'nin biyolojik risk faktörleri arasında; genetik faktörler, doğum öncesi ve doğum sırasındaki faktörler, uyuşturucu kullanımı, stres, bozulmuş nörogelişim ve nörotransmisyon yer alırken, çevresel/sosyal risk faktörleri arasında; kentte yaşama, göç, çocuklukta yaşanan sıkıntılar yer almaktadır. SCZ'de özellikle stresin etkisi üzerine farklı hipotezler sunulmuştur. Kırılganlık-stres modeline göre, bireylerin psikotik dönemler yaşaması, stresin belirli bir kırılganlık eşiğini aşması durumunda mümkün olabilir. Ayrıca inflamatuar süreçler ve oksidatif stresin neden olduğu homeostatik sinyalleme dengesizliği de SCZ gelişiminde rol oynayabilir. Şizofreni viral modeli çerçevesinde yapılan çalışmalar ise viral enfeksiyonların nörogelişimi bozarak SCZ'ye yol açabileceğini öne sürmektedir. Epidemiyolojik veriler incelendiğinde doğum öncesi komplikasyonlar, esrar kullanımı, çocukluk çağı travması, sosyal stres etkileri, annede D vitamini eksikliğine yol açan yetersiz beslenme, düşük folat ve yüksek homosistein seviyeleri gibi faktörler SCZ patofizyolojinde rol oynayan diğer risk faktörleridir (Stilo ve Murray, 2019; Zhang vd., 2022a; Fišar, 2023). SCZ kalıtsallığının %79'a yakın olduğu bilinmektedir, genetik varyantlar ve epigenetik değişiklikler ise SCZ etiyolojisi için önemli risk faktörleridir. Genetik olarak SCZ gelişim riski poligenik risk puanı, ailedeki psikiyatrik öykü ve sosyoekonomik durumla yüksek ilişkilidir. Ayrıca yapılan ikiz çalışmaları SCZ'de genetik alt yapının ve hastalık riskinin anlaşılması için büyük önem taşımaktadır. SCZ'nin genetik riskinin aydınlatılması açısından, nadir kodlama varyantlarının (RCV), nadir risk alellerinin, SCZ ile ilişkili CNV'lerin, SNP'lerin ve aday gen çalışmalarının anlaşılması önemlidir (Şekil 2.1). Ek olarak epigenetik risk faktörleri gen dizisini değiştirmeden gen regülasyonuna etki ederek SCZ riski oluşturmaktadır. (Owen ve vd., 2023). SCZ'de genetik ve çevresel faktörlerin varlığı bilinmekle beraber bunların birbirleri ile ilişkisinin incelenmesi SCZ etiyolojisinin daha iyi anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Şizofreniye yatkınlıkla ilişkili değişkenler (Owen vd., 2023)



Şekil 2.2. Şizofrenide gen-çevre etkileşimi (GXE) ve çevre-çevre etkileşimini (EXE) gösteren şema (Stilo ve Murray, 2019).

2.2.1.1. Şizofreni Genetik Risk Faktörleri

SCZ patofizyolojisinin moleküler mekanizmalarına ilişkin bilgilerimiz geçmişten günümüze artmakla beraber, hastalığın biyolojik karmaşıklığının beklenenden çok daha yüksek olmasından dolayı literatürde hala eksiklikler mevcuttur. SCZ'nin genetik bileşeninin yüksek olduğu bilinmektedir ve kalıtsallığı yaklaşık %79'dur.

SCZ'nin bir veya birden fazla ortak majör gen etkisi ile açıklanabileceği fikri genom çapında taramaların öncüsü olmuş ve aday gen çalışmalarını da artırmıştır. Psikiyatrik Genomik Konsorsiyumunun 2014 yılında gerçekleştirdiği çok aşamalı bir GWAS çalışması, SCZ verilerinin sistematik bir analizini raporlamıştır. Çalışma, genom çapında öneme sahip 108 konservatif olarak tanımlanmış lokusları kapsayan 128 bağımsız ilişkinin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır ve bu sayı artamaya devam etmektedir. Ancak tanımlanan lokuslar doğrudan belirli genlerin kalıtımını hedef göstermede eksik kalmaktadır ve kalıtsal riskin yalnızca küçük bir kısmını açıklamaktadır (Fišar, 2023). Bu çalışmaların devamında SCZ için aday genler belirlenmeye ve hastalığın gelişme riskine etkileri araştırılmaya başlanmıştır. SCZ için iyi açıklanmış risk faktörlerinden biri olan 22q11.2 kromozomal bölgesindeki mikrodelesyonların hastalığın gelişme riskini %30-40 oranında artırdığı bilinmektedir. COMT önemli bir dopamin katabolik enzimidir ve geni bu mikrodelesyon bölgesinde yer almaktadır (Ľupták vd., 2021). SCZ için diğer bir önemli gen de *DRD2* genidir, bu genin SCZ etiyolojisine dahil olmasının temel nedeni SCZ ve bipolar (BP) bozuklukların tedavisinde dopamin D2 blokajının sağlanmasıdır. *DRD2* ve *COMT* geni üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında bu genlerin SCZ patofizyolojisi için iyi çalışılmış aday genler olduğu gözlemlenmiştir (Jönsson vd., 2003; Hussain vd., 2020; Werner ve Coveñas, 2021). SCZ için yapılan diğer aday gen çalışmalarına bakıldığında nörogulin 1 (NRG1) ve nörogulin 3'ü (NRG3) kodlayan genlerin aday SCZ genleri olduğu bulunmuştur. Bunlar nöronal farklılaşmayı ve göçü etkileyen çeşitli olası proteinler üretirler. *NRG1*'in SCZ'de rolü iyi bilinmemekle beraber NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörünün hipofonksiyonuna yol açtığı bilinmektedir bu da SCZ'deki glutamat hipofonksiyon hipotezine uygundur. NRG3 ise reseptör tirozin-protein kinaz erbB-4 (ErbB4) için bir liganddır, *NRG3* geninin farklı genetik varyantları, özellikle rs10748842 aleli, yüksek SCZ riski ve bilişsel bozuklukla ilişkilendirilmiştir.

SCZ ile en yakın bağlantı gösteren genin şizofrenide bozulan protein 1'i (DISC1) kodlayan gen olduğu düşünülmektedir. Temelde 8'inci ve 9'uncu ekzonlar arasında translokasyona neden olan bir mutasyon nedeniyle SCZ ile ilişkilendirilmiştir (Ľupták vd., 2021). Tüm bunlara ek olarak 2018 ve 2022 yıllarında yapılan GWAS'lar SCZ ile ilişkili önemli lokusları, SNP ve CNV'leri içeren genleri belirlemiştir bunlar şu şekilde sıralanabilir; *GRIN2A , SP4 , STAG1, FAM120A, BCL11B , CACNA1C , RERE , FOXP1 , ZNF804A, CNTN4, DCC, MYT1L* ve *SLC39A8* (Pardiñas vd., 2018; Trubetskoy vd., 2022).

Daha önceki bölümlerde çok sayıda yaygın genetik varyantın, nadir genetik varyantların, CNV'lerin ve bunların etkileşimlerinin SCZ riskine katkıda bulunduğundan bahsetmiştik. SNP'lerin veya CNV'lerin SCZ yatkınlığına katkısı küçük olmasına rağmen ortak varyantların birikimi, yani poligenik risk skorları (PRS), SCZ ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle PRS, komorbidite çalışmalarında SCZ'nin genetik riskini ölçmek ve indekslemek için önemli bir metodoloji sunmaktadır. Araştırmalar daha yüksek SCZ PRS'si olan bireylerin daha kötü genel sağlık derecelendirmelerine sahip olma, hastanede yatarak daha fazla teşhis alma ve daha fazla ek hastalığa sahip olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. SCZ hastaları psikiyatrik ve bedensel hastalıklar da dahil olmak üzere çok sayıda ek sağlık sorunu açısından yüksek risk altındadır. SCZ hastalarında, genel popülasyonla kıyaslandığında, anksiyete, travma sonrası stres bozukluğu (TSSB), depresyon, madde bağımlılığı, obsesif kompulsif bozukluk ve yeme bozuklukları gibi hastalıklar daha sık görülür. Tüm bunlar değerlendirildiğinde SCZ'ye spesifik olmayan genetik faktörlerin diğer bozuklukların oluşumuna katkıda bulunduğu ve bunun da genel bir psikopatoloji faktörü kavramını desteklediği düşünülmektedir (Zhang vd., 2022b).

2.2.1.2. Şizofreni Epigenetik Risk Faktörleri

Epigenetik modifikasyonların SCZ ve diğer psikiyatrik bozuklukların etiyolojisi ve patofizyolojisinde rol oynadığı düşüncesi son yıllarda yapılan araştırmalarla daha fazla kabul görmektedir (Richetto ve Meyer, 2021). Epigenetik, genetik kodu değiştirmeden gen ekspresyonunu etkiler. Genetik değişikliklerin aksine epigenetik değişiklikler geri

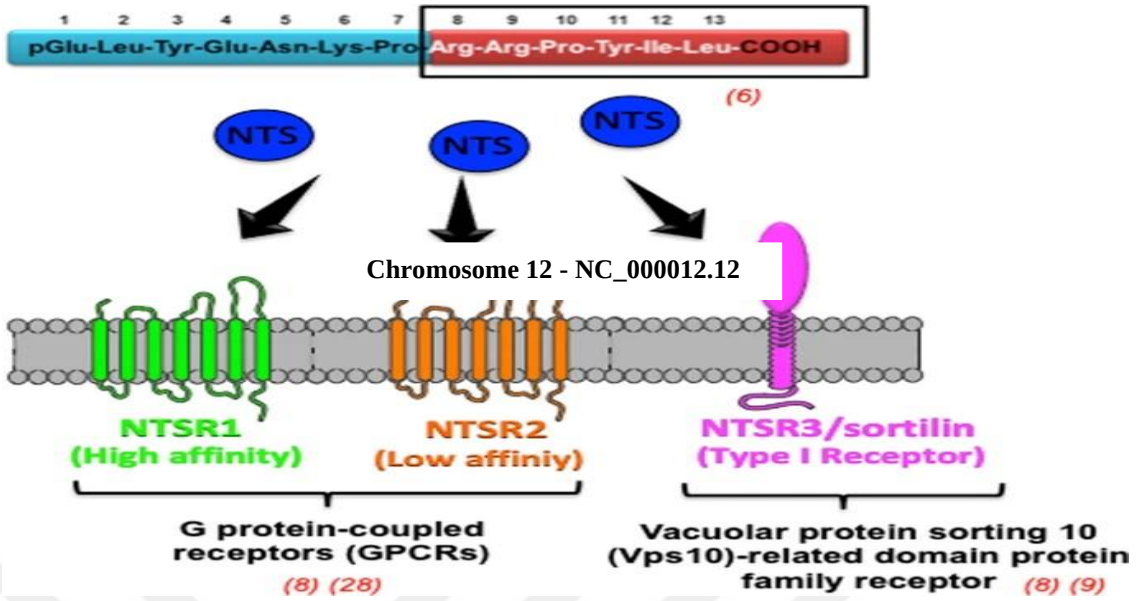
dönüşümlüdür ancak potansiyel olarak nesiller arası etkileri olabileceği düşünülmektedir. (Guan vd., 2022). İnsan çalışmaları, ilk SCZ belirtisi ortaya çıkmadan önce insanlarda etkili epigenetik mekanizmaların rolünün araştırılması, hastalık seyri ve dinamikleri nedeniyle güçtür. SCZ'nin nörogelişimsel yönlerinin klinik çalışmalarda araştırılması zor olsa da epigenetik değişikliklerin SCZ gelişimindeki rolü, genetik ve postmortem çalışmalarla değerlendirilebilir (Wawrzczak-Bargieła vd., 2023).

Epigenetik SCZ için önemli risk faktörlerinden biridir ve epigenetik süreçler SCZ'nin gelişmesine yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde beş ana epigenetik mekanizma vardır. Bunlar; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, gen ifadesinin kodlanmayan RNA (ncRNA, miRNA) aracılı düzenlenmesi, histon varyantları ve kromatinin yeniden yapılanmasıdır (Peedicayil, 2023). SCZ'de hastalığın başlangıcında ve ileri evrelerinde miyelin eksikliği ve oligodentroglia gibi anormallikler gözlenir (Li vd., 2022a). Histon asetilasyonu ve metilasyonundaki değişiklikler, oligodendrositlerin farklılaşmasında ve miyelinasyonunda yer alan genlerin transkripsiyonunu etkileyebilir ve dolayısıyla miyelin eksikliği ve oligodendroglia anormalliklerine neden olabilir. Epigenetik modifikasyonlardan en iyi karakterize edilenlerden biri DNA metilasyonudur (Fišar, 2023). DNA metilasyonunun, otoimmün bozukluklar, çeşitli kanserler ve Alzheimer hastalığı (AH) gibi nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. DNA metilasyonu, bir metil grubunun DNA metiltransferaz ailesi (DNMT'ler) tarafından S-adenosil-L-metioninden C-5'teki sitozin kalıntılarına transferini içerir. Metilasyon döngüsünün düzensiz olduğu durumlarda homosistein birikimi gerçekleşebilir. Yapılan araştırmalar plazma homosistein birikiminin SCZ etiyolojisinde rol oynadığını ayrıca sinir hasarına ve bilişsel işlev bozukluğuna sebep olduğunu göstermiştir. SCZ'de diferansiyel olarak metillenmiş genomik bölgeleri tanımlamak için metilom çapında ilişkilendirme çalışmalarından yararlanılmıştır. Farklı araştırmacılar farklı beyin bölgelerinde ve periferik kanda metilasyon modellerini incelemek adına çeşitli stratejiler kullanmıştır. Araştırmacılar hastalık açısından uyumsuz monozigotik ikizlerin araştırılmasının avantajları olduğunu düşünmüş ve bu konuya odaklanmıştır. Dempster vd. (2011) ve Castellani vd. (2015) benzer iki çalışma gerçekleştirerek SCZ açısından uyumsuz monozigot ikizlerle çalışmıştır. Çalışma sonucunda ise iki çalışmada da farklı gen bölgelerinde ikiz çiftlerinde belli bölgelerin hipometile olduğu

gözlemlenmiştir ve farklı şekilde metillenmiş bölgelerde tanımlanan genleri ortaya çıkarmıştır. Çalışmalar sonucunda etkilenen genlerin hücre sağ kalımı, hücresel göç gibi SCZ etiyolojinde de yer alan etkili yolaklarda raporlanan genler olduğu doğrulanmıştır. Fisher vd. (2015) ise psikoz açısından uyumsuz 24 monozigot ikiz çifti üzerinde bir çalışma gerçekleştirerek metilomik karşılaştırmalar yapmıştır. Çalışmada *C5ORF42* geninin promotöründe yer alan psikozla ilişkili metillenmiş bölge sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında SCZ hastalarında hipometile olduğu raporlanmıştır. Son yıllarda en çok çalışılan ve SCZ'de epigenetik modifikasyonlardan biri olan miRNA'lar, nörogenez, sinaptik plastisite ve sinyal düzenlemesi gibi rollerle SCZ etiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak serumda tanımlanan miR-181b, miR-1308, miR-365 ,miR-219-2-3p, miR-195, miR-520c-3p ve let-7g' nin SCZ tanısı için aday biyobelirteçler olabileceği raporlanmıştır (Srivastava vd., 2021). Genom çapında epigenetik çalışmalar SCZ araştırmalarında yaygın olarak kullanılmıştır ve ENCODE, Roadmap ve FANTOM gibi halka açık birden fazla doku ve hücreye karşılık gelen epigenom haritaları oluşturulmuştur. Bu depolar geleceğe yönelik çalışmalarda araştırmacılara epigenetik modellemeler yapmaları için büyük kolaylıklar sağlama potansiyelindedir (Guan vd., 2022).

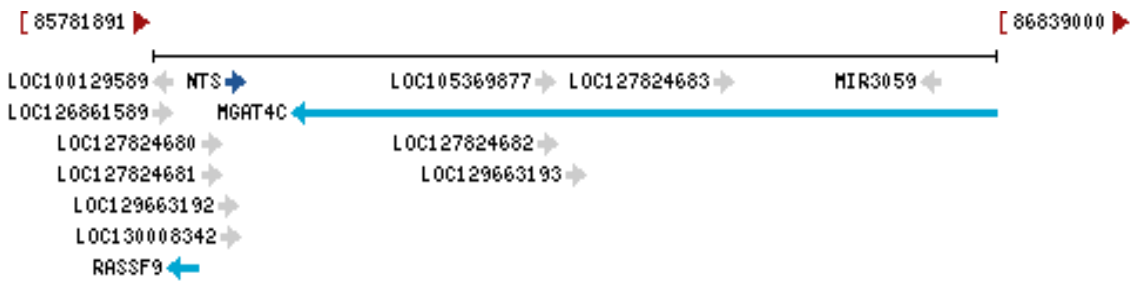
2.3. *NTS* Geni

NTS geni insanda 12q21.31 kromozom bölgesinde bulur 4 ekzondan oluşur ve 13 amino asitli bir nöropeptid olan NTS'yi kodlar (Şekil 4). *NTS* geninin uzunluğu 8 698 baz çifti (bp) olup 3'UTR uzunluğu 617 bp'dir (Sentinelli vd., 2023). Bu gen, nöromedin N ve NTS olmak üzere iki peptidin ortak bir öncüsünü kodlar (RefSeq tarafından sağlanmıştır, Ekim 2014). NTS ile birlikte nörotensinerjik sistemi oluşturduğu ve biyolojik süreçlerde beraber rol oynadığı bilinen üç nörotensin reseptörü (NTSR) vardır (Şekil 3). NTSR1, NTS'nin ana aracısıdır ve hem merkezi sinir sisteminde hem de çevresel sinir sisteminde etki gösterirken, NTSR2 esas olarak beyinde ifade edilir. NTSR3 ise daha geniş bir ifade modeline sahiptir (Kyriatzis vd., 2024).



