



ARAŞTIRMA / RESEARCH

## Şizofreni hastalarında CYB mtDNA mutasyonları ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon durumu

CYB mtDNA mutations and expression status of genes in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in patients with schizophrenia

Ebubekir Dirican<sup>1</sup>, Sevgi Karabulut Uzunçakmak<sup>1</sup>, Halil Özcan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Bayburt, Turkey

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Erzurum, Turkey

Cukurova Medical Journal 2022;47(4):1695-1708

### Abstract

**Purpose:** This study aimed to screen for cytochrome b (CYB) mitochondrial DNA (mtDNA) mutations and analyze the mRNA expressions of genes in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in patients with schizophrenia.

**Materials and Methods:** In this study, whole blood was obtained from 44 schizophrenic patients and 41 healthy individuals for DNA (patients) and RNA (patients and control) isolation. Samples for CYB mtDNA mutations were amplified by PCR and identified by Sanger DNA sequencing. RT-PCR and 2- $\Delta\Delta C_t$  method was used for mRNA expression of PIK3CA, AKT1, and mTOR genes.

**Results:** In schizophrenia patients, m.15326 A>G (43/44), m.15452 C>A (5/44), m.15078 A>G (3/44), m.14872 C>T (3/44) and m.14798 T>C (3/44) was the most common CYB mtDNA mutations. *In silico* analysis showed that some of the mutations were associated with the harmful, disease-causing or benign character. The mRNA expression of the PIK3CA, AKT1, and mTOR genes in schizophrenia patients was significantly higher than in healthy individuals. There was a significant moderate positive correlation between the PIK3CA and AKT1 genes. In addition, by ROC analysis, PIK3CA, AKT1 and mTOR genes were found to have good diagnostic power in the patient group. ROC analyzes showed that PIK3CA in particular has significant diagnostic value for schizophrenia patients with 80% sensitivity and 63.4% specificity.

**Conclusion:** Both of CYB mtDNA mutations frequency and PIK3CA, AKT1 and mTOR mRNA expression were higher in schizophrenic patients compared to healthy individuals. We believe that studying these mechanisms in

### Öz

**Amaç:** Bu çalışma, şizofreni hastalarında sitokrom b (CYB) mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonlarını taramayı ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki genlerin mRNA ifadelerini analiz etmeyi amaçlamıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada 44 şizofreni hastasından ve 41 sağlıklı bireyden DNA (hasta) ve RNA (hasta ve kontrol) izolasyonu için tam kan alındı. CYB mtDNA mutasyonları için örnekler PCR ile amplifiye edildi ve Sanger DNA dizi analiziyle tanımlandı. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyonu için RT-PCR ve 2- $\Delta\Delta C_t$  metodu kullanıldı.

**Bulgular:** Şizofreni hastalarında m.15326 A>G (43/44), m.15452 C>A (5/44), m.15078 A>G (3/44), m.14872 C>T (3/44) ve m.14798 T>C (3/44) en sık rastalanan CYB mtDNA mutasyonlarıydı. *In silico* analizler, mutasyonların bir kısmının zararlı, hastalık yapıcı veya benign karakterle ilişkili olduğunu gösterdi. Şizofreni hastalarında PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyonu sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksekti. PIK3CA ve AKT1 genleri arasında anlamlı orta şiddette pozitif bir korelasyon tespit edildi. Ayrıca ROC analizi ile PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin hasta grubunda iyi tanısal güce sahip olduğu belirlendi. ROC analizleri, özellikle PIK3CA'nın şizofreni hastaları için % 80 duyarlılık ve % 63,4 seçicilik ile önemli bir tanı değerine sahip olduğunu gösterdi.

**Sonuç:** Şizofreni hastalarında hem CYB mtDNA mutasyon sıklığı hem de PIK3CA, AKT1 ve mTOR mRNA ekspresyon düzeyi sağlıklı bireylere göre daha yüksekti. Bu mekanizmaları daha geniş şizofreni popülasyonunda çalışmanın hastalığın tanı, tedavi veya prognozunda değerli olabileceğine inanıyoruz.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Ebubekir Dirican, Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Bayburt, Turkey E-Mail: dr.diricanebubekir@gmail.com, ebubekirdirican@bayburt.edu.tr  
Geliş tarihi/Received: 08.10.2022 Kabul tarihi/Accepted: 10.12.2022

the larger schizophrenia population may be valuable in the diagnosis, treatment, or prognosis of the disease.

**Keywords:** Schizophrenia, mtDNA, CYB, PI3K, AKT, mTOR

**Anahtar kelimeler:** Şizofreni, mtDNA, CYB, PI3K, AKT, mTOR

## GİRİŞ

Şizofreni, dünya çapında birçok insanı etkileyen kronik bir psikiyatrik bozukluktur<sup>1</sup>. Çok faktörlü bir nöropsikiyatrik bozukluk olan şizofreni hastalığı, antipsikotiklerle tedavi edilir ve prognozu genellikle kötü seyredir<sup>2</sup>. Şizofreni hastalığına sıklıkla sosyal bilişsel bozukluklar da eşlik eder<sup>3</sup>. Özellikle objektif testlerin olmaması nedeniyle, şizofreni için doğru tanı ve etkili tedavilerin seçiminde zorluklar yaşanmaya devam etmektedir. Şizofreni hastalığı için biyobelirteç araştırılmasında çok sayıda teknoloji kullanılmıştır<sup>4</sup>. Şizofreni hastalarının en azından bir alt grubunda nöroinflamatuvar süreçlerin şizofreni patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir<sup>4</sup>. Hastalığa ait çok fazla moleküler değişim söz konusudur, dolayısıyla hastalığa ait moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının şizofreni hastalığının tanı ve tedavisinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

mtDNA varyasyonları, şizofreni hastalığında glial hücre sağkalımı için önemli etkileri olan oksidatif fosforilasyon sistemi (OXPHOS), kalsiyum tamponlama ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde değişikliklere neden olabilir<sup>1</sup>. Mitokondriyal morfometri, beyin enerji metabolizması ve mitokondriyal solunum zincirindeki enzimatik aktivitedeki değişiklikler, şizofrenide mtDNA'nın genetik özellikleriyle ilişkili olabilecek mitokondriyal bir işlev bozukluğu olduğunu düşündürür<sup>5</sup>. Şizofreni, bir genetik arka plana sahip olduğu düşünülen karmaşık bir hastalıktır. mtDNA'daki genetik değişikliklere bağlı olarak bozulmuş mitokondriyal fonksiyonun, zihinsel bozukluklar da dahil olmak üzere nörolojik durumlara etkide bulunabileceği varsayılmıştır<sup>6</sup>. Fakat şizofreni hastalığında mitokondriyal patolojinin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır<sup>7</sup>.