Şekil 2.3. NTS ve NTS Reseptörleri şematik gösterimi (Christou vd., 2020)

NTS'nin mRNA ve protein değişikliklerinin yapılan çalışmalar sonucunda birçok fenotip ve biyolojik süreçle ilişkili olduğu raporlanmıştır. Literatüre baktığımızda *NTS*'nin, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, endokrin sistem ve üreme sistemi gibi vücudun çoğu bölgesinde eksprese olduğu bilinmektedir. NTS dopaminle ilişkili patofizyolojik olaylarda, bağırsak yapısının ve fonksiyonunun korunmasında ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayabilirken aynı zamanda yapılan birçok çalışma, bu nöropeptidin vücut sıcaklığının düzenlenmesi, beslenme, analjezi, etanol duyarlılığı, psikoz, madde kullanımı ve ağrıda birtakım rollerini de ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, NTS'nin birçok sinirsel ve psikiyatrik bozukluğun patofizyolojisine de eşlik ettiğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur (Torruella-Suárez ve McElligott, 2020; Shrestha vd., 2023; Kyriatzis vd., 2024)

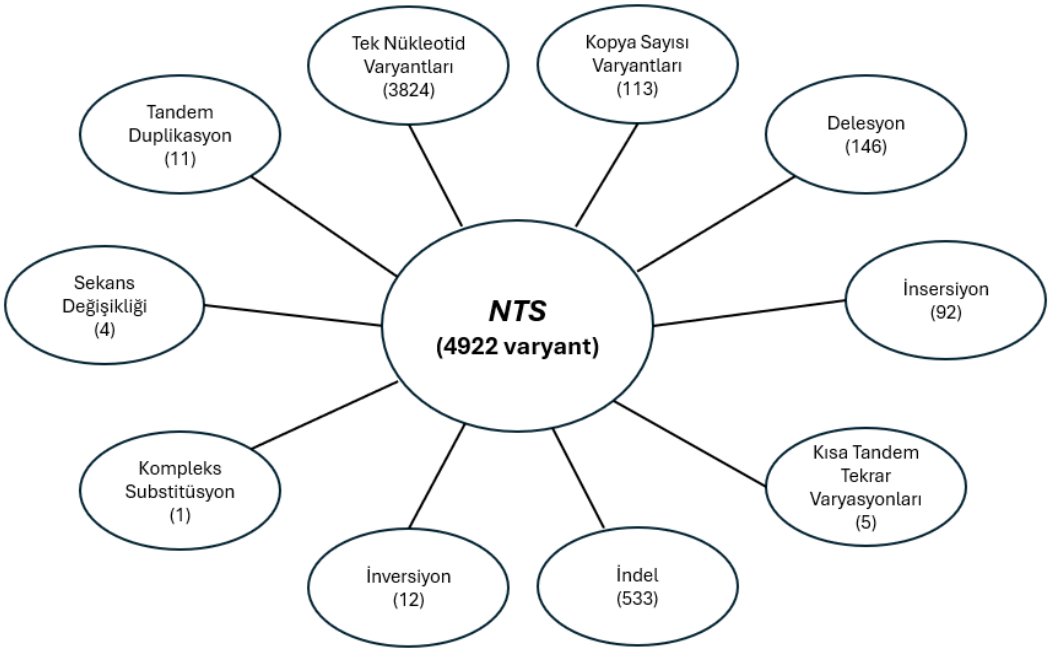


Şekil 2.4. *NTS* geninin (Chromosome 12 - NC_000012.12) bulunduğu kromozom bölgesi (Https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4922)

Literatüre baktığımızda 2023 yılında Sentinelli vd. (2023) obez-ergenler ve *NTS* geni 3'UTR bölgesindeki varyantlar ile ilgili bir ilişkilendirme çalışma gerçekleştirmiştir. Ancak, *NTS* geninin 3'UTR sekans varyasyonlarının hastalıklarla ilişkilerinin kapsamlı araştırılması açısından literatürde önemli bir boşluk vardır. Bu amaçla tasarlanan projemizde nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir nörotransmitter olan *NTS* geninin 3'UTR'sinde yer alan sekans varyantlarının SCZ hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. Genlerin 3′UTR bölgesi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, mRNA stabilitesi, translasyon ve lokalizasyonun ayarlanması ile protein fonksiyonunun regülasyonu gibi süreçlerde önemli rol oynayan diziler içerir. (Matoulkova vd., 2012; Mayr vd., 2019; Romo vd., 2023). Genlerin 3'UTR bölgesinde bulunan varyantlar, poliadenilasyon sinyalleri, miRNA-mRNA etkileşimleri, mRNA'nın translasyon süreci ve stabilitesi üzerinde önemli etkiler göstermektedir. Bu bölge çeşitli post-transkripsiyonel modifikasyonların hedefi olup, burada meydana gelen varyasyonlar gen ekspresyonunun baskılanmasına veya aktivasyonuna neden olabilir. Özellikle miRNA'lar aracılığıyla gerçekleştirilen post-transkripsiyonel modifikasyonlar genlerin 3' UTR bölgelerine bağlanarak gen ifadesini etkili bir şekilde baskılayabilir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar mirSNP'lerin miRNA bağlanma bölgelerinin oluşumunu veya kaybını tetikleyerek gen ekspresyon düzenlemelerinde önemli rolleri olabileceğini göstermektedir (Gong vd., 2012; Wei vd., 2012; Mohamed ve Freude, 2024).

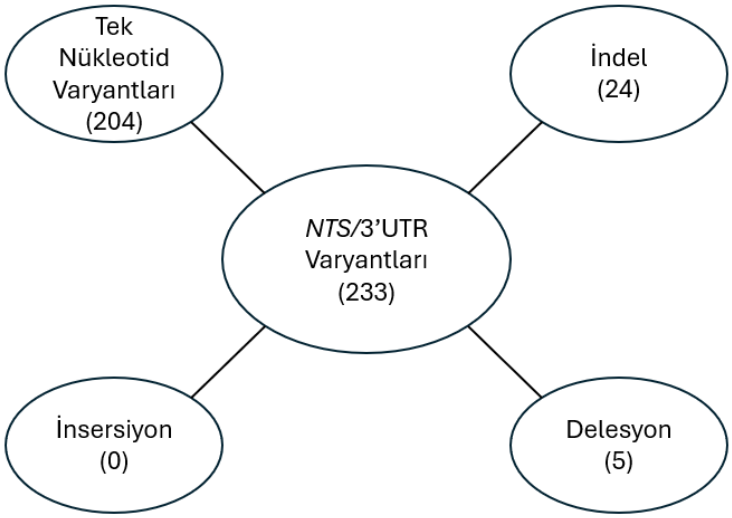
2.3.1. *NTS* Gen Varyantları

Varyant analizi için yapılan *in-silico* araştırmalar sonucunda, Tek Nükleotid Polimorfizmleri Veri Tabanı'nda (Database of Short Genetic Variations, dbSNP) *NTS* geni 4 922 varyant ile temsil edilmiştir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/). Bu varyasyonlardan 18 tanesi ClinVar veri tabanında tanımlanmış olup, 9'u patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Varyant dağılımları 1000 Genom Projesi kapsamında elde edilen Minör Alel Frekanslarına (MAF) göre incelendiğinde ise 4 346 sınıflandırılmamış varyant, 330 nadir varyant, 24 yaygın olmayan varyant ve 25 yaygın varyant raporlanmıştır (Son Erişim Tarihi: 22.05.2024). *NTS* geni sekans varyantlarının detaylı gruplandırılması Şekil 2.5'te belirtilmiştir.



Şekil 2.5. *NTS* gen varyantlarının varyant türüne göre gruplandırılması

NTS geninin 3'UTR varyantlarına bakıldığında ise 233 varyant raporlanmıştır. Bunlardan 209 tanesi sınıflandırılmamış varyant, 20 tanesi nadir varyant, 3 tanesi yaygın olmayan ve 1 tanesi yaygın varyant olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.6). Literatürde 157 varyant hakkında yayın bulunmaktadır. Buna ek olarak DisGeNET (Disease and Gene Network, Hastalık ve Gen Ağı) (https://www.disgenet.org/search) veri tabanında yalnızca bir varyant (rs1800832) bir fenotiple (kabızlık) ilişkilendirilmiştir.



Şekil 2.6. *NTS* 3'UTR gen varyantlarının varyant türüne göre gruplandırılması

2.4. NTS Protein Fonksiyonu

NTS, 13 amino asitli bir nöropeptittir (Şekil 2.7). Merkezi ve periferik sinir sistemlerinde ve gastrointestinal sistemlerde ifade edilir. Nöropeptitler nöronların sitoplazmasında sentezlenir, kesecikler içinde depolanır ardından nöronal elektriksel uyarı üzerine boşaltılır. Beyin boyunca geniş bir dağılım sergilerler ve sıklıkla dopamin, glutamat veya γ-aminobütirik asit gibi monoamin nörotransmiterlerin yanında lokalize olup birlikte salınır ve periferik olarak tespit edilebilirler (Sun vd., 2024). NTS salgılandıktan sonra çeşitli beyin bölgelerinde ve iç organlarda farklı şekillerde lokalize olan NTSR1, NTSR2 ve NTSR3 reseptörlerine bağlanarak bağırsak lipid emilimini düzenler. NTS'nin etkileri çoğunlukla reseptör tipine, doku ve organlardaki dağılımına bağlıdır (Fu vd., 2024). Uzun yıllar boyunca yapılan çalışmalarda bu nöropeptidin vücut sıcaklığının düzenlenmesi, beslenme, analjezi, psikoz, madde kullanımı, SCZ, BP, depresyon üzerindeki rolleri ortaya çıkmıştır (Torruella-Suárez ve McElligott, 2020; Fu vd., 2024) Yapılan araştırmalarda NTS'ye göre eşmolar miktarda salınan stabil bir NTS öncüsü olan pronörotensinin (pro-NT) dolaşımdaki konsantrasyonunun yüksek yağlı gıda tüketimine yanıt olarak artığı raporlanmıştır. Araştırmalar sonucunda artan pro-NTS seviyeleri, obezite, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar ve tip II diyabet gibi hastalıklar için bir risk faktörü olarak raporlanmıştır (Januzzi vd., 2016; Sentinelli vd., 2023; Gereau vd., 2023; Li vd., 2024).

SCZ'nin nörotransmitter sistemlerle ilişkili olduğu ve nörotransmitter sistemlerin de nöropeptitler ile modüle edildiği raporlanmıştır. SCZ'de bu konuda en çok dikkat çeken nöropeptitlerden biri NTS'dir. NTS yapılan çalışmalarda psikolojik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir ve düşük NTS seviyelerinin çalışma belleği fonksiyonunu olumsuz yönde etkilediği vurgulanmıştır. Yu vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada SCZ, BP ve majör depresif bozukluğa (MDB) sahip hastaların plazmasında nöropeptid seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmada yapılan ROC analizinin sonuçlarında hastalar kontroller ile karşılaştırıldığında en yüksek AUC değeri plazma NTS'si için görülmüştür. Çalışmada SCZ, BP ve MDB'de plazma NTS seviyelerinin anlamlı ölçüde azaldığı raporlanmıştır. Başka bir çalışmada Podvin vd. (2024) SCZ ve kontrollerde nöropeptitler olarak bilinen peptit nörotransmitterlerini araştırmak amacıyla elde ettikleri uyarılmış nöronları (IN)

kütle spektrometresiyle tanımlayıp niceliğini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına bakıldığı zaman SCZ hastalarının IN'lerinde SCZ patofizyolojisinde yer aldığı bilinen peptitlerden olan NTS ve somatostatin tipi nöropeptitlerin bulunmadığını raporlamışlardır. Çalışmada NTS nöropeptidi yalnızca kontrol grubunda ölçülebilmiştir, bu durum literatürde SCZ hastalarında düşük NTS seviyelerinin bulunduğunu destekleyen çalışmalarla paralellik göstermektedir.



Şekil 2.7. NTS'nin 40 farklı yapısal konformasyonunun 3D görüntüsü (https://www.rcsb.org/structure/2LNE Protein Data Bank veri tabanından alınmıştır)

2.5. *NTS* Geni ve Kompleks Hastalıklar

NTS, gen-protein etkileşimleri, reseptör bağlantıları, nöromodülatör işlevi, dopaminerjik ve glutaminerjik yolaklardaki rolleri ile birden fazla kompleks fenotiple ilişkilendirilmiştir. Bu bölümde güncel literatürden yararlanarak NTS ve kompleks hastalıkların ilişkisi açıklanacaktır. NTS'nin kalp hastalıkları, birçok kanser çeşidi, böbrek hastalıkları ve obezite gibi kompleks hastalıklarla ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ve bunun üzerine çalışmalar yapılmıştır. Januzzi vd. (2016) yaptıkları çalışmada NTS'nin bir öncüsü olan pro-NT seviyelerindeki değişikliklerin kardiyovasküler hastalıkları öngörebileceğini raporlamışlardır. Christou vd. (2020) NTS yolakları ve reseptörleri ile ilişkili sindirim kanserlerini içeren bir derleme makalesi yayınlamışlardır. Derlemede bahsedilen bir çalışmada, mide kanserinde, NTS plazma konsantrasyonunun metaloproteinez-9 aktivitesi ile pozitif olarak ilişkili ve kontrollere

kıyasla hastalarda daha yüksek seviyelerde bulunduğunu, buna ek olarak NTSR1'in mide kanseri tedavisinde potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini raporlamışlardır (Akter vd., 2015; Akter vd., 2018). Pankreas kanserinde (PDAC), *NTS* ve *NTSR1*'in sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında hastalarda daha yüksek eksprese edildiği ve yüksek ekspresyonun artan patolojik derecelerle ilişkili olduğu raporlanmıştır. Buna ek olarak NTS'nin insan PDAC hücrelerinin in vitro göç özelliklerini de modüle ettiği tespit edilmiştir. Karaciğer kanserinin (HCC) %50'sinden fazlasında *NTS* ve *NTSR1* yüksek seviyelerde birlikte ifade edilirler ve bu ortak ifadenin HCC'de agresif biyolojik etkiyle ve kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu raporlanmıştır. Kolorektal kanser (CRC) çalışmalarında elde edilen veriler sonucunda *NTSR1*'in aşırı ekspresyonunun kolon karsinogenezinin erken aşamalarını temsil edebileceğini CRC gelişimini ve ilerlemesini etkileyebileceği ve potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşünülmüştür (Christou vd., 2020). Ayrıca Akut Myeloid Lösemi hastalarında *NTS/NTSR3* biyobelirteçleri ile kötü klinik prognoz arasında öngörülen bir korelasyon olduğu raporlanmıştır (Dao vd., 2020). Tüm bunlarla beraber NTS gastrointestinal olmayan akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, plevral mezotelyoma, baş ve boyun tümörleri, glioma, karaciğer kanseri gibi kanser türleriyle de ilişkilendirilmiştir (Nikolaou vd., 2020). NTS ve onun stabil öncüsü pro-NT böbrek hastalığının önemli risk faktörlerinden olan kardiyovasküler hastalık ve tip 2 diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Buna bağlı olarak böbrek hastalarında NTS ilişkisini incelemek isteyen Bullen vd. (2024), yüksek pro-NT seviyelerinin glomerüler filtrasyon hızındaki düşüşle ilişkili olduğunu ancak böbrek hastalığı gelişimine katkısı ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu raporlamışlardır. Fizyolojik şartlarda NTS, vücudun enerji dengesinin merkezi düzenleyicisi olarak rol alır ve beyinde dopaminerjik nörotransmisyona katkısı ile gıda alımını azaltır böylece aktif davranışı ve lokomotor aktiviteyi uyarır. Normal şartlarda lipit alımından sonra yükselen NTS seviyesi, enerji harcanmasını kontrol eden NTS aracılı devrelerin ve buna bağlı olarak vücut ağırlığı ve metabolizmanın düzenlenmesinde NTS'nin anahtar rolünü göstermektedir. Bu ilişki göz önüne alındığında araştırmacılar obezite ve NTS ilişkisine odaklanmıştır. Obez çocuklarda yapılan bir araştırmada yüksek pro-NT seviyelerinin yaşamın ilerleyen döneminde kilo alımıyla önemli oranda ilişkili olduğunu ve obezite varlığında metabolik bozulmaya yatkınlığın bir göstergesi olabileceği raporlanmıştır (Barchetta vd., 2022). Başka bir çalışmada obez çocuklarda NTS protein seviyeleri ölçülmüş, *NTS* geni

sekanslanmış ve pro-NT seviyeleri ile ilişkili olduğu düşünülen SNP'ler genotiplenmiştir. Çalışmanın sonucunda ise *NTS* sekans varyantı rs2234762'nin obez bireylerde bulunan farklı pro-NT düzeylerini kısmen açıklayabileceğini ancak gelecekte yapılacak in vitro çalışmaların bu varyantın risklerinin belirlenmesi için önemli olduğu raporlanmıştır (Sentinelli vd., 2023).

2.6. Nörodejeneratif ve Nöropsikiyatrik Hastalıklarda NTS'nin Rolü

Son yıllarda yapılan araştırmalar, psikiyatrik ve nörolojik bozuklukların gelişiminde nöropeptitlerin rolüne odaklanmıştır. Nöropeptitlerin üretiminde, fonksiyonunda ve salgılanmasında meydana gelen değişiklikler, sebep oldukları sinyal mekanizmalarındaki değişikliklerden dolayı nörolojik bozukluklarda etkilidir (Teplyashina vd., 2020).

Bu bölümde güncel literatürden yararlanarak nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıklarda NTS'nin rolüne değinilecektir. AH, bilişsel eksiklikler, hafıza bozuklukları, oryantasyon bozukluğu ve davranış bozuklukları ile karakterize edilen yaşa bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır. AH'de bilişsel eksikliğin ana nedeninin artan amiloid-β (Aβ) seviyeleri olduğu bilinmektedir (Flores-Muñoz vd., 2020). Gaheta vd. (2010) *NTS* ve *NTSR*'lerin AH'li hastaların beyin bölgelerinde ekspresyon profillerini incelemiştir. Sonuçlar *NTS, NTSR1* ve *NTSR2* nin AH'lerde kontrollere kıyasla daha düşük eksprese olduğunu göstermiştir. Entorhinal korteks ise AH'nin erken patolojik değişiminde rol oynayan önemli bir beyin bölgesidir. NTS'nin de entorhinal korteks nöronlarının uyarılabilirliğini artırdığı dolayısıyla öğrenme ve hafıza gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. AH'de beynin birçok bölgesinde NTS ve NTSR seviyelerinin azaldığı raporlanmıştır. NTS'nin amiloid plakların oluşumunu etkileyerek farklı yollardan AH patogenezi ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (Chen vd., 2019). Bir diğer hastalık olan Parkinson hastalığı (PH), bradikinezi, kas sertliği ve statik titreme gibi kardinal motor semptomlarla karakterize ve yaşla ilişkili nörodejeneratif bir hastalıktır. Klinik araştırmalar, PH'lilerden alınan beyin dokusu örneklerinin substantia nigra bölgesindeki NTS konsantrasyonlarında iki kat artış olduğunu raporlamıştır. Yapılan bir çalışmada plazma NTS konsantrasyonunun ilaçsız PH'li hastalarda, ilaçlı PH'lilere ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyede olduğu raporlanmıştır (Zheng vd., 2021). Sonuçlar

NTS'nin PH patogenezi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Literatürde NTS'nin SCZ, uyuşturucu bağımlılığı, alkol bağımlılığı, otizm, BP, depresyon, anksiyete gibi önemli birçok nöropsikiyatrik hastalığın patofizyolojisinde ve tedavisinde rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur. NTS'nin dopamin nöronları ile lokalize olduğu ve dopamin iletimini modüle ettiği için bağımlılıkta düzenleyici bir rolü olduğu düşünülmektedir (Rodríguez vd., 2023). NTS ve Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) ilişkisine bakıldığında, OSB hem sosyal-davranışsal eksikler hem de tekrarlayan davranışlarla karakterize edilen nörogelişimsel bir bozukluktur. Beyin mast hücrelerinin OSB patogenezinde rol oynayabileceği raporlanmıştır. Bunun üzerine genç OSB hastaları ile yapılan bir çalışmada, hasta serumlarında yüksek NTS seviyeleri ölçülmüştür ve beyinde bulunan NTS'nin mast hücre aktivasyonunu tetikleyebileceği düşünülmüştür (Hendriksen vd., 2017; Saad vd., 2022). Başka bir çalışmada obezite tanısı almış, depresyon ve anksiyete semptomları olan 97 kadın 63 erkek hastanın plazma NTS seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda NTS seviyeleri ve yapılan psikometrik değerlendirme sonucunda elde edilen skorlar arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur fakat bu korelasyon yalnızca kadın obez hastalarda tespit edilmiştir erkek obez hastalar için herhangi bir korelasyon kurulmamıştır. Bu durum obez hastalarda NTS seviyeleri ve psikolojik parametrelerle cinsiyete bağlı bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu konu üzerinde literatürde boşluk bulunmaktadır ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Wölk vd., 2021). Yapılan biyoinformatik analizde DisGeNET veri tabanına göre *NTS* geni 184 fenotiple ilişkilendirilmiştir ancak bu hastalıklardan DisGeNET skorlamasında diğerlerine göre daha yüksek oranda ilişkili olduğu düşünülen 24 fenotip (0,370-0,100 arası skorlara sahip fenotipler dahil edilmiştir) veri tabanından çekilmiştir. *NTS* geni ve ilişkili olduğu hastalıklar DisGeNET veri tabanından çekilerek Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. DisGeNET verilerine göre *NTS* geni ile ilişkili hastalıklar

Gen	İlişki olduğu hastalık	Hastalık ID
NTS	Schizophrenia	C0036341
NTS	Depressive disorder	C0011581
NTS	Alcoholic Intoxication, Chronic	C0001973
NTS	Mental Depression	C0011570
NTS	Gegenhalten	C0231519
NTS	Hyperkinesia, Generalized	C0751217
NTS	Extensor Rigidity	C0239325
NTS	Hyperkinesia	C3887506
NTS	Catalepsy	C0007370
NTS	Muscle Rigidity	C0026837
NTS	Cogwheel Rigidity	C0151564
NTS	Nuchal Rigidity	C1320474
NTS	Bradycardia	C0428977
NTS	Extrapyramidal Rigidity	C0277821
NTS	Catatonic Rigidity	C0233608
NTS	Mood Disorders	C0525045
NTS	Waxy flexibility	C0233612
NTS	Hypovolemia	C0546884
NTS	Sciatic Neuropathy	C0149940
NTS	Neoplasms	C0027651
NTS	Primary malignant neoplasm	C1306459
NTS	Prostate carcinoma	C0600139
NTS	Malignant Neoplasms	C0006826
NTS	Malignant neoplasm of prostate	C0376358

2.6.1. Şizofreni ve NTS İlişkisi

SCZ hastaları ile yapılan vaka kontrol çalışmalarında glutamaterjik, dopaminerjik ve serotoninerjik nörotransmisyonu etkileyen genlerin aynı zamanda SCZ etiyolojisine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Ancak literatüre baktığımızda bu karmaşık etkileşime ilişkin moleküler çalışmalar hala eksiktir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda NTS'nin beyinde dopamin ve glutamat gibi diğer nörotransmitterlerin salınımını düzenlediği gözlemlenmiş ve bu açıdan SCZ patofizyolojisindeki rolü de önemli bir araştırma konusu olmuştur (Boules vd., 2014; Grinevich vd., 2022). Dopaminin hiperaktivitesinin SCZ'nin pozitif semptomlarında rol oynadığı, ayrıca prefrontal korteks sinapslarındaki dopaminin hipofonksiyonelliğinin SCZ'nin bilişsel semptomlarına katkıda bulunduğu raporlanmıştır. NTS'nin dopaminerjik nörotransmisyonda nöromodülatör olarak rol alabileceği bilinmektedir. Ayrıca, NTS'nin amigdaladaki GABAerjik nöronlar üzerinde presinaptik olarak etki ettiği

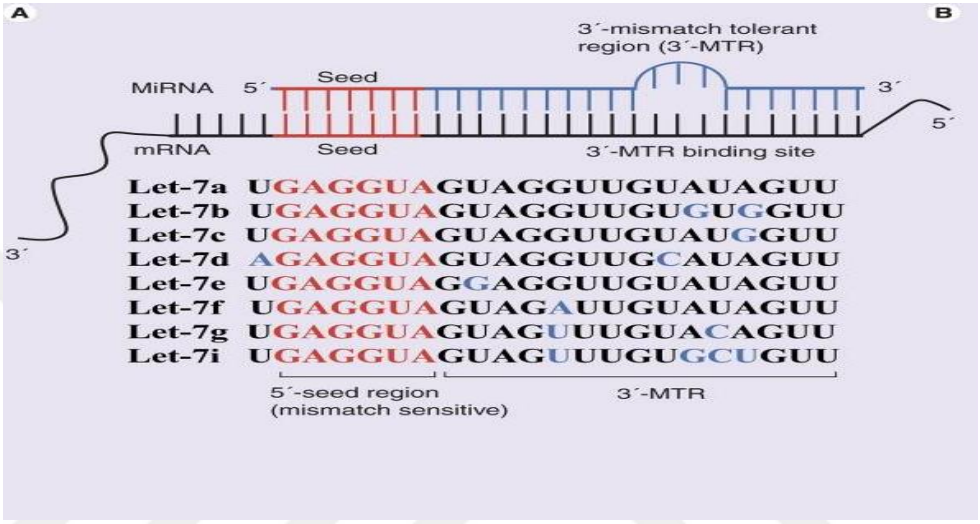
de bilinmektedir. (Gereau vd., 2023). GABA'nın SCZ patofizyolojisindeki etkileri de iyi araştırılmıştır. Sonuçlar, antipsikotik kullanmayan hastaların hipokampüsünde ilaç kullanan hastalara kıyasla önemli ölçüde daha düşük GABA reseptörü alt tipi seviyelerini göstermiştir. Ayrıca, in vivo çalışmalar, ilk atak psikotik hastaların beyin omurilik sıvısında GABA seviyelerinin azaldığını göstermiştir. Dolayısıyla GABA hipofonksiyonunun SCZ patolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Barak vd., 2024). Tüm bunlara bakıldığında NTS ve SCZ'nin GABAerjik ve dopaminerjik gibi benzer yolaklarda etkili olması SCZ/NTS ilişkisini araştırmak için ön veri sunmaktadır. SCZ ve NTS ile ilişkili yapılan çalışmalara bakıldığında ise Hidese vd. (2022) yaptıkları bir vaka kontrol çalışmasında, SCZ, BP ve MDB tanısı almış hastaların BOS ve plazma örneklerinden NTS dahil beş nöropeptidin seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde BOS nöropeptid düzeyleri güvenilir bir şekilde ölçülemeyecek kadar düşük çıkarken, plazma nöropeptid seviyeleri ölçülmüş fakat sağlıklı ve kontroller arasında anlamlı bir fark olmadığı raporlanmıştır. Dahil edilen örneklerde SCZ'de %87,9, BP'de %83,3 ve MDB'de %65,1 oranlarında hastaların psikotrop ilaç kullandığı bilinmektedir. Yu vd. (2023) yaptığı çalışmada ise ilk atak SCZ, BP ve MDB tanısı almış hastalarda NTS'nin de dahil edildiği nöropeptitlerin plazma seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar bakıldığında plazmada NTS ve dört peptidin seviyeleri üç grupta da sağlıklı örneklerle karşılaştırıldığında hastalarda anlamlı düzeyde azaldığı raporlanmıştır. Hastaların psikotrop ilaç bilgileri çalışmada belirtilmemiş ancak SCZ hastalarının genç ve ilk atak SCZ hastası olması ilgi çekicidir. Sun vd. (2024) ise yalnızca erkek hastalardan oluşan bir vaka kontrol çalışmasında serum nöropeptid seviyelerini ve bunların hastaların bilişsel işlevleri ile ilişkisini değerlendirmiştir. Bu çalışmaya, tedavi dirençli SCZ, kronik stabil SCZ ve sağlıklı kontrollerden oluşan üç grup dahil edilmiştir. Uzun süreli ilaç tedavisi gören SCZ hastalarında yapılan bu çalışmada NTS dahil beş serum nöropeptid seviyeleri sağlıklılarla karşılaştırıldığında tedavi dirençli SCZ hastalarında ve kronik SCZ'li hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tedavi dirençli SCZ hastalarının ise kronik SCZ hastalarına göre daha düşük nöropeptid düzeylerine sahip olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, çalışma NTS'nin bilişsel işlev üzerinde pozitif bir etkisi olabileceğini ifade etmiş ve NTS'nin dopamin reseptörleri ile aynı yerde bulunan reseptörleri aracılığıyla dopamin salınımını artırabileceğini ve bu yolla bilişsel işlevi iyileştirebileceğini öne sürmüştür. Podvin vd. (2024) tarafından yürütülen çalışmada,

sinaptik nörotransmitter sinyallemesinde etkili olabileceğini düşündükleri nöropeptitlerin dağılımını temel alarak SCZ hastalarının nöronlarında sağlıklı kontrollere kıyasla belirgin nöropeptid değişiklikleri olabileceği hipotezi ile hasta kaynaklı uyarılmış nöronlar kullanılmıştır. Çalışma sonuçları SCZ'li uyarılmış nöronlarda NTS dahil bazı nöropeptitlerin tespit edilemediğini raporlamıştır. Bu sonuç daha önce SCZ hastalarında düşük NTS tespit edilen çalışmaları destekler niteliktedir bu da NTS'nin SCZ'deki bilişsel eksikliklerin anlaşılmasında ve tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ancak tüm bunlara bakıldığı zaman literatürde NTS'nin SCZ patofizyolojisi üzerindeki net rolleri anlaşılmamıştır ve literatürde boşluk bulunmaktadır. İleriki çalışmalar, NTS'nin SCZ patofizyolojindeki rollerini açıklamada daha umut verici sonuçlar sağlayabilir.

2.6.2. Şizofreni miRNA İlişkisi

Güncel çalışmalarda, SCZ'de minimal invaziv olan periferik biyobelirteçlerin hem hastalığın teşhisinde hem de ilerlemesinde kullanım potansiyelleri olduğu belirtilmektedir (Kozyrev vd., 2023). Son yıllarda yapılan çalışmalarda periferik dokulardaki miRNA ekspresyon değişikliklerinin, nöropsikiyatrik bozukluğu olan hastaların nöronal dokularındaki değişikliklerle korele olduğu bulunmuştur (Xie vd., 2024). MiRNA'lar gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde etkin, küçük kodlama yapmayan 20-24 nükleotid (nt) uzunluğunda RNA dizileridir. Memelilerde miRNA'ların biyogenezi son derece korunmuş bir süreçtir. MiRNA biyogenezi tip II ve III polimerazların etkisiyle başlar. Polimerazların etkisiyle oluşan pri-miRNA, DGCR8 ve DROSHA kompleksleri tarafından pre-miRNA'ya dönüşür, ardından Dicer tarafından olgun miRNA'ya işlenir ve Argonaute 2 (AGO2) proteini ile birleşerek miRNA kaynaklı susturma kompleksini (miRISC) oluşturur. Oluşan miRISC, miRNA'nın hedef mRNA ile tohum dizisi (6-8 nt) bölgesindeki hibritleşme ve 3' ucundaki atipik eşleşmeler aracılığıyla etkileşimini sağlar. Bir miRNA'nın tohum bölgesi dışındaki 3' bölgesini belirtmek için 3'-MTR (miRNA hedef bölgesi) ifadesi kullanılır (Şekil 2.8). MiRNA'nın 3'-MTR'si SNP'leri belli bir oranda tolere edebilir ve bu SNP'ler gen düzenlenmesinde önemli derecede etkili olmayabilir ancak bu bölgedeki çoklu SNP'ler, insersiyonlar, delesyonlar veya translokasyonlar, hedef genin miRNA aracılı

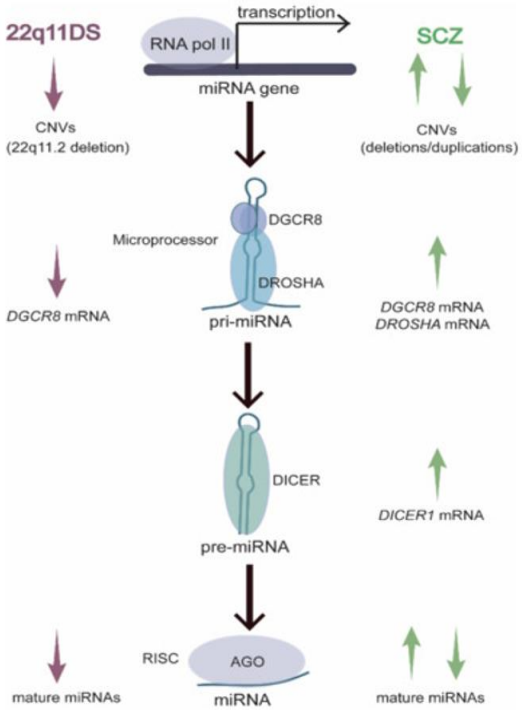
düzenlemesini potansiyel olarak etkileyebilir (Mishra ve Bertino, 2009; Toledo-Stuardo vd., 2023). Bunun yanında, miRNA'lar gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyerek epigenetik modifikasyonlarda önemli rol oynayabilirler. Bu alanda gerçekleştirilen çalışmalar beyindeki miRNA ile ilişkili değişikliklerin sıklıkla davranışsal değişikliklere dönüştüğünü göstermektedir (Roy vd., 2020; Han vd., 2024).



Şekil 2.8. MiRNA-mRNA hibrit bölgeleri

DGCR8 geni 22q11.2 delesyonunun rolü, hastalığın gelişme olasılığının daha yüksek olmasıyla bağlantılı olan miRNA anormalliğinin iyi çalışılmış bir örneği olarak gösterilmiştir (Lim vd., 2022; Ying vd., 2022). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, beyinde eksprese edilen birçok miRNA tespit edilmiştir ve bu miRNA'ların nöronal gelişim ve sinaptik plastisiteyi düzenledikleri bilinmektedir (Goldie vd., 2014; Zhang vd., 2023). Nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik durumlarda sinaptik fonksiyonun bozulduğu düşünüldüğünden dolayı miRNA'ların ve bunların translasyonel homeostazdaki rollerinin SCZ hastalığında bozulmuş olması olasıdır (Wang vd., 2022; Barnett vd., 2023). SCZ hastalarının ölüm sonrası beyin dokusu üzerinde yapılan çalışmalarda miRNA ekspresyonunda değişiklikler rapor edilmiştir ve miR-17-5p, miR-382, miR-652, miR-328, miR-107, miR-134'ün yukarı regülasyonu gösterilmiştir (Chen vd., 2021). MiRNA düzensizliğindeki heterojenlik, SCZ hastalarında semptomların ve bunların başlangıç zamanlarının heterojenliğine katkıda bulunabilir. Farklı miRNA'lar farklı

işlevler gerçekleştirdiğinden SCZ başlangıcına ve patofizyolojisine farklı mekanizmalarla katkıda bulunabilirler. Her ne kadar miRNA'ların SCZ'de güçlü bir şekilde yer aldığı bilinse de miRNA düzensizliğinin hastalık başlangıcına katkıda bulunduğu kesin mekanizmalar kısmen anlaşılmamıştır (Thomas ve Zakharenko, 2021). Tüm bunlar miRNA biyogenezinin SCZ patolojisinde rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2.9). Ancak yapılan araştırmalarda örnek gruplarının çeşitliliği ve metodolojilerin farklılığı gibi limitasyonlar sebebi ile henüz SCZ'de kullanılmak üzere bir miRNA profili belirlenememiştir ve bu konuda literatürde boşluk bulunmaktadır (Roy vd., 2020; Han vd., 2024). Literatürdeki eksikliklere ve zorluklara rağmen miRNA araştırmalarının dayanağı güçlüdür ve nöropsikiyatrik bozukluklar için biyobelirteçlerin geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. Bunlardan en önemlisi, küçük boyutları nedeniyle kan beyin bariyerini geçebilmeleri ve bir biyosıvı içinde (kan, tükürük vb.) stabil kalabilmeleridir. Ayrıca, miRNA'ların minimal invaziv biyobelirteçler olarak vücut sıvılarından tespiti, örneklerin toplanması, işlenmesi ve saklanması standart laboratuvar koşullarında nispeten daha kolaydır (Roy vd., 2020).



Şekil 2.9. MiRNA biyogenezi ve 22q11.2 delesyonunun SCZ'deki düzensizliği (Thomas ve Zakharenko, 2021)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Örnekler

Tez çalışması 17 Mayıs 2023 tarihli 2011-KAEK-25 2023/05-09 kararı ile S.B.Ü. Bursa Yüksek İhtisas E.A.H. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenip onay almış ve etik olarak uygun bulunmuştur. Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından "Nörotensin geninin 3' kodlama yapmayan bölgesindeki sekans varyantlarının şizofreni ile ilişkilerinin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisana Tez Projesi (Proje kodu: FYL-2023-1475) olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma S.B.Ü. Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğine başvuran ve DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013) kriterlerine uygun olarak yapılan psikiyatrik değerlendirme neticesinde SCZ tanısı alan 18-65 yaş arasındaki 50 hasta gönüllüden ve aynı klinikten çalışmaya gönüllü olarak katılan, DSM-5 kriterlerine göre herhangi bir psikiyatrik bozukluğu bulunmayan, genel tıbbi durumunu bozan akut veya kronik merkezi sinir sistemi hastalığı ve ciddi kafa travması öyküsü bulunmayan dahil edilme kriterlerine uygun 50 sağlıklı bireyden toplanmıştır. Hedeflenen örneklem büyüklüğümüz hesaplanırken fenotipte en az orta etki düzeyine (effect size) sahip varyantların (MAF>0,01) tespit edilebilmesi planlanmıştır. Bu kapsamda, çalışmada 100 örnekle MAF değeri 0,005'e kadar olan düşük frekanslı varyantların tespit edilebileceği hesaplanmıştır. G-power (3.1v) yazılımı kullanılarak yapılan güç analizinde 100 kişilik bir örneklem grubuyla Cohen'in etki büyüklüğü sınıflandırmasına uygun olarak orta derece etki düzeyindeki (MAF>0,01) varyantlar, α=0,05 ve %85 güçle analiz edilebilir (Faul vd., 2009). Tüm gönüllülere çalışmaya başlamadan önce klinisyen tarafından sözel ve yazılı olarak çalışma hakkında detaylı bilgi verilmiştir. Tüm gönüllüler kesitsel olarak bir kez değerlendirilmiştir. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin sosyo-demografik bilgileri bu çalışma için hazırlanmış olan sosyo-demografik bilgi formu ile toplanmıştır. Hasta gönüllülerinin semptom şiddeti ölçmek amacıyla Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği (PANSS) ve Kısa Psikiyatrik Derecelendirme Ölçeği (BPRS) kullanılmıştır. Çalışmaya katılmak isteyen SCZ hastası ve sağlıklı tüm gönüllülere onam belgeleri imzalatılarak periferik kan örnekleri alınmıştır.