Cantley ve arkadaşları 1988'de, fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) fosforilasyonunu katalize eden ajanı tanımladı ve bu enzimi fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)<sup>8</sup> olarak adlandırdı ve ardından insülin sinyalinin PI3K aktivitesini düzenlediği gösterildi<sup>9</sup>. PI3K'lar memelilerde üç sınıfa (I, II ve III) ayrılan lipid kinazlardır<sup>10</sup>. PI3K'lar fizyolojik rolleri ve patogenezdeki fonksiyonları sebebiyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir<sup>11</sup>. Sınıf I PI3K, protein kinaz B

(PKB/AKT) ve rapamisin (mTOR) yolunun mekanik hedefi (PAM yolu), insan kanserlerinde sıklıkla anormal aktivasyon gösterir ve hücrenin hayatta kalması, besin alımı, hücre çoğalması, büyüme, otofaji, apoptoz ve göç dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevleri düzenler<sup>12-14</sup>. Psikiyatrik hastalıkların patogenezinde, PI3K/AKT/mTOR ekseninin düzensizliğini işaret eden bazı kanıtlar olmasına rağmen, bunun gelişimsel ve/veya sinyal kusurlarının bir sonucu olup olmadığı açık değildir. PI3K/AKT/mTOR inhibisyonu ve GSK3'ün aktivasyon azalmasının nöronal hücre sağkalımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir<sup>15,16</sup>. PI3K/AKT/mTOR kritik işlevlerinin ışığında, bu sinyal yolağındaki anormallikler ve düzensizlikler megalensefali, mikrosefali, otizm spektrum bozuklukları, zihinsel engellilik, epilepsi ve şizofreni gibi çeşitli nörogelişimsel hastalıkların temel nedeni olarak kabul edilmiştir<sup>17</sup>.

Biz de yukarıdaki bilgiler ışığında, CYB mtDNA mutasyonlarının şizofreni hastalarındaki sıklığı nedir ve bu gendeki mutasyonu taşıyan hastalarla taşımayanlarda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki genlerin mRNA ekspresyonu arasında fark var mı bu durumu araştırmak ve ilk kez açığa çıkarmak istedik. Bu yüzden bu çalışmada şizofreni hastalarında hem CYB mtDNA mutasyonlarını hem de PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki önemli olan bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeyini belirlemeyi amaçladık. Şizofreni hastalarında bu mekanizmaları birarada araştıran ilk çalışma olması açısından da gelecekte yapılacak çalışmalara yol gösterici ve hastalığın tanısı, tedavisi veya prognozu açısından biyobelirteç olabileceğine inanıyoruz.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklem

Tüm örnekler Atatürk Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Psikiyatri Bölümü'nde takipte olan bireylerden toplanmıştır. Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik kurul tarihi: 02.06.2022, onay no: 2022/15). Bu çalışmaya 18 yaş üzerinde olan 44 şizofreni hastası ve 41 sağlıklı bireyi onam alınarak dahil edildi.

## Uygulama

Tüm bireylerden 5 cc EDTA'lı tüpte tam kan alınmıştır. Şizofreni şüphesiyle ilgili polikliniğe başvuran hastaların tanısı için psikiyatri uzmanı Dr. Halil Özcan tarafından Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nda yer alan kriterlere göre<sup>18</sup> değerlendirmeler yapıldı. Ayrıca şizofreni hastalığının psikopatolojik semptomlarının şiddeti Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği (PANSS)<sup>19</sup>, Klinik Global İzlenim (CGI)<sup>20</sup> ve Kısa Psikiyatrik Derecelendirme Ölçeği (KPD)<sup>21,22</sup> ile hastalar değerlendirildi.

PANSS ölçeğinde şizofreni hastalarına 30 maddeden oluşan pozitif ve negatif belirtiler ile genel psikopatoloji ölçeklerinden oluşan 3 alt ölçek ile değerlendirmeler yapılır. Hastaların değerlendirmelerinde gösterdikleri belirtilere göre 1-7 arası puan verilir<sup>19,23</sup>. KPD ölçeği 18 maddeden ve 0-6 arasında puanlamadan oluşmaktadır. Psikotik ve depresif belirtiler ile bu belirtilerin şiddetini değerlendiren sorulardan oluşmaktadır<sup>21,22</sup>. CGI üç boyutlu bir ölçek ve 18 sorudan oluşuyor. Değerlendirmede 1-7 arasında puan veriliyor. Hastalığın seyrini değerlendirmek için kullanılıyor<sup>24,25</sup>.

Hastalarda eşlik eden ruhsal bozukluğu ve kronik fiziksel hastalığı (hipertansiyon, diyabet, organ yetmezliği, kanser vs) olanlar dışlandı. Sağlıklı gönüllülerde herhangi bir ruhsal ve belirtilen tarzda kronik fiziksel hastalık bulunmamaktadır.

### CYB mtDNA mutasyonlarının saptanması ve *in silico* analizi

DNA izolasyon aşaması Bayburt Üniversitesi, SHMYO Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarında Dr. Ebubekir Dirican ve Dr. Sevgi Karabulut Uzunçakmak tarafından gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için Eco→Tech DNA izolasyon kiti (Erzurum, Türkiye) kullanıldı. Şizofreni hastalarından alınan tam kanlardan her bireyin DNA izolasyonu için 200 µl tam kan kullanıldı. İlgili firmanın protokolündeki belirttiği tavsiyelere göre tüm izolasyon aşamaları başarıyla gerçekleştirildi<sup>26</sup>. DNA izolasyonu sonrası DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları Take3 Plate (BioTek) spektrofotometri cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek gerçekleştirildi. PCR işlemi gerçekleştirilinceye kadar -20° C 'de buzdolabında DNA örnekleri arşivlendi.

PCR aşamasındaki tüm deneyler Bayburt Üniversitesi, SHMYO Tıbbi Biyoloji ve Genetik

laboratuvarında Dr. Ebubekir Dirican tarafından gerçekleştirildi. CYB mtDNA mutasyonlarının analizi için SensoQuest Labcycler (thermalcycler: ısı döngü) cihazı kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu için 25 µl of EcoTaq 2× PCR Master miks, 2 µl of forward (ileri) primer (10µM), 2 µl of reverse (geri) primer (10 µM), 10 pg–500 µg template (kalıp) DNA ve üzeri dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. PCR programı ise master miks kitinin alındığı ilgili firmanın önerilerine göre ayarlandı<sup>26</sup>. CYB geni primerleri daha önceki bir çalışmadan alındı<sup>27</sup>. PCR aşamasından sonra 3 µl etidyum bromür kullanılarak %2'lik agaroz jelde yürütme yapıldı ve hedeflenen 1064 bp'li bantlar 50 bp'lik marker kullanılarak Bio-Vision UV cihazında doğrulandı. Sonra ExoSAP ile PCR pürifikasyonu yapıp, Sanger DNA dizi analizi ABI PRISM 310 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) cihazı kullanılarak hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Sanger DNA dizi analiz sonuçları Unipro UGENE v43.0 programı kullanılarak değerlendirildi.

CYB mtDNA mutasyonlarının *in silico* analizleri için Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen- 2), Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN), Mutation Assessor, Screening for Non-Acceptable Polymorphisms (SNAP) ve Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) beş farklı *in silico* analiz veri tabanı kullanıldı.

### PIK3CA/AKT/mTOR genlerinin mRNA ekspresyon analizi

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi aşamaları Bayburt Üniversitesi, SHMYO Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarında Dr. Ebubekir Dirican ve Dr. Sevgi Karabulut Uzunçakmak tarafından gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu için EcoPURE Total RNA izolasyon kiti kullanıldı. 100 µl tam kan kullanıldı. Kitin protokolünde yer alan önerilere göre sağlıklı ve hasta bireylerin RNA izolasyonları başarıyla gerçekleştirildi<sup>28</sup>. İzolasyonun son aşamasında 50-100 µl EcoPURE Elüsyon Buffer filtreye eklenip 1 dakika inkübe edildi. Sonraki aşamada maksimum hızda 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Gen ekspresyon analizine kadar tüm RNA örnkleri -20° C'de buzdolabında arşivlendi. cDNA reaksiyonu iScript cDNA sentez kiti ile gerçekleştirildi. Kitin protokolündeki önerilere göre cDNA sentez işlemi SensoQuest Labcycler (thermalcycler: ısı döngü) cihazı kullanılarak yapıldı<sup>28</sup>.

mRNA ekspresyon deneyleri Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve

Araştırma Merkezi'nde Dr. Ebubekir Dirican tarafından gerçekleştirildi. Bio-Rad CFX-96 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) cihazı ile Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA), AKT Serine/Threonine Kinase 1 (AKT1) ve Mechanistic Target of Rapamycin Kinase (mTOR) genlerinin ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. mRNA ekspresyon reaksiyonu için 10 µl iTaq Universal SYBR Green supermix (2X), 5 µl of complementary DNA (cDNA), 1 µl forward ve reverse primer ve 3 µl of PCR-grade su ile örnekler için miks hazırlandı. Master miksın protokolündeki önerilere göre RT-PCR programı ayarlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

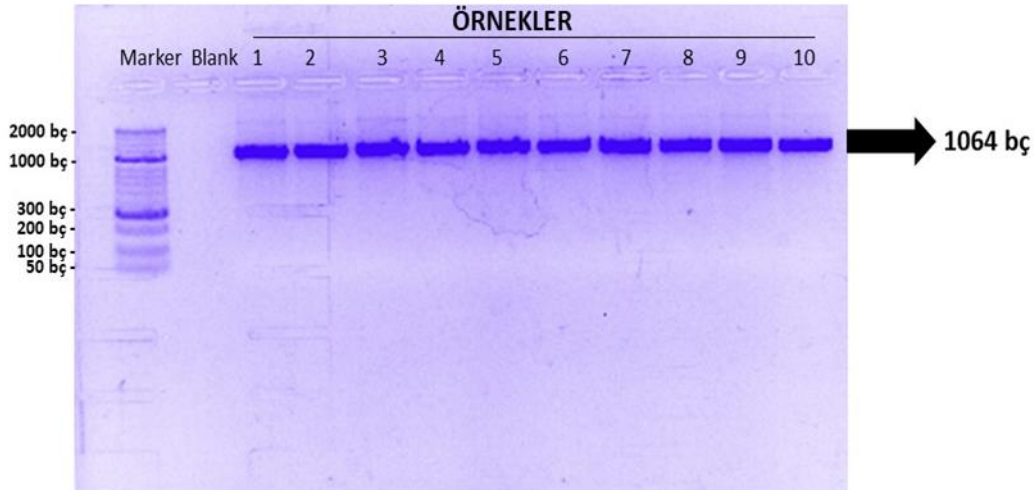
### İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 9.3.0 programı kullanıldı. Normalizasyon için Kolmogorov-Smirnov (K-S) testi kullanıldı. Şizofreni hastalarının yaşları ile sağlıklı bireylerin yaşlarının kıyaslanması için Mann Whitney-U testi ve cinsiyetlerin kıyaslanması için  $\chi^2$  testi kullanıldı. Şizofreni hastalarında PANSS, CGI ve KPD ölçeklerinin yatış ve taburcu dönemlerindeki farkların gösterilmesi için Mann Whitney-U testi kullanıldı. Ayrıca PIK3CA, AKT1 ve mTOR