Örnekler projemizde araştırmacı olarak bulunan Uzm. Dr. Emine Merve AKDAĞ tarafından 10 ml EDTA içeren kan tüplerine alınarak laboratuvarımıza (Omik Analiz ve Araştırma laboratuvarı, Bursa Uludağ Üniversitesi) teslim edilmiştir. Daha sonra kanlar DNA izolasyon işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu işlemi EDTA içeren kan toplama tüplerinde toplanan tam kan örneklerinden, kandan DNA izolasyon kiti (Thermofisher) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için gerçekleştirilen işlemler aşağıda aşamalı olarak verilmiştir ve protokol kitin temin edildiği firmanın önerdiği talimatlara göre uygulanmıştır.

Protokolün temel basamakları:

1- Kan örneklerinden 200µl kan mikrosantrifüj tüpüne eklendi.

2- Kan eklenen tüplerin içerisine 20µl RNaz A ve 20µl Proteinaz K eklendi, tüpler 10-15 sn vortekslendi ve 25°C'de inkübasyon için 2 dk bekletildi.

3- Örnek tüplerine 200µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip tüpte homojen bir karışım elde edilene kadar vortekslendi.

4- Örnek tüpleri 55°C'de inkübasyon için 10 dk bekletildi.

5- İnkübe edilen karışımlara 200µl %100'lük ethanol eklendi ve homojen olana kadar vortekslendi.

6- Karışımlardan ~640'ar µl alındı ve ayrı spin kolon tüplerine aktarıldı. Aktarılan karışımlara 10000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.

7- Kolonda kalan süpernatant döküldü, kolona 500µl Wash Buffer 1 eklenip 10000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.

8- Kolonda kalan süpernatant tekrar döküldü ve kolona 500µl Wash Buffer 2 eklenip maksimum hızda (~ 15000 rpm) 3 dk santrifüj işlemi uygulandı.

9- Kolonda kalan süpernatant son kez döküldükten sonra kolon mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

10- Kolonda kalan DNA'ların üzerine 50µl Genomik Elüsyon Buffer eklendi ardından 1 dk 25°C' de inkübasyon işlemi gerçekleştirdikten sonra 1 dk maksimum hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi .

11- Kolonlar atılıp tüpte kalan ve Elüsyon Buffer içerisinde çözünmüş haldeki DNA'lar -20°C'ye alınarak saklandı.

İzolasyonun ardından DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflığını ölçmek için NanoDrop Spektrofotometre cihazında ölçüm yapılmıştır.

3.3 Dizi Analizi

Çalışmada *NTS* geninin (NM_006183.5) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonu ve sekans analizi için 4. ekzonunda yer alan ve 3'UTR'yi de içeren 696 bp uzunluğundaki fragmana uygun spesifik primerler tasarlanmıştır. Primerler, NCBI primer hazırlama veri tabanı (Primer Blast) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) kullanılarak dizayn edilmiştir. Tasarlanan primerlerin bilgileri Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. PCR işlemi için dizayn edilen spesifik primerler

Primerler	**Primer sekansı (5'-3')**	**Uzunluk**	**Tm değeri**	**GC% oranı**
Forward Primer	5'-AACGGCAGCTGTATGAGAATA-3'	21	56	43
Reverse Primer	5'-AGAGAAACATATGATTTTGATGGCT-3'	25	56	32

Hedef bölgenin amplifikasyonu için kullanılan PCR reaktifleri ve kullanım oranlarını içeren protokol Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR amplifikasyonu için kullanılan protokol ve reaktifler

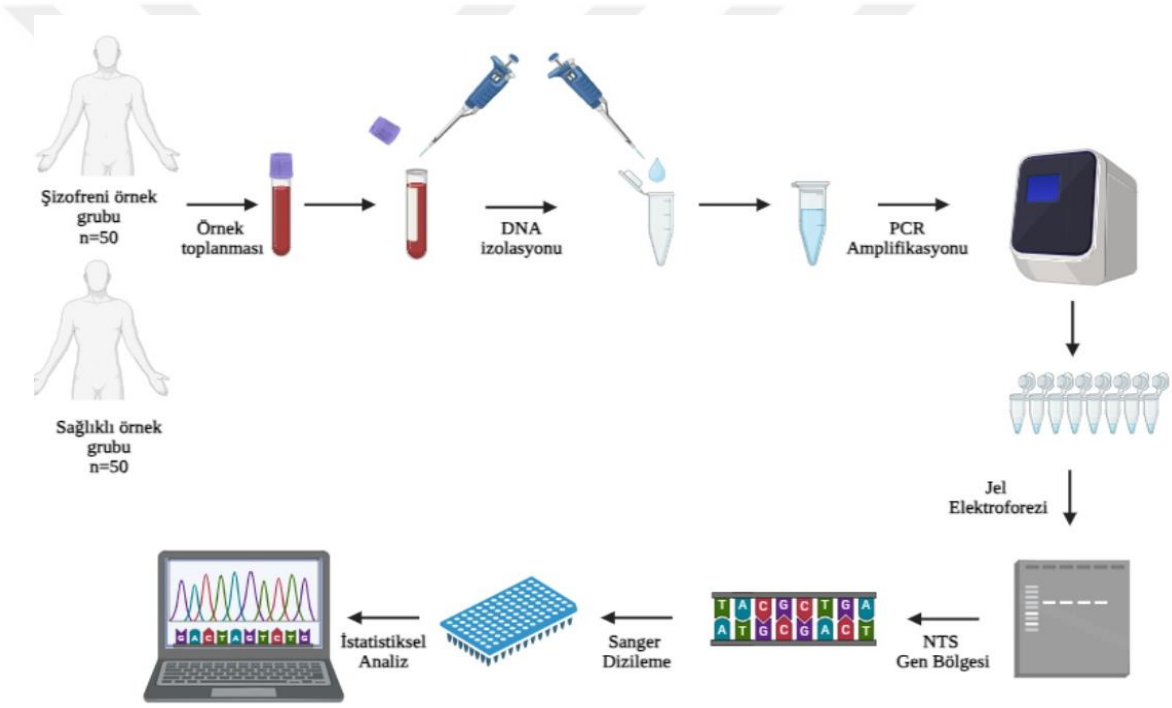
Kullanılan reaktifler	**Kullanılan miktar**
DNA	3µl
PCR Buffer	2,5µl
MgCl	1,5µl
dNTP'ler	0,5µl
Forward Primer	0,5µl
Reverse Primer	0,5µl
Taq polimeraz	0,15µl
Ultrapure Water	Değişken

Belirlenen şartlarda yapılan PCR işleminde hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hedef bölgenin amplifikasyonunda kullanılan PCR protokolü

PCR aşaması	Sıcaklık derecesi	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	3 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	35 döngü
Bağlanma	56°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4°C	-	-

Amplifiye edilen PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütülerek fragman analizi yapılmıştır. PCR işlemi ve fragman analizinin ardından örnekler ABI DNA Analyzer cihazı kullanılarak Sanger sekanslama yöntemiyle analiz edilmiştir. Araştırmanın iş akış şeması Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Uygulanacak yöntemlerin iş akışı şeması

3.4 Veri Analizi

Çalışmada sekanslanan *NTS* geni 3'UTR bölgesinin analizi ve varyant tespiti için Chromas, Bioedit ve DNAbaser yazılımları kullanılmıştır. Varyantların Hardy-Weinberg dengesini (HWE) incelemek, alel frekanslarını hesaplamak ve gruplar arasındaki alel frekansı farklarını istatistiksel olarak analiz etmek amacıyla Haploview 4.2 yazılımı

kullanılmıştır. Buna ek olarak, genotip ve alel frekanslarının gruplar arasındaki anlamlılığı ve ilişkisi SPSS programı ile ki-kare testi ve Fisher exact testi ile analiz edilmiştir.

BioEdit: Kolay elle hizalama, bölünmüş pencere görünümü, kullanıcı tanımlı renk, bilgi tabanlı gölgeleme, bunun yanında ClustalW ve Blast gibi diğer programlarla otomatik entegrasyon gibi birçok özellik içerir. BioEdit, diğer biyoinformatik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan çeşitli formatları kabul edebilir. Bu, BioEdit ve diğer programlar arasında veri dosyalarının değişimini sağlar (Hall vd., 2011).

DNA Baser Assembler: DNA dizilerini birleştirmek, analiz etmek ve varyasyonları tespit etmek için kullanılan bir yazılımdır. Bu yazılım, DNA dizisi birleştirmesini hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirir. Ayrıca güçlü bir kromotogram görüntüleyici ve düzenleyiciyi içerir. Yazlım, FASTA, GBK, SCF, ABI ve SEQ gibi çeşitli DNA dizi formatlarını destekler (Zhang vd., 2012).

Chromas: Bu yazılım DNA dizilerini hizalamak, kesmek ve analiz etmek için kullanılmaktadır. Chromas yazılımında dizi hizalama sezgisel ve basittir (Treves vd., 2010).

Haploview 4.2: Haploview genetik verileri analiz etmek için kullanılan bir yazılım paketidir. Bu yazılım bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) bilgilerini incelemek, HWE dengesine uyumunu değerlendirmek, alel frekanslarını hesaplamak ve gruplar arasındaki alel frekansı farklarını istatistiksel olarak analiz etmek amacıyla kullanılır (Barrett vd., 2005).

SPSS Yazılımı: Moleküler biyoloji de dahil olmak üzere pek çok alanda kullanılabilen istatistiksel verilerin analizleri için kullanılan bir yazılımdır.

3.4.1 Biyoinformatik Analizler

Çalışmada sekanslanan *NTS* geni 3'UTR bölgesinde tespit edilen varyantların regülatör öneminin, hastalık ilişkilerinin ve miRNA bağlanma bölgeleri ile ilişkisinin araştırılması için aşağıdaki veri tabanları kullanarak biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir.

1000 Genom Projesi: 100 Genom projesi, insan genetik çeşitliliğini araştırmak amacıyla başlatılan bir projedir. Bu proje dünya genelindeki farklı popülasyonlardan alınan örneklerle, insan genomundaki varyasyonları haritalamak için kapsamlı veriler sağlamaktadır.

GnomAD: GnomAD kapsamlı bir genetik veri tabanı olup, dünya genelinde farklı araştırmalardan elde edilen genom ve eksom verilerini bir araya getirir.

DbSNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi (dbSNP) veri tabanı genetik varyasyonların kamuya açık bir arşivdir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/). Bu arşiv diziye bir veya birkaç varyantın eklenmesi veya silinmesiyle oluşan indeller ve SNP gibi varyasyonları belgelemek ve araştırmak için kullanılan kapsamlı bir veri tabanıdır (Kitts ve Sherry, 2002).

RegulomeDB: RegulomeDB genomdaki düzenleyici varyasyonların işlevsel önemini belirlemeye yönelik geliştirilmiş bir veri tabanıdır (https://regulomedb.org/). Bu veri tabanı genetik varyasyonların (SNP, indel vb.) biyolojik etkilerini daha iyi anlamamıza yardımcı olur. Veri tabanı, genlerdeki varyasyonların eQTL özellikleri, transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleri gibi farklı regülatör ilişkilerine dair bir skorlama sistemi sunar (Boyle vd., 2012).

GTEx Portal: Genotip-Doku İfadesi (GTEx) projesi, insan gen ekspresyonunu, düzenlenmesini ve bunun birçok farklı doku ve bireyde genetik çeşitlilik ile ilişkisinin inceleyen kapsamlı bir biyoinformatik kaynaktır. GTEx Portal, genomik araştırmalar, hastalık mekanizmalarının keşfi ve genetik varyasyonların fonksiyonel yorumlanması için oldukça önemli veriler sunmaktadır (https://gtexportal.org/home/) (GTEx Consortium, 2013).

miRNASNP v3: MiRNA'lar, miRNA hedeflerindeki SNP'ler ve hastalıkla ilişkili varyasyonları tahmin etmek için kullanılan kapsamlı bir veri tabanıdır (https://guolab.wchscu.cn/miRNASNP//#!/). Ayrıca, miRNASNP v3'ün güncel versiyonu, GWAS, ClinVar ve COSMIC'ten gelen verilerle birlikte bütünleştirildiğinde birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş varyasyon, miRNA ve 3'UTR gen bölgelerinde tanımlanmıştır (Liu vd., 2021).

PolymiRTS Database: PolymiRTS Database veri tabanı miRNA'lar ve miRNA hedef bölgelerindeki DNA polimorfizmlerini sistematik olarak tanımlamak ve bunların moleküler, fizyolojik, davranışsal ve hastalık fenotipleriyle potansiyel ilişkilerini

açıklamak amacıyla tasarlanmıştır (https://compbio.uthsc.edu/miRSNP/) (Bhattacharya vd., 2014).

DisGeNET: Bu platform, GWAS kataloglarından, hayvan modellerinden ve bilimsel literatürden gelen verileri, varyant-hastalık, gen-hastalık, fenotip-hastalık gibi ilişkileri açıklamak adına birleştirir. DisGeNET, belirli insan hastalıklarının ve bunların komorbiditelerinin moleküler temellerinin araştırılması, hastalık genlerinin fonksiyonlarının analizi, ilacın terapötik etkilerinin araştırılması gibi birçok farklı araştırma amaçları için kullanılabilecek çok yönlü bir platformdur (https://www.disgenet.org/search) (Piñero vd., 2017).

PDB: Protein Data Bank (PDB), 1971 yılında biyolojik makromoleküler kristal yapılar için bir arşiv olarak kurulmuştur (Berman vd., 2000). Güncel olarak PDB, protein ve nükleik asitlerin kristalografi, nükleer manyetik rezonans ve diğer yöntemlerle elde edilen üç boyutlu yapısal verilerini içeren bir veri tabanıdır (https://www.rcsb.org/).

TargetScan: TargetScan veritabanı, miRNA'ların hedef genlerini tahmin eden bir veri tabanıdır (https://www.targetscan.org/vert_80/). MiRNA-mRNA etkileşimlerini tahmin ederek, miRNA'ların hangi mRNA'ları hedeflediğini ve bu hedeflerin biyolojik işlevlerinin anlaşılmasına yardımcı olur (McGeary vd., 2019).

MirDB: MiRNA hedef tahmini ve fonksiyonel açıklamalar için geliştirilmiş bir veri tabanıdır (https://mirdb.org/). MirDB, çeşitli organizmalar (insan, fare, sıçan, köpek, tavuk) için miRNA hedeflerini içermektedir (Chen vd., 2020).

RegVar: RegVar, dokuya özgü kodlanmayan düzenleyici varyantlara öncelik vermek için kurulmuş bir hesaplama sunucusudur. Bu veri tabanı 17 insan dokusundaki SNP'lerin ve potansiyel hedef genlerinin, epigenetik ve evrimsel profillerini sunar, buna ek olarak SNP'lerin genler üzerindeki düzenleyici olasılıklarının dokuya özgü tahminlerini verir (Lu vd., 2023).

4. BULGULAR

4.1. Örnekler

Bu tez çalışması kapsamında dahil edilme kriterlerine uygun örneklerin belirlenmesi ve kan örneklerinin alınması S.B.Ü. Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği ve Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Omik Analiz ve Araştırma laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya DSM-5 kriterlerine uygun olarak SCZ tanısı almış gönüllü 50 hasta ve aynı klinikten herhangi bir psikiyatrik hastalığı bulunmayan gönüllü 50 sağlıklı dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylere ait yaş ortalamaları sırasıyla, 40,90±11,54 40,68±15,94 olarak hesaplanmıştır. Hastalar için oluşturulan tüm sosyodemografik ve klinik veriler Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait sosyodemografik ve klinik veriler

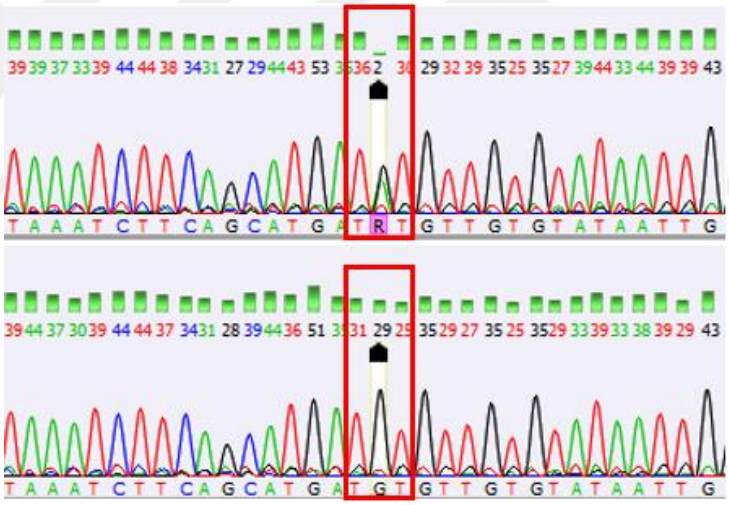
Karakteristik özellikler		**Hasta ortalama ± SD; % (n)**	**Kontrol ortalama± SD; % (n)**	***p***
Cinsiyet	**Erkek**	41 (%82)	21 (%42)	<0,01
	Kadın	9 (%18)	29 (%58)	
Yaş		40,90±11,54	40,68±15,94	0,964
Vücut kitle indeksi (kg/m2)		26,50 ±5,49	30,99±29,24	0,546
Sigara kullanımı		29 (%58)	27 (%54)	0,687
Hipotiroidi		1 (%2)	0 (%0)	0,315
Hipertiroidi		1 (%2)	0 (%0)	0,315
Hipertansiyon		5 (%10)	11 (%22)	0,111
Kalp hastalığı		2 (%4)	12 (%24,5)	<0,01
Diyabet		6 (%12)	5 (%10)	0,749
Ailede psikiyatrik hastalık öyküsü		15 (%30)	0 (%0)	<0,01

4.2. DNA İzolasyon Sonuçları

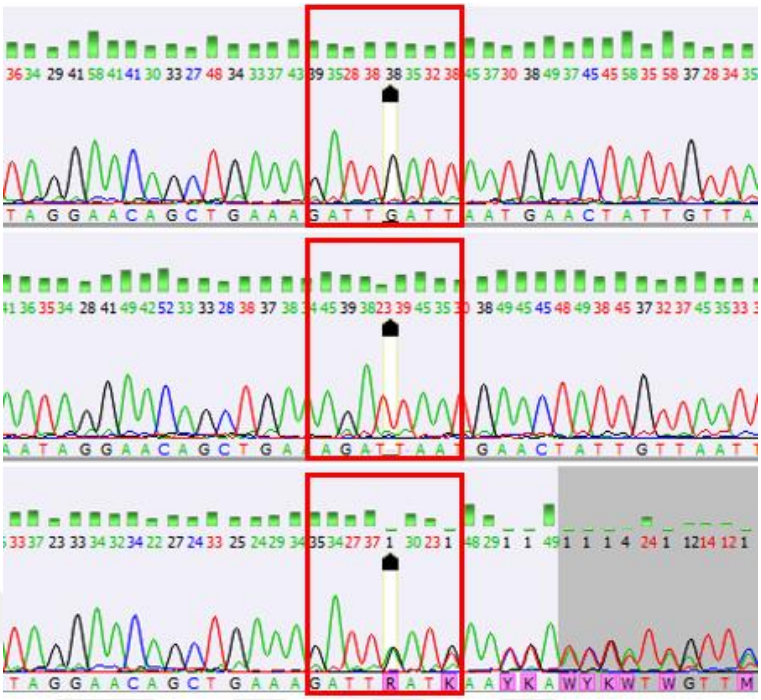
Hasta ve sağlıklı bireylerden toplanan tam kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA'ların kalitesi için NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Elde edilen DNA konsantrasyonları 20-140 ng/µl aralığındadır. DNA örnekleri tasarladığımız primerler ile PCR cihazında amplifiye edilerek agaroz jel elektroforez cihazında DNA bantlarının boyu teyit edildikten sonra Sanger sekanslama işlemi için gönderilmiştir.