genlerinin hasta ve sağlıklı gruplardaki dağılımlarının gösterilmesi için Mann Whitney-U testi kullanıldı. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin korelasyon analizi için Pearson korelasyon testi kullanıldı. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin tanısal gücünü ve önemini göstermek için ROC curve analizi yapıldı. CYB mtDNA mutasyonlarını taşıyan hastalarda mutasyon türüne göre PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon dağılımlarının gösterilmesi için One-Way ANOVA (PIK3CA için) ve Kruskal-Wallis testleri (AKT1 ve mTOR için) kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Şizofreni hastalarının klinik ve demografik verileri Tablo 1'de özetlenmiştir. Şizofreni hastalarının %43,18'i kadın ve %56,82'si erkekti. Hastaların yaş ortalaması  $41 \pm 8,65$  (ortalama  $\pm$  sd) olarak belirlendi. Hastaların %34,09'u evli ve %29,55'i çocuk sahibiydi. Hastaların hastalık süresi ve tedavi süresi çoğunlukla 15 yılın altındaydı ve bunların frekansı %70,45 olarak belirlendi. Hastaların %36,36'nın ailesinde de psikiyatrik hastalık vardı.



Şekil 1. CYB mtDNA geninde jel elektroforezi ile 1064 bp bantların belirlenmesi

**Tablo 1. Şizofreni hastalarının demografik özelliklerinin dağılımı**

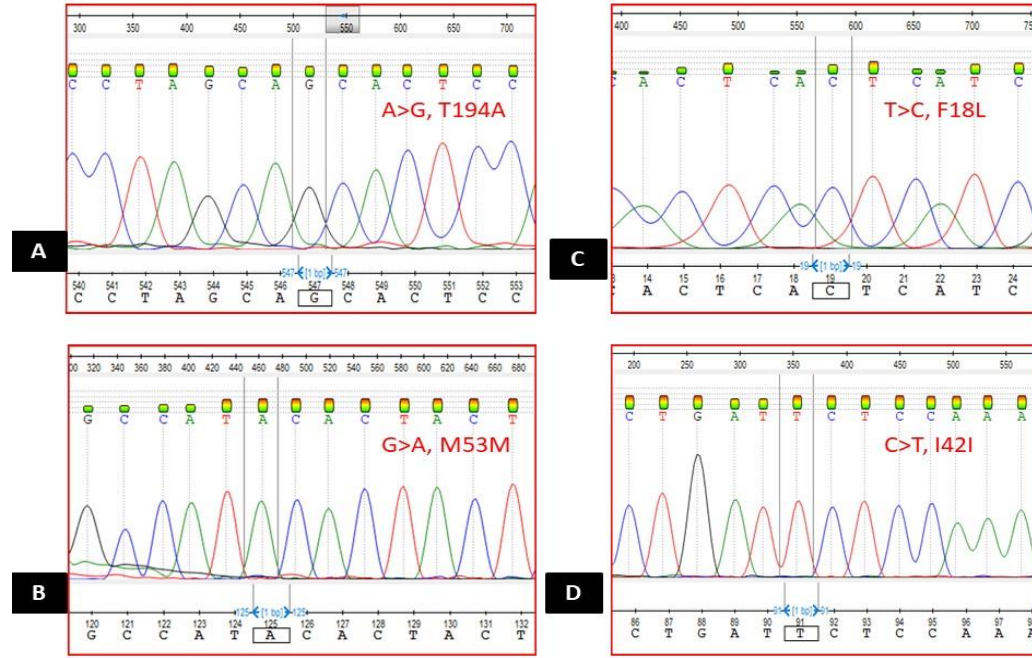
Özellik	Hasta (n=44) n (%)
Yaş (ortalama±SD, yıl)	41±8,65
PANSS ölçeği	
Yatış dönemi (ortalama±SD)	95±21,95
Taburcu dönemi (ortalama±SD)	64±16,61
CGI ölçeği	
Yatış dönemi (ortalama±SD)	6±0,77
Taburcu dönemi (ortalama±SD)	7±0,67
KPD ölçeği	
Yatış dönemi (ortalama±SD)	43±10,81
Taburcu dönemi (ortalama±SD)	24±7,77
Cinsiyet	
kadın	19 (43,18)
erkek	25 (56,82)
Hastalık süresi (yıl)	
<15	31 (70,45)
≥15	13 (29,55)
Tedavi süresi (yıl)	
<15	31 (70,45)
≥15	13 (29,55)
Sigara içme durumu	
İçiyor	23 (52,27)
İçmiyor	21 (47,73)
Evlilik durumu	
evli	15 (34,09)
bekar	29 (65,91)
Çocuk sahibi	
evet	13 (29,55)
hayır	31 (70,45)
Ailede başka psikiyatrik hastalığı olan birey	
Var	16 (36,36)
Yok	28 (63,64)

(SD: Standart sapma, PANSS: Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği, CGI: Klinik Global İzlenim Ölçeği KPD: Kısa Psikiyatrik Derecelendirme Ölçeği)

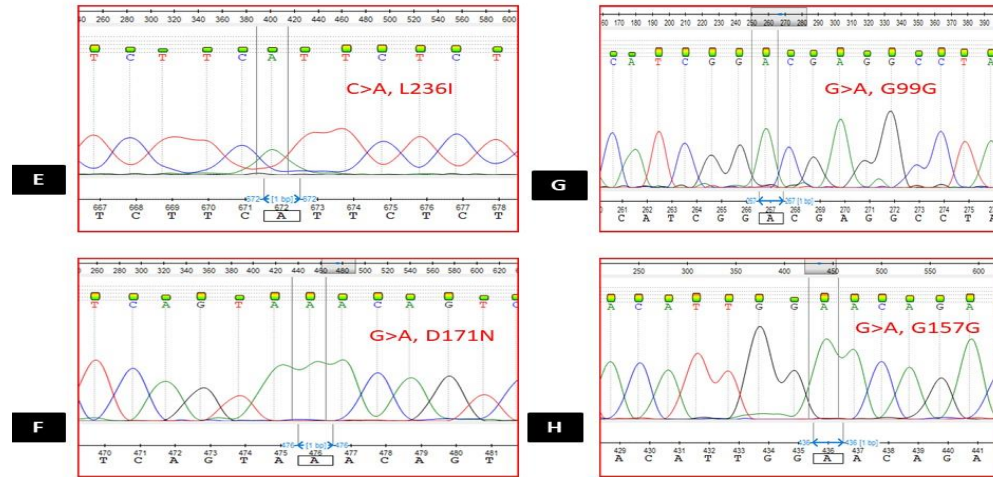
Hastaların %52,27'sinin sigara içme alışkanlığı vardı. Şizofreni hastalarının yatış dönemindeki PANSS ve KPD ölçek değeriyle takip süreci ve yatan hastaların taburcu olduğu dönemki ölçekler arasında belirtilerde azalmayı yani iyileşmeyi düşündüren istatistiksel olarak anlamlı farklar saptandı ( $p < 0,0001$ ). Şizofreni hastalarının kullandıkları antipsikotikler arasında olanzapin, aripiprazol, amilsülpirid, venlefasin, klozapin, citalopram, biperiden, haloperidol, ketiapin, paliperidon gibi ilaçlar vardı. Hastalar arasında bu ilaçların tekli veya birlikte (combine) kullanımları mevcuttu. Sağlıklı bireylerin %46,15'i kadın ve %53,85'i erkekti. Bu bireylerin herhangi bir psikiyatrik ve kronik hastalık taşımadıkları ve yaş ortalamalarının  $40,32 \pm 12,89$  (ortalama  $\pm$  sd) olduğu belirlendi.

Şizofreni hastalarının DNA örnekleri PCR ile amplifiye edildikten sonra %2'lik jelde etidyum bromür kullanılarak jel elektroforezinde yürütülüp UV cihazında görüntülendi. Hedeflenen 1064 bp'lik bantlar gösterildi (Şekil 1). Sağlıklı bireylerin %46,15'i kadın ve %53,85'i erkekti. Bu bireylerin herhangi bir psikiyatrik ve kronik hastalık taşımadıkları ve yaş ortalamalarının  $40,32 \pm 12,89$  (ortalama  $\pm$  sd) olduğu belirlendi.

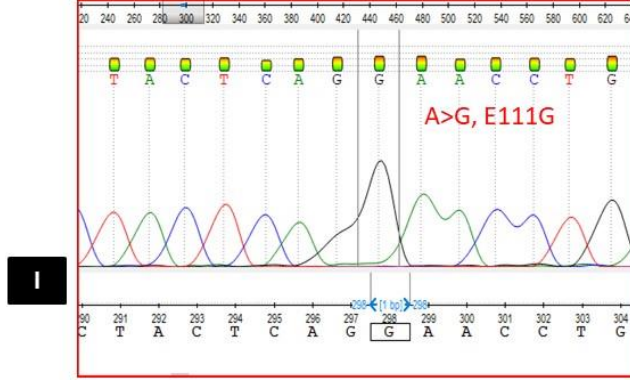
Şizofreni hastalarının DNA örnekleri PCR ile amplifiye edildikten sonra %2'lik jelde etidyum bromür kullanılarak jel elektroforezinde yürütülüp UV cihazında görüntülendi. Hedeflenen 1064 bp'lik bantlar gösterildi (Şekil 1). Şizofreni hastalarının CYB mtDNA mutasyonlarını taşıma durumları Sanger DNA dizi analiziyle gösterildi (Şekil 2 A-I).



Şekil 2 (A-D). CYB homozygot mtDNA mutasyonlarının Sanger DNA dizi analiz sonuçları A. T194A, B. M53M, C. F18L, D. I42I



Şekil 2 (E-H). CYB homozygot mtDNA mutasyonlarının Sanger DNA dizi analiz sonuçları E. L236I, F. D171N, G. G99G, H. G157G.



Şekil 2 (I). CYB homozigot mtDNA mutasyonlarının Sanger DNA dizi analiz sonuçları I. E111G

Hastaların 43'ünde 15326. nükleotid pozisyonunda T194A missense (yanlış anlamlı) A>G mutasyonu saptandı. Diğer en sık görülen mutasyonlar ise 15452. nükleotid pozisyonunda L236I (C>A) (n=5), 15078. nükleotid pozisyonunda E111G (A>G) (n=3), 14872. nükleotid pozisyonunda I42I (C>T) (n=3) ve 14798. nükleotid pozisyonunda F18L (T>C) (n=3)

mutasyonlarıydı. Hastalardaki frekansı düşük olan mutasyonlar arasında 15043. nükleotid pozisyonunda G99G (G>A) (n=1), 15257. nükleotid pozisyonunda D171N (G>A) (n=1), 15217. nükleotid pozisyonunda G157G (G>A) (n=1) ve 14905. nükleotid pozisyonunda M53M (G>A) (n=1) yer almaktaydı (Tablo 2).

Tablo 2. Şizofreni hastalarında CYB mtDNA mutasyonlarının dağılımı

Gen	Nükleotid pozisyonu	Nükleotid değişimi	Amino asit değişimi	Mutasyon tipi	Grantham değeri	Mutasyon oranı (mutasyon sayısı/ Toplam hasta sayısı)
CYB	15326	A→G	T194A	Missense	58	43/44
CYB	15452	C→A	L236I	Missense	5	5/44
CYB	15078	A→G	E111G	Missense	-	3/44
CYB	14872	C→T	I42I	Sinonim	0	3/44
CYB	14798	T→C	F18L	Missense	22	3/44
CYB	15043	G→A	G99G	Sinonim	0	1/44
CYB	15257	G→A	D171N	Missense	23	1/44
CYB	15217	G→A	G157G	Sinonim	0	1/44
CYB	14905	G→A	M53M	Sinonim	0	1/44
Tüm hastalarda toplam saptanan mutasyon sayısı:						61
1 mutasyon taşıyan hasta sayısı:						30
2 mutasyon taşıyan hasta sayısı:						11
3 mutasyon taşıyan hasta sayısı:						3