4.3. Dizi Analizi Sonuçları

Sanger sekanslama sonuçlarının analizi için Bioedit, DNA Baser ve Chromas yazılımları kullanılmıştır. Dizi analizi için NCBI'den çekilen referans genom (GRCh38.p14) kullanılmıştır. Tespit edilen varyantlar arasında yeni varyantların bulunma durumu Variation Viewer (GRCh38) veri tabanı kullanılarak incelenmiştir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/). Tespit edilen varyantların konumları Variation Viewer (GRCh38)' daki verilerle doğrulanmıştır. Analizlerimiz sonucunda *NTS* geninin sekanslanan 3'UTR bölgesinde, dbSNP veri tabanında kayıtlı ve farklı popülasyonlarda taranmış 2 adet varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantlardan 1'i SNP (rs11117072 G>A) olarak belirlenirken diğer varyant indel (rs139226362 delGATT/dupGATT) olarak belirlenmiştir. Çalışmada yeni varyant keşfedilmemiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Tespit edilen rs11117072 (G>A) genotiplerinin kromotogram görüntüsü



Şekil 4.2. Tespit edilen indel rs139226362 (delGATT/dupGATT) genotiplerinin kromotogram görüntüsü

4.4. Veri Analizi Sonuçları

Çalışmada MAF'ların hesaplanması için Haploview programı kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde analiz edilen varyantlardan biri (rs11117072) 0,01≤MAF<0,05 aralığında yaygın olmayan varyant iken diğeri (rs139226362) MAF≥0,05 şeklinde yaygın varyant olarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada tespit edilen varyantlar ve analiz sonuçları (n=100)

Ref SNP ID	Minör alel	Kromozomal konumu	HWE-*p*	Genotip %	MAF	Alel değişikliği
rs11117072 G>A	A	85882569	1,0	100,0	0,025	G:A
rs139226362 delGATT/dupGATT	GATT	85882876-85882884	1,0	100,0	0,14	GATTGATT:GATT

Çalışmada tespit edilen varyantların, tüm örneklerde, hasta örneklerinde ve kontrol örneklerinde MAF değerlerinin 1000 Genom ve GnomAD veri tabanları ile karşılaştırması Çizelge 4.3'te verilmiştir. Elde ettiğimiz Haploview sonuçları ve veri tabanları karşılaştırılması göz önüne alındığında sonuçlarımız, rs11117072 G>A ve rs139226362 delGATT/dupGATT sekans varyantlarının Türk popülasyonunda SCZ hastaları ve sağlıklı kontroller arasında benzer frekansa sahip olduğu yönündedir.

Çizelge 4.3. Çalışmada analiz edilen varyantların örnek gruplarına ait MAF değerleri

Ref SNP ID	Kromozomal konumu	MAF	1000 Genom MAF	1000 Genom Avrupa MAF	GnomAD MAF
Tespit edilen varyantların tüm örnek grubunda MAF değerleri					
rs11117072	85882569	0,025	0,058	0,051	0,046
rs139226362	85882876-85882884	0,14	0,046	0,131	0,077
Tespit edilen varyantların hasta grubunda (n=50) MAF değerleri					
rs11117072	85882569	0,020	0,058	0,051	0,046
rs139226362	85882876-85882884	0,140	0,046	0,131	0,077
Tespit edilen varyantların kontrol grubunda (n=50) MAF değerleri					
rs11117072	85882569	0,030	0,058	0,051	0,046
rs139226362	85882876-85882884	0,140	0,046	0,131	0,077

Çalışmaya katılan tüm hasta gönüllülerin semptom şiddeti, PANSS ve BPRS ölçekleri kullanılarak değerlendirildi. Genotipler ile semptom şiddeti arasındaki korelasyon incelendi ve sonuçlar $p>0,05$ olarak bulundu. Bu, genotipler ve semptom şiddeti arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. PANSS ve BPRS skorlarının hasta grubuna ait genotiplerle korelasyonu

PANSS	rs11117072 G>A	Ortalama ± SD	*p*	rs139226362 delGATT	Ortalama ± SD	*p*
Pozitif	GG	21,97±8,20	0,941	WT	21,00±7,99	0,171
	GA	22,00±5,66		HET	24,50±8,01	
Negatif	GG	24,35±8,76	0,638	WT	24,69±8,82	0,721
	GA	26,00±2,83		HET	23,71±8,24	
Genel Psikopatoloji	GG	45,48±17,41	0,96	WT	46,33±17,26	0,525
	GA	42,50±9,19		HET	42,86±17,11	
BPRS	GG	33,15±15,66	0,746	WT	32,83±15,56	0,904
	GA	29,50±2,12		HET	33,43±15,37	

4.4.1 Biyoinformatik Analiz Sonuçları

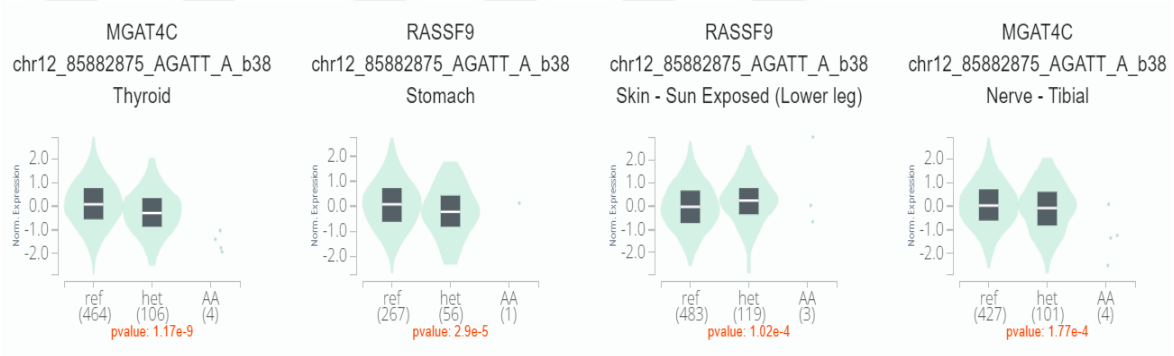
Çalışmada tespit edilen varyantların regülatör özelliklerinin anlaşılması için veri tabanları kullanılarak biyoinformatik analizler gerçekleştirildi. GTEx veri tabanında rs11117072 ile ilgili veri elde edilemezken rs139226362'nin farklı gen ve doku çeşitlerinde eQTL özelliği olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca genlerin regülatör özelliklerini skorlayan RegulomeDB veri tabanında rs11117072 varyantı 5 skoru ile orta derece bir önem gösterirken rs139226362 1f skoru ile regülatör öneme sahip bir varyant olarak gösterilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. GTEx ve RegulomeDB veri tabanlarından alınan rs11117072 ve rs139226362 verisi

Ref SNP ID	RegulomeDB	eQTL	*p*	NES*	Doku
rs11117072	5	-	-	-	-
rs139226362	1f	RASSF9	0,00010	0,22	Güneş Maruziyeti - Alt Bacak Derisi
			0,000029	-0,32	Mide
		MGAT4C	1,2e-9	-0,36	Tiroid
			0,00018	-0,27	Tibial - Sinir

*Normalleştirilmiş etki büyüklüğü, 1f: eQTL + TF binding / DNase peak, 5: TF binding or DNase peak

Ayrıca GTEx portalında belirli bir genotipin (örneğin, AA, AG, GG) farklı doku türlerinde bir genin ekspresyonunu nasıl etkilediği görsel olarak temsil edilir. Tespit ettiğimiz rs139226362 genotiplerinin farklı doku ve genlerdeki ekspresyonu nasıl etkilediğini temsil eden görsel Şekil 4.3' te sunulmuştur.



Şekil 4.3. rs139226362'nin farklı dokularda *RASSF9* ve *MGAT4C* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi

Çalışmada, *NTS* geninin miRNA bağlanması açısından potansiyel regülatör bir bölge olduğu bilinen 3'UTR varyantları taranmış ve 2 varyant tespit edilmiştir. Tespit edilen bu varyantların miRNA bağlanma bölgelerini araştırmak için farklı veri tabanlarında (TargetScan, miRDB, miRNASNP-v3) *in-silico* analizler gerçekleştirilmiştir. TargetScan ve miRDB veri tabanları incelenerek *NTS*'nin 3'UTR bölgesinde bulunan tüm miRNA'lar tespit edilmiş daha sonra tespit edilen varyantların 3'UTR'sinin 50 bp sağında ve solunda bulunan tüm miRNA bağlanma bölgeleri ve miRNA bağlanma bölgelerinin SNP'e ne kadar uzaklıkta olduğu Çizelge 4.6'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tespit edilen varyantların 50 bp çevresindeki miRNA'lar

miRNA'ların 3'UTR konumu	rs11117072'nin miRNA bağlanma bölgelerine uzaklığı	TargetScan ID	miRNA'ların 3'UTR konumu	rs139226362'nin miRNA bağlanma bölgelerine uzaklığı	TargetScan ID
138-144 bp	50 bp	hsa-miR-4473	445-451 bp	50 bp	hsa-miR-7154-5p
142-148 bp	46 bp	hsa-miR-656-3p	445-451 bp	50 bp	hsa-miR-433-3p
144-150 bp	44 bp	hsa-miR-6083	454-460 bp	41 bp	hsa-miR-4461
147-153 bp	41 bp	hsa-miR-32-3p	461-468 bp	33 bp	hsa-miR-337-3p
148-155 bp	39 bp	hsa-miR-4735-5p	462-468 bp	33 bp	hsa-miR-202-5p
153-159 bp	35 bp	hsa-miR-4474-5p	463-469 bp	32 bp	hsa-miR-384
161-168 bp	26 bp	hsa-miR-570-3p	463-469 bp	32 bp	hsa-miR-3685
164-170 bp	24 bp	hsa-miR-510-3p	466-472 bp	29 bp	hsa-miR-5003-3p
173-179 bp	15 bp	hsa-miR-376a-5p	478-484 bp	17 bp	hsa-miR-374a-3p
173-180 bp	14 bp	hsa-miR-8061	485-491 bp	10 bp	hsa-miR-337-3p
173-180 bp	14 bp	hsa-miR-4760-5p	485-491 bp	10 bp	hsa-miR-202-5p
179-186 bp	8 bp	hsa-miR-4699-5p	487-493 bp	8 bp	hsa-miR-4326
184-190 bp	4 bp	hsa-miR-4728-3p	492-498 bp	3 bp	hsa-miR-1207-3p
195-201 bp	1 bp	hsa-miR-5003-5p	509-515 bp	1 bp	hsa-miR-6853-3p
197-203 bp	3 bp	hsa-miR-4731-3p	511-517 bp	3 bp	hsa-miR-5000-5p
197-203 bp	3 bp	hsa-miR-4801	527-533 bp	19 bp	hsa-miR-6876-5p
199-206 bp	5 bp	hsa-miR-4789-5p	527-533 bp	19 bp	hsa-miR-4476
200-206 bp	6 bp	hsa-let-7b-3p	538-544 bp	30 bp	hsa-miR-664a-3p
200-206 bp	6 bp	hsa-let-7f-1-3p	542-548 bp	34 bp	hsa-miR-616-3p
200-206 bp	6 bp	hsa-miR-98-3p	544-550 bp	36 bp	hsa-miR-513b-3p
200-206 bp	6 bp	hsa-let-7a-3p	551-557 bp	43 bp	hsa-miR-584-3p
200-206 bp	6 bp	hsa-miR-1185-1-3p	559-565 bp	51 bp	hsa-miR-3613-3p
200-206 bp	6 bp	hsa-miR-1185-2-3p			
200-206 bp	6 bp	hsa-let-7f-2-3p			
207-214 bp	13 bp	hsa-miR-3145-5p			
208-214 bp	14 bp	hsa-miR-508-5p			
215-222 bp	21 bp	hsa-miR-889-3p			
225-231 bp	31 bp	hsa-miR-6820-3p			
225-231 bp	31 bp	hsa-miR-3164			
228-234 bp	34 bp	hsa-miR-125a-3p			
229-236 bp	35 bp	hsa-miR-552-3p			
232-239 bp	38 bp	hsa-let-7f-2-3p			
232-239 bp	38 bp	hsa-miR-1185-1-3p			
232-239 bp	38 bp	hsa-miR-1185-2-3p			
233-239 bp	39 bp	hsa-let-7b-3p			
233-239 bp	39 bp	hsa-let-7a-3p			
233-239 bp	39 bp	hsa-miR-98-3p			
233-239 bp	39 bp	hsa-let-7f-1-3p			
233-239 bp	39 bp	hsa-miR-4789-5p			
235-241 bp	41 bp	hsa-miR-4528			
243-249 bp	49 bp	hsa-miR-524-5p			

MiRNA-SNP ilişkisine dair veriler içeren başka bir veri tabanı olan miRNASNP v3 verilerine göre incelenen varyasyonlardan yalnızca rs11117072 hakkında bilgi elde edilmiştir. 3'UTR bölgesinde tespit edilen rs11117072, 3 miRNA için miRNA bağlanma bölgesi kazanırken 4 miRNA için miRNA bağlanma bölgesini kaybetmiştir (Çizelge 4.7). MiRNA'ların (hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-5580-3p, hsa-miR-4803, hsa-miR-4643, hsa-miR-499b-3p, hsa-miR-499a-3p, hsa-miR-4789-3p) 3'UTR ile baz eşleşmeleri Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. miRNASNP-v3 verilerine göre rs11117072 (G>A) varlığında bağlanma bölgesi kazanan ve kaybeden miRNA'lar

Ref SNP ID	miRNA	Kazanılan/Kaybedilen	Bağlanma konumu	Bitiş konumu
rs11117072	hsa-miR-3074-3p	Kazanılan	85882565	85882570
rs11117072	hsa-miR-5580-3p	Kazanılan	85882567	85882572
rs11117072	hsa-miR-4803	Kazanılan	85882568	85882573
rs11117072	hsa-miR-4643	Kaybedilen	85882567	85882572
rs11117072	hsa-miR-499b-3p	Kaybedilen	85882565	85882570
rs11117072	hsa-miR-499a-3p	Kaybedilen	85882565	85882570
rs11117072	hsa-miR-4789-3p	Kaybedilen	85882567	85882572

Çizelge 4.8. miRNASNP-v3 verilerine göre rs11117072 varlığında bağlanma bölgesi kazanan ve kaybeden miRNA'ların gösterim

MiRNA ID	MiRNA konumu
hsa-miR-3074-3p	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUAUGUUGUGUAUAA 3' |||||. miRNA: 3' GCCACGGAUGACUCGACUAUAG 5'
hsa-miR-5580-3p	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUAUGUUGUGUAUAAUU 3' |||||. miRNA: 3' CACGACCGAGUGAAGUAUACAC 5'
hsa-miR-4803	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUAUGUUGUGUAUAAUUG 3' |||||. miRNA: 3' AGUUAGGUGUGAUAAUACAAU 5'
hsa-miR-4643	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUGUGUUGUGUAUAAUU 3' ||x|||. miRNA: 3' AAUCGUAAAUACCAGUACACAG 5'
hsa-miR-499b-3p	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUGUGUUGUGUAUAA 3' ||||x|. miRNA: 3' ACAAUUCUGAACGUCACUACAA 5'
hsa-miR-499a-3p	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUGUGUUGUGUAUAA 3' ||||x|. miRNA: 3' UCGUGUCUGAACGACACUACAA 5'
hsa-miR-4789-3p	3'UTR: 5' AUAAAUCUAAAUCUUCAGCAUGAUGUGUUGUGUAUAAUU 3' ||x|||. miRNA: 3' AUAUAUGUGGACGAUACACAC 5'

Çalışmada tespit edilen varyantların regülatör özelliklerine ilişkin RegVar veri tabanından dokuya özgü gen düzenlenmesindeki etki seviyelerine bakılmış ve yalnızca biri (rs11117072) için sonuç elde edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, rs11117072'nin dokuya özgü gen düzenlenmesindeki etki skorları Çizelge 4.9'de listelenmiştir.