(Aminoasit değişimlerinin kısaltma ve açıklamaları; A: Alanin, T: Treonin, L: Lösin, I: İzolösin, E: Glutamat, G: Glisin, D: Aspartat, N: Asparajin, M: Metiyonin)

Grantham skoru (değeri) adı verilen bir puan, iki amino asit arasındaki yan zincir atomik kompozisyonu, polaritesi ve hacmindeki farkı tanımlar<sup>29</sup>. Grantham skoru korunmuş (0-50), orta derecede korunmuş (51-100), orta derecede radikal (101-150) veya radikal ( $\geq 151$ ) şeklinde değerlendirilmektedir<sup>30</sup>. Bu çalışmada şizofreni hastalarında tanımlanmış olan mutasyon türleri arasında en yüksek Grantham skoru T194A mutasyonunu taşıyanlardaydı ve bu değer 58 olarak belirlendi. L236I mutasyonu için Grantham skoru 5,

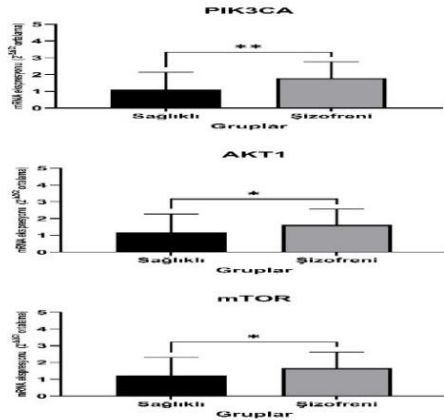
F18L için 22 ve D171N için ise 23 olarak bulundu (Tablo 2).

Bu çalışmada ayrıca, CYB mtDNA mutasyonlarının *in silico* analizleri için PolyPhen- 2, PROVEAN, Mutation Assessor, SNAP ve CADD olmak üzere beş farklı *in silico* analizi veri tabanı kullanıldı. *In silico* analiz sonuçlarına göre m.15326 (T194A), m.15452 (L236I), m.15078 (E111G), m.14798 (F18L) ve m.15257 (D171N) mutasyonlarının bazı hastalıklarda benign karakterde, hastalık yapıcı veya zararlı etkilerinin olduğu görülmüştür (Tablo 3).

**Tablo 3. CYB mtDNA varyantlarının in silico analiz sonuçları**

Gen	Nükleotid pozisyonu	Nükleotid değişimi	Polyphen2	PROVEAN	Mutation Assessor	SNAP	CADD
CYB	15326	A→G	Benign	Nötr	Nötr etki	Nötr	Nötr
CYB	15452	C→A	Benign	Nötr	Nötr etki	Nötr	Nötr
CYB	15078	A→G	Muhtemel zarar verici	Zararlı	Orta etki	Hastalık	Zararlı
CYB	14872	C→T	-	-	-	-	-
CYB	14798	T→C	Benign	Nötr	Nötr etki	Nötr	Nötr
CYB	15043	G→A	-	-	-	-	-
CYB	15257	G→A	Benign	Zararlı	Orta etki	Hastalık	Zararlı
CYB	15217	G→A	-	-	-	-	-
CYB	14905	G→A	-	-	-	-	-

Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen- 2) Erişim: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>  
 Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) Erişim: <https://www.jcvi.org/research/provean>  
 Mutation Assessor Erişim: <http://mutationassessor.org/r3/>  
 Screening For Non-Acceptable Polymorphisms (SNAP) Erişim: <https://hpc.nih.gov/apps/snap.html>  
 Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) Erişim: <https://cadd.gs.washington.edu/>  
 Şizofreni ve sağlıklı bireylerde PI3K/AKT/mTOR yolundaki genlerin ekspresyon durumları



**Şekil 3. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin şizofreni ve sağlıklı bireylerdeki ekspresyon durumu (sırasıyla \*\*p=0,0025; \*p= 0,0461; \*p=0,0317).**

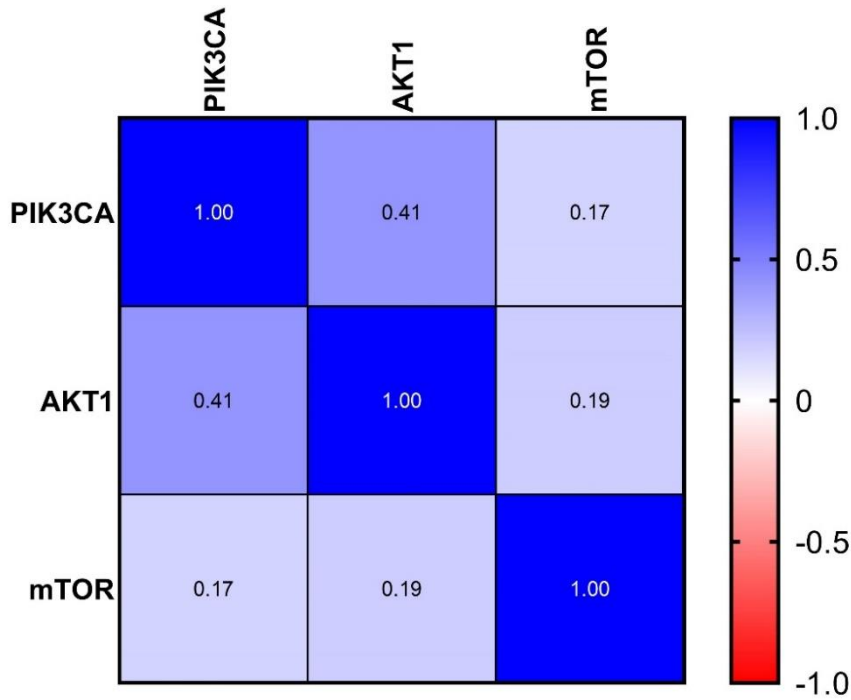
Şizofreni hastalarında PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon seviyesinin, sağlıklı

bireylerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla



$p=0,0025$ ;  $p=0,0461$ ;  $p=0,0317$ ) (Şekil 3). PIK3CA geni mRNA ekspresyonunun şizofreni hastalarında özellikle erkeklerde ve sigara içen bireylerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0,0310$ ;  $p=0,0493$ ). Fakat PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyonu ile diğer demografik veriler arasında bir fark belirlenemedi ( $p>0,05$ ). Ayrıca şizofreni hastalarında bu üç gende de sağlıklı bireylere nispeten