Çizelge 4.9. RegVar sonuçlarına göre rs11117072'nin dokuya özgü gen düzenlenmesindeki etki skorları

Ref SNP ID	SNP konumu	Gen sembolü	Gen konumu	Doku	Skor
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Anterior Singulat Korteks	0,00079
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Karaciğer	0,00521
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	İnce Bağırsak	0,00553
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Sigmoid Kolon	0,00883
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Adrenal Bez	0,01063
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Dalak	0,01234
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	İskelet Kası	0,01285
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Özofagus Mukozası	0,01734
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Substantia Nigra	0,01741
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Hipokampus	0,01747
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Akciğer	0,01748
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Sol Ventrikül	0,02263
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Mide	0,02322
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Tam Kan	0,02731
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Yumurtalık	0,02790
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Aort	0,06249
rs11117072	chr12:86276346	*NTS*	chr12:86268072	Pankreas	0,06669

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

SCZ dünya çapında küresel hastalık yükünün ilk 10 nedeni arasında yer alan kompleks bir hastalıktır. Yaşam kalitesini ve hayatta kalma şansını artırmak için hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılması önem taşımaktadır ancak SCZ için henüz klinik olarak uygulamaya giren moleküler bir biyobelirteç doğrulanmamıştır. *NTS* geni ve reseptör genlerinin nörotransmitter sistemleri üzerindeki düzenleyici etkileri yoluyla SCZ etiyolojisine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu yüzden çalışmada SCZ patofizyolojisinin aydınlatılması ve daha iyi anlaşılması açısından Sanger sekanslama yöntemi ile SCZ ve sağlıklı kontroller arasındaki *NTS* 3'UTR gen bölgesindeki varyantların tespitini ve tespit edilen varyantları biyoinformatik yöntemlerle analiz ederek SCZ ile ilişkisini araştırmayı hedefledik. Çalışma kapsamında dbSNP veri tabanında tanımlanmış ve farklı popülasyonlarda tarandığı bilinen 2 sekans varyantı tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantlardan ikisi de 3'UTR varyantı olmakla birlikte biri SNP (rs11117072) diğeri indel (rs139226362) olarak belirlenmiştir. Çalışmada Sanger sekans verilerinin analiz sonuçları incelenip MAF'ları Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Bu çizelgede GnomAD projesinden genel popülasyon frekansları ile karşılaştırma yapılırken 1000 Genom projesinden hem genel popülasyon hem de Avrupa popülasyonunun MAF'ları ile karşılaştırma yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı tüm örnek gruplarının MAF'larının karşılaştırıldığı Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere, rs11117072 (MAF=0,025) varyantının MAF'ı genel popülasyonun (1000 Genom, GnomAD sırasıyla MAF=0,058, MAF=0,051) MAF'ı ile benzerlik gösterirken, rs139226362 (MAF=0,14) varyantının MAF'ı genel popülasyona (1000 Genom, GnomAD sırasıyla MAF=0,046, MAF=0,077) göre daha yüksek elde edilmiştir. Ancak, 1000 Genom Avrupa popülasyonu frekansına bakıldığında tespit ettiğimiz rs139226362 varyantının MAF'ı (0,14) ile 1000 Genom Avrupa popülasyonunun MAF'ı (0,13) benzerlik göstermektedir. Ayrıca, Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere hasta ve sağlıklı gruplar kendi aralarında da değerlendirildiğinde rs11117072 (hasta MAF=0,020, sağlıklı MAF=0,030) ve rs139226362 (hasta MAF=0,14, sağlıklı MAF=0,14) varyantları ile 1000 Genom ve GnomAD projelerinde genel popülasyonun MAF'ları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Buna ek olarak semptom şiddetinin ölçülmesi için hasta gönüllülerden alınan PANSS ve BPRS skorları analiz edilmiştir (Çizelge 4.4). Analiz sonuçlarına göre varyantların tespit

edildiği hastalarda ve hastaların skorları arasında kurulan korelasyon sonucunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çalışma kapsamında yapılan literatür taramasında tespit ettiğimiz rs11117072 ve rs139226362 varyantlar ile ilgili literatürde çok fazla bilgiye rastlanmamıştır. Literatür bu varyantların işlevselliğini açıklamak açısından eksik kalmıştır. rs139226362 literatür taramasında görüldüğü üzere yalnızca Sentinelli vd. (2023) obez ergenlerin dolaşımdaki pro-NT düzeyleri ve *NTS* gen varyantları ile ilişkilendirdiği çalışmada incelenmiştir. Çalışma sonuçlarında bu varyant benzer frekanslarla hem düşük hem de yüksek pro-NT seviye grubunda mevcut olduğundan anlamlı bulunamamıştır. Aynı çalışmada tespit ettiğimiz rs11117072 varyantı da taranmış ancak o da benzer frekanslarla hem düşük hem de yüksek pro-NT seviye grubunda mevcut olduğundan anlamlı bulunamamıştır. Kulminski vd. (2019) yaptığı çalışmada ise yaşa bağlı fenotiplerin pleiotropik meta-analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 61 yeni varyant belirlemişlerdir ve bunlardan biri de rs11117072 varyantıdır. Çalışmada rs11117072 genom çapında idrardaki albümin fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Başka bir çalışmada Avgan (2018) BP, SCZ, dikkat eksikliği gibi bilişsel bozuklukların bilişsel performansı etkilediğini, bu tür patolojik kohortlarda bilişsel performanslarla ilişkili olarak tanımlanan genlerin hastalık patolojisi göstermeyen sağlıklı bireylerde de bilişsel performansı etkileyebileceğini varsaymıştır. Çalışmada 613 sağlıklı bireye Hopkins Sözel Öğrenme Testi uygulayarak, hatırlama, öğrenme, gecikmeli hatırlama, akılda tutma ve ayırt etmeyi değerlendirmiştir. Bu değerlendirme sonuçları ile birçok SNP arasında korelasyon kurulmuştur. Analizler sonucunda ise rs11117072 varyantının MAF'ı öğrenme (minör alel, p=0,031) ve ayırt etme (minör alel, p=0,022) değerlendirmeleri için anlamlı bulunmuştur. Tespit ettiğimiz rs11117072 varyantı ve bilişsel işlevle ilişkili literatürde boşluk bulunmaktadır ancak Su vd. (2024) kronik uyku bozukluğu hastalarında gerçekleştirdiği çalışmada NTS plazma seviyelerinin uyku kalitesi ve bilişsel işlevle ilişkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarında ise kötü uyku kalitesi ve objektif olarak ölçülen bilişsel işlevin yüksek NTS seviyeleri ile ilişkili olabileceği raporlanmıştır. Yu vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada SCZ, BP, MDB hastalarında düşük NTS seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarında ise plazma NTS'nin bilişsel işlevlerde önemli bir yere sahip olabileceğini ve ciddi psikiyatrik bozukluklarda bilişsel bozuklukların iyileştirilmesinde tedavi hedefi olma potansiyeli olduğunu raporlamıştır. Yapılan çalışmalarla NTS'nin bilişsel işlev

üzerinde bir rolü olduğu belirlense de literatürde bilişsel işlevin *NTS*'nin 3'UTR gen bölgesindeki genetik varyantlarıyla ilişkisinin aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmada yapılan biyoinformatik analizler sonucunda tespit edilen varyantların regülatör önemlerini analiz etmek için RegulomeDB skorlarına bakıldığında rs11117072, 5 skoru ile orta derece bir anlamlılık gösterirken, rs139226362, 1f skoru ile önemli bir regülatör varyant olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca GTEx veri tabanında varyantların eQTL özellikleri değerlendirildiğinde rs139226362'nin farklı dokularda *MGAT4C* ve *RASSF9* genlerinin ekspresyonu üzerinde etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bunun üzerine yapılan literatür taramasında bu genlerdeki bazı lokusların SCZ ile ilişkili olabileceği raporlanmıştır (Chang vd., 2024). Ancak rs139226362'nin sebep olduğu *MGAT4C* ve *RASSF9* genlerindeki ekspresyon değişikliklerinin SCZ ile ilişkisine dair çalışma henüz mevcut değildir. Bu alanda yapılacak ileri çalışmalar SCZ moleküler etiyolojisine katkı sağlayabilir.

Genlerin 3'UTR bölgeleri gen ekspresyonunu düzenleyen kritik bölgelerdir ve mRNA'nın stabilitesini etkiler. Ayrıca protein fonksiyonunu da regüle edebilirler. Bu regülasyonda etkili olan yapılardan biri miRNA'lardır. MiRNA'lar fizyolojik ve patolojik durumlarda bir veya birden fazla genin ekspresyonunu etkileyebilir. Memelilerde miRNA'ların biyogenezi son derece korunmuş bir süreç olup tip II ve III polimerazların etkisiyle başlar (Borchert vd., 2006). Polimerazlar DNA'dan yaklaşık 1000 nt uzunluğunda primer miRNA (pri-miRNA) transkribe eder. Pri-miRNA nükleusta DGCR8 ve DROSHA kompleksleri tarafından işlenerek yaklaşık 60 nt uzunluğunda pre-miRNA'ya dönüşür. Bu pre-miRNA, sitoplazmada Dicer tarafından olgun bir miRNA dupleksine işlenir. Olgun miRNA, Argonaute 2 (AGO2) proteini ile birleşerek miRNA kaynaklı susturma kompleksini (miRISC) oluşturur. Oluşan miRISC miRNA'nın hedef mRNA ile etkileşimini sağlar (OBrien vd., 2018). Bu etkileşim miRNA tamamlayıcılığının belirli konfigürasyonuna bağlıdır. Bu konfigürasyon ise miRNA'nın 5' ucundaki 6-8 bp'lik tohum dizisi bölgesinde oluşan karakteristik hibritleşmeyi ve miRNA'nın 3' ucundaki nükleotitleri kapsayan atipik eşleşmeleri içerir. Atipik eşleşmeler miRNA-mRNA etkileşimine stabilite kazandırarak miRISC etkisini artırır

(Brennecke vd., 2005; Wang, 2014). Hedef mRNA'nın 3'UTR'sinde bulunan SNP'ler bu etkileşimi değiştirebilir, yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir veya mevcut bölgeleri ortadan kaldırabilir. Bu durum miRNA fonksiyonunu etkileyebilir ve polimorfik genlerin bu tür değişikliklere daha yatkın olmasına neden olabilir (Manikandan ve Munirajan, 2014; Cai vd., 2009). Özellikle son zamanlarda yapılan araştırmalar mirSNP'lerin miRNA bağlanma bölgelerinin oluşumunu ve kaybını etkileyerek gen ekspresyon düzenlemelerinde önemli rolleri olabileceğini göstermektedir (Gong vd., 2012). Ancak yapılan araştırmalar mRNA stabilitesinin yalnızca mirSNP'lerle değil SNP'lerin yakınında bulunan miRNA'lar aracılığı ile de düzenlenebileceğini öne sürmüştür (Grimson vd., 2007; Afrasiabi vd., 2021). Bunun üzerine yapılan araştırmalarda Y. Zhao vd. (2007) dizideki bir değişimin miRNA-mRNA etkileşimini 70 bp'lik bir mesafede değiştirme kapasitesine sahip olduğunu düşünmüşlerdir. Kertesz vd. (2007) 5' ve 3' UTR bölgesinin yaklaşık 15 bp miRNA hedef bölgesini çevreleyen mesafenin içindeki dizinin miRNA-mRNA dupleks oluşumunu ve stabilitesini etkilediğini göstermiştir. Buna örnek olarak ise P. Mishra vd. (2007) *DHFR* geninin 3'UTR'ında miR-24 bağlanma bölgesinin 14 bp sağında bulunan bir SNP'nin (829C>T) miR-24 fonksiyonuna etki ederek *DHFR*'nin aşırı ekspresyonuna ve metotreksat (kemoterapi ilacı) direncine neden olduğunu göstermiştir. Hu ve Bruno (2011) miRNA hedef genlerinin 3'UTR'lerinde bulunan SNP verilerinden yararlanarak 3'UTR'lerin miRNA bağlanma bölgeleri ve miRNA fonksiyonu üzerindeki etkisini araştırdığı genom çapında kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada, hedef genlerin 3'UTR'sinde bulunan SNP'lerle ilişkili biyoinformatik analizler sonucunda 3'UTR'de bulunan SNP'lerin yoğunluğuna dayanarak, yaklaşık 67 nt'lik bir bölgenin miRNA fonksiyonu için önemli olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak SNP ve miRNA bağlanma bölgesi etkileşimlerinin gen ekspresyonunu etkileyebileceği tespit edilmiştir. Literatürde güncel bir çalışma olan Toledo-Stuardo vd. (2023) çalışmasında *MICA* geninde bulunan miRNA'ların bağlanma bölgesi dışındaki SNP'lerin 3'UTR ile etkileşimi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda ise hsa-miR-520d-3p'nin bağlanma enerjisinde SNP'lerin dolaylı bir etkisi olduğunu belirlemişlerdir. Bu gözlemler 3'UTR dizilerinde bulunan SNP'lerin RNA'nın katlanma yapılarındaki değişiklikler nedeniyle bazı miRNA'ların bağlanma bölgelerini dolaylı olarak etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu alandaki literatürde bu mekanizmaların ayrıntılı olarak incelendiği çalışmalar sınırlıdır. Gelecekte yapılacak araştırmalar bu

etkileşimlerin biyolojik işlevleri ve hastalık süreçleri üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza olanak sağlayabilir.

Tez çalışması kapsamında tespit edilen varyantların yaklaşık 50 bp çevresindeki miRNA'lar biyoinformatik olarak analiz edilmişti. Analiz edilen miRNA'ların SCZ, diğer nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisini araştırmak için kapsamlı bir literatür taraması yapıldı.

rs139226362'nin yaklaşık 50 bp çevresinde bağlanma bölgesi bulunan miRNA'lar ile ilgili yapılan literatür taramasında, Amoah (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada SCZ ve BP hastalarının postmortem beyin dokusunda değişen miRNA ifadeleri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda rs139226362'ye 41 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-4461 ifade düzeyinin kontrollere oranla SCZ örneklerinde aşağı regüle (FC=-1,61) olduğu tespit edilerek anlamlı (p<0,05) bulunmuştur. Aynı çalışmada rs11117072'ye 6 bp ve 38 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-1185-1-3p ifade düzeyinin kontrollere oranla SCZ örneklerinde aşağı regüle (FC=-1,80) olduğu tespit edilerek anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Buna ek olarak rs11117072'ye 6 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-889-3p ifade düzeyinin ise kontrollere oranla BP örneklerinde aşağı regüle (FC=-1,11) olduğu tespit edilerek anlamlı (p<0,05) bulunmuştur. Başka bir çalışmada yapılan transkriptom analizinde SCZ hastalarının astrositlerinde kontrol örneklerinden farklı miRNA ifadeleri tespit edilmiştir. Tez çalışmasında tespit edilen rs139226362'ye 10 bp ve 33 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-337-3p ve rs11117072'ye 6 bp ve 38 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-1185-1-3p'nin literatürdeki çalışmanın sonucunda SCZ astrositlerinde ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak bu miRNA'ların SCZ patogenezinde hücre tipi spesifik bir rolü olabileceği düşünülmüştür (Akkouh vd., 2021). SCZ örneklerinden yapılan başka bir transkriptom analizinde rs139226362'ye 10 bp ve 33 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-202-5p'nin SCZ örneklerinde düşük eksprese olduğu raporlanmıştır (Yang vd., 2023). Buna ek olarak hsa-miR-202-5p'nin MDB hastalarının beynindeki sinaptik miRNA ekspresyon farklarının analiz edildiği bir çalışmada önemli derecede (p<0.05) yukarı regüle (FC=9,304) olduğu raporlanmıştır (Yoshino vd., 2021). Tez çalışmasında rs139226362'nin yaklaşık 50 bp çevresinde bağlanma bölgesi bulunan diğer miRNA'lar literatürde farklı nöropsikiyatrik ve

nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Y. Li vd. (2022b) tarafından yapılan bir çalışmada AH tanısında hsa-miR-384'ün potansiyel bir biyobelirteç olabileceği raporlanmıştır. TSSB tanısı almış askerler üzerinde yapılan başka bir çalışmada hsa-miR-374a-3p'nin çalışmadaki diğer gruplara kıyasla TSSB hastalarında daha düşük eksprese (FC=-0.217, p=0.041) olduğu raporlanmıştır (Guedes vd., 2021). MDB hastalarının beyin ön singulat korteksinde miRNA profillerinin analiz edildiği bir çalışmada ise hsa-miR-6853–3p'nin önemli ölçüde (p<0,05) yukarı regülasyonu (FC=1,24) tespit edilmiştir (Yoshino vd., 2020). Buna ek olarak OSB hastalarının serum örneklerinden gerçekleştirilen bir çalışmada hsa-miR-664a-3p'nin yukarı regülasyonu (FC=1,141) tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda OSB post-mortem beyin dokusunda da benzer ifade modeli gösterdiği bilinen hsa-miR-664a-3p'nin OSB için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği raporlanmıştır (Kichukova vd., 2017). OSB hastaları ile ilgili yapılan başka bir çalışmada kan örnekleri kullanılarak mikroarray çalışması yapılmış ve sonucunda hsa-miR-3613-3p'nin önemli derecede (p=0,0041) aşağı regüle olduğu raporlanmıştır (Huang vd., 2015).