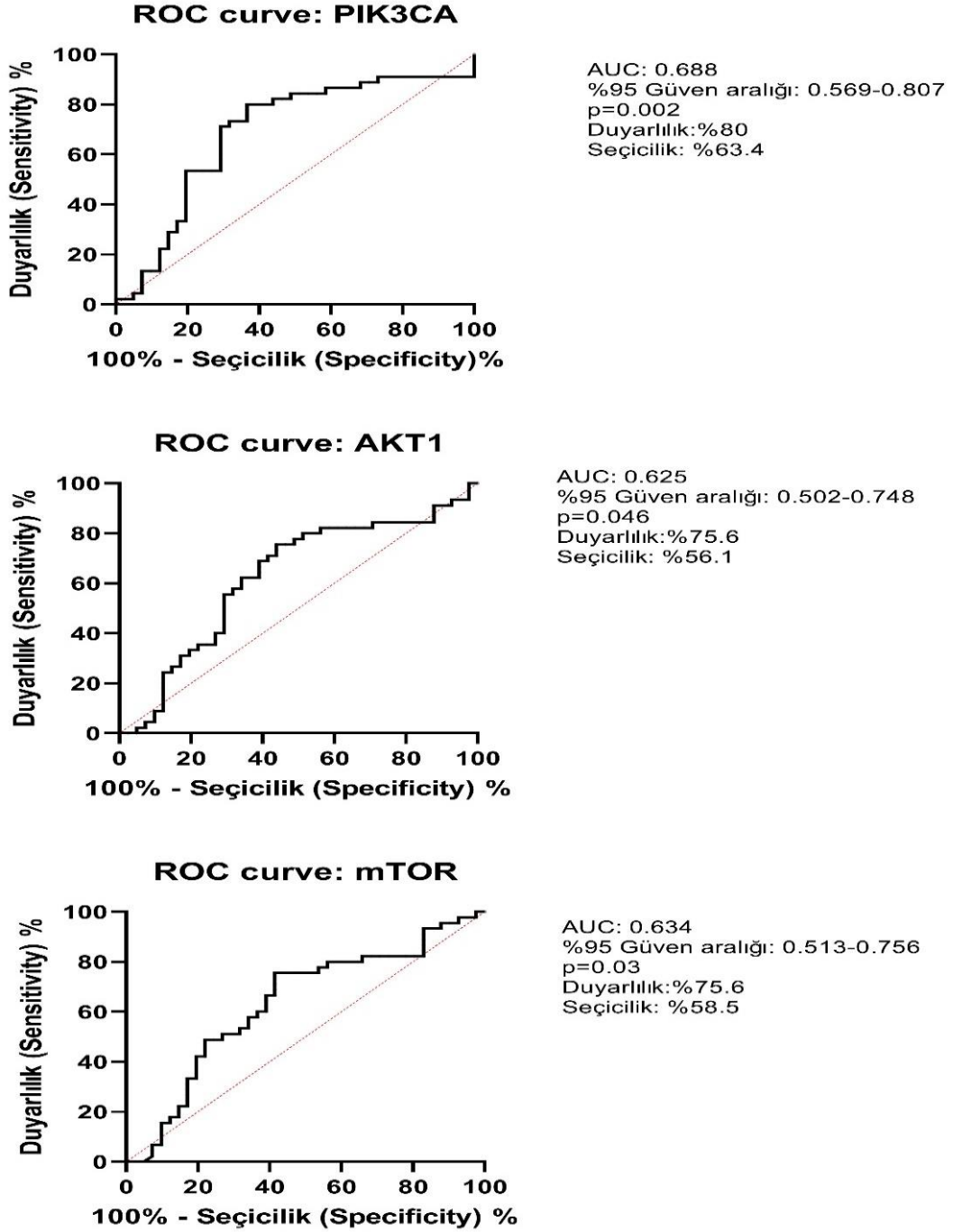
mRNA ekspresyonlarında artış belirlenmesinden dolayı aralarında herhangi bir korelasyon olup olmadığı analiz edildiğinde PIK3CA ve AKT1 genleri arasında orta şiddette anlamlı bir pozitif korelasyon gösterildi ( $p=0,005$ ,  $r=0,41$ , %95 CI:0,1361-0,6303). PIK3CA ile mTOR ve AKT1 ile mTOR genleri arasında da pozitif bir korelasyon olsa da bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ) (Şekil 4).



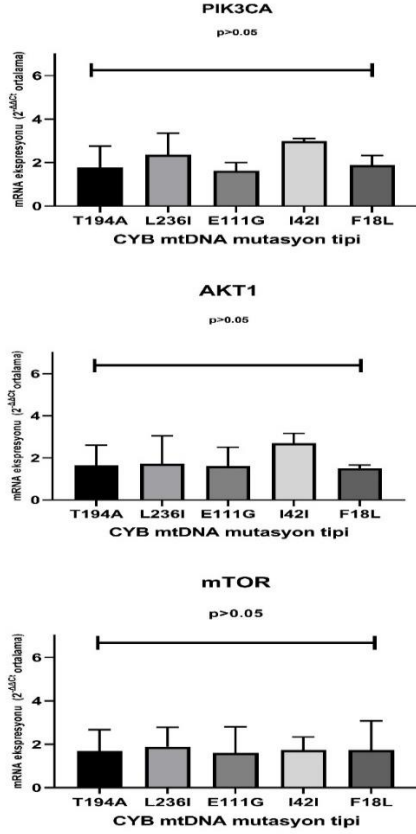
Şekil 4. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin korelasyon analizi. PIK3CA-AKT1 ( $r = 0,41$ ,  $p = 0,005$ ), PIK3CA-mTOR ( $r = 0,17$ ,  $p = 0,258$ ) ve AKT1- mTOR ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,204$ ).