rs11117072'nin yaklaşık 50 bp çevresinde bağlanma bölgesi bulunan miRNA'lar ile ilgili yapılan literatür taramasında, Mu vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada rs11117072'ye 26 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-570-3p'nin Avrupa popülasyonunda SCZ riskiyle önemli ölçüde ilişkili olduğu raporlanmıştır. Başka bir çalışmada, rs11117072'ye 6 bp ve 38 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan 3 miRNA'nın hsa-miR-1185-1-3p, hsa-miR-1185-2-3p, hsa-let-7f-2-3p *GDNF* geninin 3'UTR'sinde bulunan ve SCZ ile ilişkisi olduğu bilinen rs11111' in mirSNP'leri olduğu tespit edilmiştir. Bunun üzerine rs11111'nin *GDNF* ekspresyonunu tespit edilen aday miRNA'lara bağlı olarak düşürebileceğini raporlamışlardır (Keszler vd., 2024). Khani-Habibabadi vd. (2019) tarafından nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde *BDNF* ifadesini düzenleyen aday miRNA'ların analiz edildiği biyoinformatik bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda rs1117072'ye 6 bp ve 39 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan let-7a-3p'nin başka genler aracılığı ile dolaylı olarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen *BDNF*'yi hedefleyerek gen regülasyonunda etkili olabileceği düşünülmüştür. Aynı yayında rs11117072'ye 6 bp ve 39 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-98-3p biyoinformatik analizler sonucunda *BDNF*'yi hedefleyen aday

miRNA'lar arasına dahil edilmiştir. Başka bir çalışmada Lobentanzer vd. (2019) SCZ/BP transkriptom analizleri ile biyoinformatik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, let-7a-3p'nin SCZ/BP ile ilişkili 7 aday geni hedeflediği raporlanmıştır. rs11117072'ye 14 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan bir diğer miRNA hsa-miR-508-5p'dir. Y. Lim vd. (2021), beyin dokusunda gerçekleştirdiği bir çalışmada ise hsa-miR-508-5p'nin alkol kullanım bozukluğu ile ilişkili miRNA'lardan olabileceği raporlanmıştır. Buna ek olarak, hsa-miR-508-5p ile aynı miRNA ailesinde bulunan hsa-miR-508-3p'nin beyin dokusundaki farklı ifadelerle SCZ ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (Smalheiser vd., 2014). Son olarak rs11117072'ye 34 bp uzaklıkta bağlanma bölgesi bulunan hsa-miR-125a-3p, farklı hastalıklarda hedef gösterilmiştir. Camkurt vd. (2016) gerçekleştirdikleri bir Türk çalışmasında, SCZ hastalarının periferik kanında belirli miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda hsa-miR-125a-3p'nin SCZ hastalarında anlamlı derecede (p<0.001) yukarı regüle olduğu raporlanmıştır. hsa-miR-125a-3p ile ilişkili başka bir çalışmada, X. Zhao vd. (2018), yaptıkları biyoinformatik analizler sonucunda hsa-miR-125a-3p'nin PI3K/Akt yolağı aracılığıyla hedefi olan *NTS* ekspresyonunu etkileyebileceği ve böylece apoptoz sürecini düzenleyerek pankreas kanseri ile ilişkili mekanizmalarda etkili olabileceğini varsaymıştır. Çalışmada yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, tespit ettiğimiz varyantların 50 bp çevresinde bulunan miRNA'lar literatürde hem biyoinformatik hem de deneysel olarak SCZ, nöropsikiyatrik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer kompleks hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Literatürde SCZ ile ilgili bulunan miRNA çalışmalarının dayanağı güçlü olmasına karşın çoğu çalışmada miRNA'lar biyoinformatik olarak hedef gösterilmiştir. Bu hedeflerin deneysel olarak doğrulanması oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasının bazı limitasyonları bulunmaktadır. İlk olarak, örnek grubu hedeflediğimiz varyantları tespit etmek için yeterli olmasına karşın daha büyük örneklemde çalışmak daha anlamlı sonuçlar elde etmemize olanak sağlayıp çalışmanın gücünü artırabilir. İkinci olarak, çalışmada tespit edilen varyantlar ve miRNA etkileşimleri biyoinformatik analizler ile incelenmiştir. Bu bulguların deneysel olarak doğrulanmamış olması çalışmamızın limitasyonları arasındadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda ileride yapılacak çalışmalar için ön veri sunulmaktadır. Güncel çalışmalarla önemi daha iyi anlaşılan *NTS* geni 3'UTR'sini içeren biyoinformatik analizlerinde dahil edildiği ileri çalışmalar SCZ patogenezine ve SCZ ile ilgili moleküler biyobelirteç çalışmalarına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

Afrasiabi, A., Fewings, N. L., Schibeci, S. D., Keane, J. T., Booth, D. R., Parnell, G. P., & Swaminathan, S. (2021). The Interaction of Human and Epstein-Barr Virus miRNAs with Multiple Sclerosis Risk Loci. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2927. https://doi.org/10.3390/ijms22062927

Akkouh, I. A., Hughes, T., Steen, V. M., Glover, J. C., Andreassen, O. A., Djurovic, S., & Szabo, A. (2021). Transcriptome analysis reveals disparate expression of inflammation-related miRNAs and their gene targets in iPSC-astrocytes from people with schizophrenia. *Brain, behavior, and immunity*, 94, 235–244. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.01.037

Akter, H., Park, M., Kwon, O. S., Song, E. J., Park, W. S., & Kang, M. J. (2015). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(8), 6053–6062. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3282-9

Akter, H., Yoon, J. H., Yoo, Y. S., & Kang, M. J. (2018). Validation of Neurotensin Receptor 1 as a Therapeutic Target for Gastric Cancer. *Molecules and cells*, 41(6), 591–602. https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0025

American Psychiatric Association. (2022). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.) text revision. Arlington, VA: *American Psychiatric Association*.

Amoah, S. (2020). "Exosomal secretıon of a psychosıs-altered mıcrorna regulates glutamate receptor expressıon; effects of antıpsychotıcs and maternal ımmune actıvatıon." (Doctoral dissertation) https://digitalrepository.unm.edu/biom_etds/224

Avgan, N. (2018). *The genetic basis of human cognition: Intelligence, learning and memory* (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology).

Ayari, F., Chaaben, A. B., Abaza, H., Mihoub, O., Ouni, N., Boukouaci, W., Kharrat, M., Leboyer, M., Guemira, F., Tamouza, R., & Mankai, A. (2024). Association between genetic variants of TLR2, TLR4, TLR9 and schizophrenia. *L'Encephale*, 50(2), 178–184. https://doi.org/10.1016/j.encep.2023.05.004

Barak, R., Goshtasbi, G., Fatehi, R., & Firouzabadi, N. (2024). Signaling pathways and genetics of brain Renin angiotensin system in psychiatric disorders: State of the art. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 236, 173706. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173706

Barchetta, I., Baroni, M. G., Melander, O., & Cavallo, M. G. (2022). New Insights in the Control of Fat Homeostasis: The Role of Neurotensin. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2209. https://doi.org/10.3390/ijms23042209

Barnett, M. M., Reay, W. R., Geaghan, M. P., Kiltschewskij, D. J., Green, M. J., Weidenhofer, J., Glatt, S. J., & Cairns, M. J. (2023). miRNA cargo in circulating vesicles from neurons is altered in individuals with schizophrenia and associated with severe disease. *Science advances*, 9(48), eadi4386. https://doi.org/10.1126/sciadv.adi4386

Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* (Oxford, England), 21(2), 263–265. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). *The Protein Data Bank. Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235

Bhattacharya, A., Ziebarth, J. D., & Cui, Y. (2014). PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D86–D91. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1028

Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097–1101. https://doi.org/10.1038/nsmb1167

Boules, M. M., Fredrickson, P., Muehlmann, A. M., & Richelson, E. (2014). Elucidating the role of neurotensin in the pathophysiology and management of major mental disorders. *Behavioral sciences* (Basel, Switzerland), 4(2), 125–153. https://doi.org/10.3390/bs4020125

Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M., & Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome research*, 22(9), 1790–1797. https://doi.org/10.1101/gr.137323.112

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*, 3(3), e85. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085

Bullen, A.L., Fregoso-Leyva, A., Katz, R., Long, D.L., Cheung, K.L., Judd, S.E., Gutiérrez, O.M., Ix, J.H., Cushman, M., & Rifkin, D.E. (2024). Pro-Neurotensin/Neuromedin N and Risk of Incident Chronic Kidney Disease and Other Kidney Outcomes in Community-Living Individuals: *The REGARDS Study*. *Kidney Medicine*.

Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 7(4), 147–154. https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3

Camkurt, M. A., Karababa, F., Erdal, M. E., Bayazıt, H., Kandemir, S. B., Ay, M. E., Kandemir, H., Ay, Ö. İ., Çiçek, E., Selek, S., & Taşdelen, B. (2016). Investigation of Dysregulation of Several MicroRNAs in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 14(3), 256–260. https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.3.256

Castellani, C. A., Laufer, B. I., Melka, M. G., Diehl, E. J., O'Reilly, R. L., & Singh, S. M. (2015). DNA methylation differences in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia identifies psychosis related genes and networks. *BMC medical genomics*, 8, 17. https://doi.org/10.1186/s12920-015-0093-1

Chang, K., Jian, X., Wu, C., Gao, C., Li, Y., Chen, J., Xue, B., Ding, Y., Peng, L., Wang, B., He, L., Xu, Y., Li, C., Li, X., Wang, Z., Zhao, X., Pan, D., Yang, Q., Zhou, J., Zhu, Z., … Li, Z. (2024). The Contribution of Mosaic Chromosomal Alterations to Schizophrenia. *Biological psychiatry*, S0006-3223(24)01419-7. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.06.015

Chen, Q., Li, D., Jin, W., Shi, Y., Li, Z., Ma, P., Sun, J., Chen, S., Li, P., & Lin, P. (2021). Research Progress on the Correlation Between Epigenetics and Schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*, 15, 688727. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.688727

Chen, X. Y., Du, Y. F., & Chen, L. (2019). Neuropeptides Exert Neuroprotective Effects in Alzheimer's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 493. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00493

Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research*, 48(D1), D127–D131. https://doi.org/10.1093/nar/gkz757

Christou, N., Blondy, S., David, V., Verdier, M., Lalloué, F., Jauberteau, M. O., Mathonnet, M., & Perraud, A. (2020). Neurotensin pathway in digestive cancers and clinical applications: an overview. *Cell death & disease*, 11(12), 1027. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03245-8

Correll, C. U., Solmi, M., Croatto, G., Schneider, L. K., Rohani-Montez, S. C., Fairley, L., Smith, N., Bitter, I., Gorwood, P., Taipale, H., & Tiihonen, J. (2022). Mortality in people with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of relative risk and aggravating or attenuating factors. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association* (WPA), 21(2), 248–271. https://doi.org/10.1002/wps.20994

Dao, T., Salahuddin, S., Charfi, C., Sicard, A. A., Jenabian, M. A., & Annabi, B. (2020). Pharmacological targeting of neurotensin response by diet-derived EGCG in macrophage-differentiated HL-60 promyelocytic leukemia cells. *PharmaNutrition*, 12, 100191.

Dempster, E. L., Pidsley, R., Schalkwyk, L. C., Owens, S., Georgiades, A., Kane, F., Kalidindi, S., Picchioni, M., Kravariti, E., Toulopoulou, T., Murray, R. M., & Mill, J. (2011). Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Human molecular genetics*, 20(24), 4786–4796. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr416

Dong, M., Wang, S. B., Wang, F., Zhang, L., Ungvari, G. S., Ng, C. H., Meng, X., Yuan, Z., Wang, G., & Xiang, Y. T. (2019). Suicide-related behaviours in schizophrenia in China: a comprehensive meta-analysis. *Epidemiology and psychiatric sciences*, 28(3), 290–299. https://doi.org/10.1017/S2045796017000476

Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A. G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behavior research methods*, 41(4), 1149–1160. https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149

Fišar Z. (2023). Biological hypotheses, risk factors, and biomarkers of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 120, 110626. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110626

Fisher, H. L., Murphy, T. M., Arseneault, L., Caspi, A., Moffitt, T. E., Viana, J., Hannon, E., Pidsley, R., Burrage, J., Dempster, E. L., Wong, C. C., Pariante, C. M., & Mill, J. (2015). Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for childhood psychotic symptoms. *Epigenetics*, 10(11), 1014–1023. https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1099797

Flores-Muñoz, C., Gómez, B., Mery, E., Mujica, P., Gajardo, I., Córdova, C., Lopez-Espíndola, D., Durán-Aniotz, C., Hetz, C., Muñoz, P., Gonzalez-Jamett, A. M., & Ardiles, Á. O. (2020). Acute Pannexin 1 Blockade Mitigates Early Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 46. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00046

Fu, W., Yang, Y., Zhang, Z., So, J., Roh, H. C., Liu, T., ... & Li, J. (2024). *Neurotensin-Neurotensin Receptor 2 signaling in adipocytes regulates food intake through ceramide metabolism*. bioRxiv, 2024-02.

Gahete, M. D., Rubio, A., Córdoba-Chacón, J., Gracia-Navarro, F., Kineman, R. D., Avila, J., Luque, R. M., & Castaño, J. P. (2010). Expression of the ghrelin and neurotensin systems

is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD, 22(3), 819–828. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100873

GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* (London, England), 396(10258), 1204–1222. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9

Gereau, G. B., Garrison, S. D., & McElligott, Z. A. (2023). Neurotensin and energy balance. *Journal of neurochemistry*, 166(2), 189–200. https://doi.org/10.1111/jnc.15868

Goldie, B. J., Dun, M. D., Lin, M., Smith, N. D., Verrills, N. M., Dayas, C. V., & Cairns, M. J. (2014). Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic acids research*, 42(14), 9195–9208. https://doi.org/10.1093/nar/gku594

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H. M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., & Guo, A. Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Human mutation*, 33(1), 254–263. https://doi.org/10.1002/humu.21641

Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*, 27(1), 91–105. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017

Grinevich, V. P., Zakirov, A. N., Berseneva, U. V., Gerasimova, E. V., Gainetdinov, R. R., & Budygin, E. A. (2022). Applying a Fast-Scan Cyclic Voltammetry to Explore Dopamine Dynamics in Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Cells*, 11(9), 1533. https://doi.org/10.3390/cells11091533

GTEx Consortium (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature genetics*, 45(6), 580–585. https://doi.org/10.1038/ng.2653

Guan, F., Ni, T., Zhu, W., Williams, L. K., Cui, L. B., Li, M., Tubbs, J., Sham, P. C., & Gui, H. (2022). Integrative omics of schizophrenia: from genetic determinants to clinical classification and risk prediction. *Molecular psychiatry*, 27(1), 113–126. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01201-2

Guedes, V. A., Lai, C., Devoto, C., Edwards, K. A., Mithani, S., Sass, D., Vorn, R., Qu, B. X., Rusch, H. L., Martin, C. A., Walker, W. C., Wilde, E. A., Diaz-Arrastia, R., Gill, J. M., & Kenney, K. (2021). Extracellular Vesicle Proteins and MicroRNAs Are Linked to Chronic Post-Traumatic Stress Disorder Symptoms in Service Members and Veterans With Mild Traumatic Brain Injury. *Frontiers in pharmacology*, 12, 745348. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.745348

Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. J. G. B. B. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.

Han, S., Li, Y., & Gao, J. (2024). Peripheral blood MicroRNAs as biomarkers of schizophrenia: expectations from a meta-analysis that combines deep learning methods. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 25(1), 65–81. https://doi.org/10.1080/15622975.2023.2258975

Hendriksen, E., van Bergeijk, D., Oosting, R. S., & Redegeld, F. A. (2017). Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 79, 119–133. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.001

Hidese, S., Yoshida, F., Ishida, I., Matsuo, J., Hattori, K., & Kunugi, H. (2023). Plasma neuropeptide levels in patients with schizophrenia, bipolar disorder, or major depressive

disorder and healthy controls: A multiplex immunoassay study. *Neuropsychopharmacology reports*, 43(1), 57–68. https://doi.org/10.1002/npr2.12304

Howes, O. D., Bukala, B. R., & Beck, K. (2024). Schizophrenia: from neurochemistry to circuits, symptoms and treatments. *Nature reviews. Neurology*, 20(1), 22–35. https://doi.org/10.1038/s41582-023-00904-0

Hu, Z., & Bruno, A. E. (2011). The Influence of 3'UTRs on MicroRNA Function Inferred from Human SNP Data. *Comparative and functional genomics*, 2011, 910769. https://doi.org/10.1155/2011/910769

Huang, F., Long, Z., Chen, Z., Li, J., Hu, Z., Qiu, R., Zhuang, W., Tang, B., Xia, K., & Jiang, H. (2015). Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. *PloS one*, 10(6), e0129052. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129052

Hussain, M. S., Siddiqui, S. A., Mondal, S., Millat, M. S., Marzan, S., Uddin, M. G., Aziz, M. A., Alam, M. F., & Islam, M. S. (2020). Association of DRD2 gene polymorphisms with schizophrenia in the young Bangladeshi population: A pilot study. *Heliyon*, 6(10), e05125. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05125

Januzzi, J. L., Jr, Lyass, A., Liu, Y., Gaggin, H., Trebnick, A., Maisel, A. S., D'Agostino, R. B., Sr, Wang, T. J., Massaro, J., & Vasan, R. S. (2016). Circulating Proneurotensin Concentrations and Cardiovascular Disease Events in the Community: The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 36(8), 1692–1697. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307847

Jönsson, E. G., Sillén, A., Vares, M., Ekholm, B., Terenius, L., & Sedvall, G. C. (2003). Dopamine D2 receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 119B(1), 28–34. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20004

Kato, H., Kimura, H., Kushima, I., Takahashi, N., Aleksic, B., & Ozaki, N. (2023). The genetic architecture of schizophrenia: review of large-scale genetic studies. *Journal of human genetics*, 68(3), 175–182. https://doi.org/10.1038/s10038-022-01059-4

Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., & Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature genetics*, 39(10), 1278–1284. https://doi.org/10.1038/ng2135

Keszler, G., Vékony, B., Elek, Z., Nemoda, Z., Angyal, N., Bánlaki, Z., Kovács-Nagy, R., Rónai, Z., & Réthelyi, J. M. (2024). MicroRNA-Mediated Suppression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Expression Is Modulated by a Schizophrenia-Associated Non-Coding Polymorphism. *International journal of molecular sciences*, 25(8), 4477. https://doi.org/10.3390/ijms25084477

Khani-Habibabadi, F., Askari, S., Zahiri, J., Javan, M., & Behmanesh, M. (2019). Novel BDNF-regulatory microRNAs in neurodegenerative disorders pathogenesis: An in silico study. *Computational biology and chemistry*, 83, 107153. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.107153

Kichukova, T. M., Popov, N. T., Ivanov, I. S., & Vachev, T. I. (2017). Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. *Folia medica*, 59(1), 43–52. https://doi.org/10.1515/folmed-2017-0009

Kitts, A., & Sherry, S. (2002). Chapter 5 the single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation. *The NCBI Handbook* [Internet].

Kozyrev, E. A., Ermakov, E. A., Boiko, A. S., Mednova, I. A., Kornetova, E. G., Bokhan, N. A., & Ivanova, S. A. (2023). Building Predictive Models for Schizophrenia Diagnosis with Peripheral Inflammatory Biomarkers. *Biomedicines*, 11(7), 1990. https://doi.org/10.3390/biomedicines11071990

Kulminski, A. M., Loika, Y., Huang, J., Arbeev, K. G., Bagley, O., Ukraintseva, S., Yashin, A. I., & Culminskaya, I. (2019). Pleiotropic Meta-Analysis of Age-Related Phenotypes Addressing Evolutionary Uncertainty in Their Molecular Mechanisms. *Frontiers in genetics*, 10, 433. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00433

Kyriatzis, G., Khrestchatisky, M., Ferhat, L., & Chatzaki, E. A. (2024). Neurotensin and Neurotensin Receptors in Stress-related Disorders: Pathophysiology & Novel Drug Targets. *Current neuropharmacology*, 22(5), 916–934. https://doi.org/10.2174/1570159X21666230803101629

Li, J., Yang, L., Song, J., Yan, B., Morris, A. J., Moseley, H., Flight, R., Wang, C., Liu, J., Weiss, H. L., Morris, E. F., Abdelhamid, I., Gerl, M. J., Melander, O., Smyth, S., & Evers, B. M. (2024). Neurotensin accelerates atherosclerosis and increases circulating levels of short-chain and saturated triglycerides. *Atherosclerosis*, 392, 117479. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2024.117479

Li, M., Xiao, L., & Chen, X. (2022a). Histone Acetylation and Methylation Underlie Oligodendroglial and Myelin Susceptibility in Schizophrenia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 16, 823708. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.823708

Li, Y., Meng, S., Di, W., Xia, M., Dong, L., Zhao, Y., Ling, S., He, J., Xue, X., Chen, X., & Liu, C. (2022b). Amyloid-β protein and MicroRNA-384 in NCAM-Labeled exosomes from peripheral blood are potential diagnostic markers for Alzheimer's disease. *CNS neuroscience & therapeutics*, 28(7), 1093–1107. https://doi.org/10.1111/cns.13846

Lim, M., Carollo, A., Neoh, M. J. Y., & Esposito, G. (2022). Mapping miRNA Research in Schizophrenia: A Scientometric Review. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 436. https://doi.org/10.3390/ijms24010436

Lim, Y., Beane-Ebel, J. E., Tanaka, Y., Ning, B., Husted, C. R., Henderson, D. C., Xiang, Y., Park, I. H., Farrer, L. A., & Zhang, H. (2021). Exploration of alcohol use disorder-associated brain miRNA-mRNA regulatory networks. *Translational psychiatry*, 11(1), 504. https://doi.org/10.1038/s41398-021-01635-w

Liu, C. J., Fu, X., Xia, M., Zhang, Q., Gu, Z., & Guo, A. Y. (2021). miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets. *Nucleic acids research*, 49(D1), D1276–D1281. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa783

Lobentanzer, S., Hanin, G., Klein, J., & Soreq, H. (2019). Integrative Transcriptomics Reveals Sexually Dimorphic Control of the Cholinergic/Neurokine Interface in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Cell reports*, 29(3), 764–777.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.017

Lu, H., Ma, L., Quan, C., Li, L., Lu, Y., Zhou, G., & Zhang, C. (2023). RegVar: Tissue-specific Prioritization of Non-coding Regulatory Variants. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 21(2), 385–395. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.011

Lu, L., Dong, M., Zhang, L., Zhu, X. M., Ungvari, G. S., Ng, C. H., Wang, G., & Xiang, Y. T. (2019). Prevalence of suicide attempts in individuals with schizophrenia: a meta-analysis of observational studies. *Epidemiology and psychiatric sciences*, 29, e39. https://doi.org/10.1017/S2045796019000313

Lubotzky, A., Pelov, I., Teplitz, R., Neiman, D., Smadja, A., Zemmour, H., Piyanzin, S., Ochana, B. L., Spalding, K. L., Glaser, B., Shemer, R., Dor, Y., & Kohn, Y. (2022). Elevated brain-derived cell-free DNA among patients with first psychotic episode - a proof-of-concept study. *eLife*, 11, e76391. https://doi.org/10.7554/eLife.76391

Ľupták, M., Michaličková, D., Fišar, Z., Kitzlerová, E., & Hroudová, J. (2021). Novel approaches in schizophrenia-from risk factors and hypotheses to novel drug targets. *World journal of psychiatry*, 11(7), 277–296. https://doi.org/10.5498/wjp.v11.i7.277

Manikandan, M., & Munirajan, A. K. (2014). Single nucleotide polymorphisms in microRNA binding sites of oncogenes: implications in cancer and pharmacogenomics. *Omics : a journal of integrative biology*, 18(2), 142–154. https://doi.org/10.1089/omi.2013.0098

Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA biology*, 9(5), 563–576. https://doi.org/10.4161/rna.20231

Maxwell, A. M., & Rao, R. B. (2022). Perinatal iron deficiency as an early risk factor for schizophrenia. *Nutritional neuroscience*, 25(10), 2218–2227. https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1943996

Mayr C. (2019). What Are 3' UTRs Doing?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(10), a034728. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728

McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science* (New York, N.Y.), 366(6472), eaav1741. https://doi.org/10.1126/science.aav1741

Mishra, P. J., & Bertino, J. R. (2009). MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*, 10(3), 399–416. https://doi.org/10.2217/14622416.10.3.399

Mishra, P. J., Humeniuk, R., Mishra, P. J., Longo-Sorbello, G. S., Banerjee, D., & Bertino, J. R. (2007). A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13513–13518. https://doi.org/10.1073/pnas.0706217104

Mohamed, F. A., & Freude, K. (2024). Implications of SNP-triggered miRNA dysregulation in Schizophrenia development. *Frontiers in genetics*, 15, 1321232. https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1321232

Mu, C., Dang, X., & Luo, X. J. (2023). Mendelian randomization reveals the causal links between microRNA and schizophrenia. *Journal of psychiatric research*, 163, 372–377. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.05.071

Nikolaou, S., Qiu, S., Fiorentino, F., Simillis, C., Rasheed, S., Tekkis, P., & Kontovounisios, C. (2020). The role of Neurotensin and its receptors in non-gastrointestinal cancers: a review. *Cell communication and signaling : CCS*, 18(1), 68. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00569-y

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402

Owen, M. J., Legge, S. E., Rees, E., Walters, J. T. R., & O'Donovan, M. C. (2023). Genomic findings in schizophrenia and their implications. *Molecular psychiatry*, 28(9), 3638–3647. https://doi.org/10.1038/s41380-023-02293-8

Pardiñas, A. F., Holmans, P., Pocklington, A. J., Escott-Price, V., Ripke, S., Carrera, N., Legge, S. E., Bishop, S., Cameron, D., Hamshere, M. L., Han, J., Hubbard, L., Lynham, A.,

Mantripragada, K., Rees, E., MacCabe, J. H., McCarroll, S. A., Baune, B. T., Breen, G., Byrne, E. M., … Walters, J. T. R. (2018). Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nature genetics*, 50(3), 381–389. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0059-2

Peedicayil J. (2023). Genome-Environment Interactions and Psychiatric Disorders. *Biomedicines*, 11(4), 1209. https://doi.org/10.3390/biomedicines11041209

Peng, Q., Dai, Z., Yin, J., Lv, D., Luo, X., Xiong, S., Yang, Z., Chen, G., Wei, Y., Wang, Y., Zhang, D., Wang, L., Yu, D., Zhao, Y., Lin, D., Liao, Z., Zhong, Y., Lin, Z., & Lin, J. (2023). Schizophrenia plausible protective effect of microRNA-137 is potentially related to estrogen and prolactin in female patients. *Frontiers in psychiatry*, 14, 1187111. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1187111

Piñero, J., Bravo, À., Queralt-Rosinach, N., Gutiérrez-Sacristán, A., Deu-Pons, J., Centeno, E., García-García, J., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2017). DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic acids research*, 45(D1), D833–D839. https://doi.org/10.1093/nar/gkw943

Podvin, S., Jones, J., Kang, A., Goodman, R., Reed, P., Lietz, C. B., Then, J., Lee, K. C., Eyler, L. T., Jeste, D. V., Gage, F. H., & Hook, V. (2024). Human iN neuronal model of schizophrenia displays dysregulation of chromogranin B and related neuropeptide transmitter signatures. *Molecular psychiatry*, 10.1038/s41380-024-02422-x. Advance online publication. https://doi.org/10.1038/s41380-024-02422-x

Richetto, J., & Meyer, U. (2021). Epigenetic Modifications in Schizophrenia and Related Disorders: Molecular Scars of Environmental Exposures and Source of Phenotypic Variability. *Biological psychiatry*, 89(3), 215–226. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.008

Rodríguez, F. D., Sánchez, M. L., & Coveñas, R. (2023). Neurotensin and Alcohol Use Disorders: Towards a Pharmacological Treatment. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 8656. https://doi.org/10.3390/ijms24108656

Romo, L., Findlay, S. D., & Burge, C. B. (2023). *Regulatory features aid interpretation of 3'UTR Variants*. bioRxiv : the preprint server for biology, 2023.08.01.551549. https://doi.org/10.1101/2023.08.01.551549

Roy, B., Yoshino, Y., Allen, L., Prall, K., Schell, G., & Dwivedi, Y. (2020). Exploiting Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Psychiatric Disorders. *Molecular diagnosis & therapy*, 24(3), 279–298. https://doi.org/10.1007/s40291-020-00464-9

Saad, A. K., Akour, A., Mahboob, A., AbuRuz, S., & Sadek, B. (2022). Role of Brain Modulators in Neurodevelopment: Focus on Autism Spectrum Disorder and Associated Comorbidities. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 15(5), 612. https://doi.org/10.3390/ph15050612

Sánchez-Florentino, Z. A., Romero-Martínez, B. S., Flores-Soto, E., Serrano, H., Montaño, L. M., Valdés-Tovar, M., Calixto, E., Aquino-Gálvez, A., López-Riquelme, G. O., Alvarado, R., Argueta, J., Solís-Chagoyán, H., & Sommer, B. (2024). Potential of olfactory neuroepithelial cells as a model to study schizophrenia: A focus on GPCRs (Review). *International journal of molecular medicine*, 53(1), 7. https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5331

Sentinelli, F., Barchetta, I., Cimini, F. A., Dule, S., Bailetti, D., Cossu, E., Barbonetti, A., Totaro, M., Melander, O., Cavallo, M. G., & Baroni, M. G. (2023). Neurotensin Gene rs2234762 C>G Variant Associates with Reduced Circulating Pro-NT Levels and

Predicts Lower Insulin Resistance in Overweight/Obese Children. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6460. https://doi.org/10.3390/ijms24076460

Shrestha, K., Al-Alem, L., Garcia, P., Wynn, M. A. A., Hannon, P. R., Jo, M., Drnevich, J., Duffy, D. M., & Curry, T. E., Jr (2023). Neurotensin expression, regulation, and function during the ovulatory period in the mouse ovary†. *Biology of reproduction*, 108(1), 107–120. https://doi.org/10.1093/biolre/ioac191

Smalheiser, N. R., Lugli, G., Zhang, H., Rizavi, H., Cook, E. H., & Dwivedi, Y. (2014). Expression of microRNAs and other small RNAs in prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and depressed subjects. *PloS one*, 9(1), e86469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086469

Solmi, M., Seitidis, G., Mavridis, D., Correll, C. U., Dragioti, E., Guimond, S., Tuominen, L., Dargél, A., Carvalho, A. F., Fornaro, M., Maes, M., Monaco, F., Song, M., Il Shin, J., & Cortese, S. (2023). Incidence, prevalence, and global burden of schizophrenia - data, with critical appraisal, from the Global Burden of Disease (GBD) 2019. *Molecular psychiatry*, 10.1038/s41380-023-02138-4. Advance online publication. https://doi.org/10.1038/s41380-023-02138-4

Srivastava, A., Dada, O., Qian, J., Al-Chalabi, N., Fatemi, A. B., Gerretsen, P., Graff, A., & De Luca, V. (2021). Epigenetics of Schizophrenia. *Psychiatry research*, 305, 114218. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.114218

Stilo, S. A., & Murray, R. M. (2019). Non-Genetic Factors in Schizophrenia. *Current psychiatry reports*, 21(10), 100. https://doi.org/10.1007/s11920-019-1091-3

Su, A. X., Ma, Z. J., Li, Z. Y., Li, X. Y., Xia, L., Ge, Y. J., & Chen, G. H. (2024). Serum levels of neurotensin, pannexin-1, and sestrin-2 and the correlations with sleep quality or/and cognitive function in the patients with chronic insomnia disorder. *Frontiers in psychiatry*, 15, 1360305. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2024.1360305

Sun, W., Jin, T., Yang, H., Li, J., Tian, Q., Gao, J., Peng, R., Zhang, G., & Zhang, X. (2024). Alterations of serum neuropeptide levels and their relationship to cognitive impairment and psychopathology in male patients with chronic schizophrenia. *Schizophrenia* (Heidelberg, Germany), 10(1), 3. https://doi.org/10.1038/s41537-023-00425-1

Teplyashina, E. A., Olovyannikova, R. Y., Kharitonova, E. V., Lopatina, O. L., Kutyakov, V. A., Pashchenko, S. I., ... & Salmina, A. B. (2020). Neuropeptides in the regulation of brain activity in normal and neurodegeneration. *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 23(8), 3-10.

Thomas, K. T., & Zakharenko, S. S. (2021). MicroRNAs in the Onset of Schizophrenia. *Cells*, 10(10), 2679. https://doi.org/10.3390/cells10102679

Toledo-Stuardo, K., Ribeiro, C. H., Campos, I., Tello, S., Latorre, Y., Altamirano, C., Dubois-Camacho, K., & Molina, M. C. (2023). Impact of MICA 3'UTR allelic variability on miRNA binding prediction, a bioinformatic approach. *Frontiers in genetics*, 14, 1273296. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1273296

Torruella-Suárez, M. L., & McElligott, Z. A. (2020). Neurotensin in reward processes. *Neuropharmacology*, 167, 108005. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108005

Treves D. S. (2010). Review of three DNA analysis applications for use in the microbiology or genetics classroom. *Journal of microbiology & biology education*, 11(2), 186–187. https://doi.org/10.1128/jmbe.v11i2.205

Trubetskoy, V., Pardiñas, A. F., Qi, T., Panagiotaropoulou, G., Awasthi, S., Bigdeli, T. B., Bryois, J., Chen, C. Y., Dennison, C. A., Hall, L. S., Lam, M., Watanabe, K., Frei, O., Ge, T., Harwood, J. C., Koopmans, F., Magnusson, S., Richards, A. L., Sidorenko, J.,

Wu, Y., … Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2022). Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604(7906), 502–508. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5

Velligan, D. I., & Rao, S. (2023). The Epidemiology and Global Burden of Schizophrenia. *The Journal of clinical psychiatry*, 84(1), MS21078COM5. https://doi.org/10.4088/JCP.MS21078COM5

Wang X. (2014). Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(10), 1377–1383. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu045

Wang, Y., Amdanee, N., & Zhang, X. (2022). Exosomes in schizophrenia: Pathophysiological mechanisms, biomarkers, and therapeutic targets. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*, 65(1), e61. https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2022.2319

Wawrzczak-Bargieła, A., Bilecki, W., & Maćkowiak, M. (2023). Epigenetic Targets in Schizophrenia Development and Therapy. *Brain sciences*, 13(3), 426. https://doi.org/10.3390/brainsci13030426

Wei, R., Yang, F., Urban, T. J., Li, L., Chalasani, N., Flockhart, D. A., & Liu, W. (2012). Impact of the Interaction between 3'-UTR SNPs and microRNA on the Expression of Human Xenobiotic Metabolism Enzyme and Transporter Genes. *Frontiers in genetics*, 3, 248. https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00248

Werner, F. M., & Coveñas, R. (2021). Risk Genes in Schizophrenia and Their Importance in Choosing the Appropriate Antipsychotic Treatment. *Current pharmaceutical design*, 27(30), 3281–3292. https://doi.org/10.2174/1381612827666210215151333

Wölk, E., Stengel, A., Schaper, S. J., Rose, M., & Hofmann, T. (2021). Neurotensin and Xenin Show Positive Correlations With Perceived Stress, Anxiety, Depressiveness and Eating Disorder Symptoms in Female Obese Patients. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 15, 629729. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.629729

Xie, M., Zhang, Y., Yan, L., Jin, M., Lu, X., & Yu, Q. (2024). Peripheral Blood Non-Coding RNA as Biomarker for Schizophrenia: A Review. *Journal of integrative neuroscience*, 23(2), 42. https://doi.org/10.31083/j.jin2302042

Yang, J., Long, Q., Zhang, Y., Liu, Y., Wu, J., Zhao, X., You, X., Li, X., Liu, J., Teng, Z., Zeng, Y., & Luo, X. J. (2023). Whole transcriptome analysis reveals dysregulation of molecular networks in schizophrenia. *Asian journal of psychiatry*, 85, 103649. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2023.103649

Ying, S., Heung, T., Zhang, Z., Yuen, R. K. C., & Bassett, A. S. (2022). Schizophrenia Risk Mediated by microRNA Target Genes Overlapped by Genome-Wide Rare Copy Number Variation in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Frontiers in genetics*, 13, 812183. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.812183

Yoshino, Y., Roy, B., & Dwivedi, Y. (2020). Altered miRNA landscape of the anterior cingulate cortex is associated with potential loss of key neuronal functions in depressed brain. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 40, 70–84. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.06.004

Yoshino, Y., Roy, B., & Dwivedi, Y. (2021). Differential and unique patterns of synaptic miRNA expression in dorsolateral prefrontal cortex of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 46(5), 900–910. https://doi.org/10.1038/s41386-020-00861-y

Yu, H., Ni, P., Zhao, L., Tian, Y., Li, M., Li, X., Wei, W., Wei, J., Deng, W., Du, X., Wang, Q., Guo, W., Ma, X., Coid, J., & Li, T. (2023). Decreased plasma neuropeptides in first-episode schizophrenia, bipolar disorder, major depressive disorder: associations with clinical symptoms and cognitive function. *Frontiers in psychiatry*, 14, 1180720. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1180720

Zhang, H. C., Du, Y., Chen, L., Yuan, Z. Q., & Cheng, Y. (2023). MicroRNA schizophrenia: Etiology, biomarkers and therapeutic targets. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 146, 105064. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105064

Zhang, H., Khan, A., Kushner, S. A., & Rzhetsky, A. (2022a). Dissecting schizophrenia phenotypic variation: the contribution of genetic variation, environmental exposures, and gene-environment interactions. *Schizophrenia* (Heidelberg, Germany), 8(1), 51. https://doi.org/10.1038/s41537-022-00257-5

Zhang, R., Sjölander, A., Ploner, A., Lu, D., Bulik, C. M., & Bergen, S. E. (2022b). Novel disease associations with schizophrenia genetic risk revealed in ~400,000 UK Biobank participants. *Molecular psychiatry*, 27(3), 1448–1454. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01387-5

Zhang, Y., Fu, B., & Zhang, X. (2012, June). DNA cryptography based on DNA Fragment assembly. *In 2012 8th International Conference on Information Science and Digital Content Technology* (ICIDT2012) (Vol. 1, pp. 179-182). IEEE.

Zhao, X., Ren, Y., Cui, N., Wang, X., & Cui, Y. (2018). Identification of key microRNAs and their targets in exosomes of pancreatic cancer using bioinformatics analysis. *Medicine*, 97(39), e12632. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012632

Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Tsuchihashi, T., McManus, M. T., Schwartz, R. J., & Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129(2), 303–317. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.030

Zheng, Y., Zhang, L., Xie, J., & Shi, L. (2021). The Emerging Role of Neuropeptides in Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 646726. https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646726

Zoupa, E., Bogiatzidou, O., Siokas, V., Liampas, I., Tzeferakos, G., Mavreas, V., Stylianidis, S., & Dardiotis, E. (2022). Cognitive Rehabilitation in Schizophrenia-Associated Cognitive Impairment: A Review. *Neurology international*, 15(1), 12–23. https://doi.org/10.3390/neurolint15010002