ROC analiz sonucuna göre PIK3CA'nın AUC değeri 0,688 ve güven aralığı (GA: %95 CI) (0,569-0,807) olarak belirlendi ( $p<0,002$ ). Ayrıca çalışılan üç gen arasında şizofreni hastalarında en iyi ayırım yapabilme yeteneğine sahip olan genin PIK3CA olduğu görüldü. AKT1 ve mTOR genlerinin ROC analiz sonuçlarına bakıldığında; mTOR için elde edilen AUC değeri 0,634, GA (0,513-0,756) ve  $p=0,046$ ; AKT1 için elde edilen AUC değerinin 0,625 ve GA (0,502-0,748) ve  $p=0,046$  anlamlı hasta ve sağlıklı bireyler arasında ayırım yapabilme yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 5). PIK3CA geni şizofreni

hastaları için % 80 duyarlılık ve % 63,4 seçicilik ile önemli bir tanı değerine sahipken, mTOR geni %75,6 duyarlılık ve %56,1 seçicilik, AKT1 geninin ise %75,6 duyarlılık ve %58,5 seçicilik ile önemli bir tanı değerine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 5). Farklı CYB mtDNA mutasyonu taşıyan bireylerde PIK3CA, AKT1 ve mTOR gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0,05$ ) (Şekil 6). PIK3CA ve AKT1 genleri ekspresyonunun en yüksek olduğu mutasyon türü I42I, mTOR geni ekspresyonunun en yüksek olduğu mutasyon türü L236I olarak belirlendi.



Şekil 5. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin ROC analiz sonuçları.



Şekil 6. PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin ekspresyon sonuçlarının mtDNA mutasyonu taşıyan hastalarda mutasyon tipine göre dağılımları

## TARTIŞMA

Şizofreni, genetik kökenli olup; çeşitli klinik etkileri olan ciddi ve oldukça heterojen bir psikiyatrik bozukluktur <sup>31</sup>. mtDNA'daki genetik değişikliklere bağlı olarak bozulmuş mitokondriyal fonksiyonun, zihinsel bozukluklar da dahil olmak üzere farklı anormal nörolojik durumlara katkıda bulunabileceği varsayılmıştır <sup>6</sup>. Mitokondriyal disfonksiyon, sinaptik nörotransmisyonu sinerjistik olarak etkileyebilen, şizofreni ve bipolar bozukluğun patofizyolojisinde yer alan nörobiyolojik bir fenomendir <sup>32</sup>. Beyinde, PI3K yolunun bileşenleri, sinaptik oluşumu ve plastisiteyi düzenler; dolayısıyla bu yolun bozulması sinaps disfonksiyonuna ve patolojik davranışlara yol açar <sup>33</sup>. Bu çalışmada şizofreni hastalarında CYB mtDNA mutasyonları ile PI3K/AKT/mTOR

yolağındaki bazı önemli genlerin mRNA ekspresyonları araştırılmıştır.

Literatüre bakıldığında şizofreni hastalarında çeşitli mtDNA genlerinde mutasyon veya polimorfizm tarama çalışmaları yapılmıştır. Mitokondri içindeki oksidatif fosforilasyon, nöronal fonksiyon için anaerobik enerji kaynağıdır ve anahtar genleri mitokondriyal DNA'da bulunur <sup>34</sup>. Şizofreni için oksidatif fosforilasyon işlevinde eksiklikler bildirilmiştir, ancak mitokondriyal DNA içinde şizofreniye yatkınlık oluşturan genetik belirteçlerin tanımlanmasına yönelik çabalar sınırlı olmuştur <sup>34</sup>. İvanova ve ark. (2021) polimorfik varyant m.1811A>G (MT-RNR2)'in kontrollere (%4,3) kıyasla şizofrenide en yüksek sıklığa (%24,3) sahip olduğunu göstermişlerdir <sup>35</sup>. Bi ve ark. (2016) m.15395 A > G ve m.8536 A > G varyantlarının şizofreni hastalarında hücresel düzeyde mitokondriyal fonksiyonu olumsuz etkilediğini öne sürmüşlerdir <sup>36</sup>. Gonçalves ve ark. (2018) şizofreni hastalarında %7,2 C15452A (MT-CYB: Mitochondrially Encoded Cytochrome B), %7,2 A11251G (MT-ND4: Mitochondrially Encoded NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4) ve %7,4 T4216C (MT-ND1: Mitochondrially Encoded NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1) sıklıkta bazı mtDNA mutasyonlarını tespit etmişlerdir <sup>34</sup>. Bir derleme çalışmasında ise CYB oksidaz geninde (şizofreni hasta sayısı = 11,311, kontrol = 35,735) bulunan A15218G mutasyonunun şizofreni hastalığıyla ilgili orta derecede bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir <sup>37</sup>.

Bu çalışmada ise şizofreni hastalarında 44 hastanın 43'ünde m.15326 A>G missense (yanlış anlamlı) mutasyon olduğu belirlendi. 5 hastada m.15452 C>A ve 3'er hastada ise m.15078 A>G, m.14872 C>T ve m.14798 T>C mutasyonları Sanger DNA dizi analiziyle tanımlandı. 44 hastada 9 farklı mutasyon (m.15326 A>G, T94A; m.15452C>A, L236I; m.15078A>G, E111G; m.14872 C>T, I42I; m.14798 T>C, F18L; m15043 G>A, G99G; m15257 G>A, D171N; m.15217 G>A, G157G ve m.14905 G>A, M53M) olmak üzere 61 mutasyon saptandı. 11 hastada 2 farklı mutasyon ve 3 hastada ise 3 farklı mutasyon belirlendi. 44 hastada saptanan 9 çeşit mutasyonun 5'inin missense mutasyon olduğu, yani farklı bir amino asidin sentezlenmesine sebep oldukları gösterildi.

Grantham skoru, evrimsel anlamda iki amino asit arasındaki mesafeyi tahmin etmeye çalışır <sup>29</sup>. Daha düşük bir Grantham puanı, daha az evrimsel mesafeyi

yanstır. Diğer taraftan daha yüksek bir Grantham puanı, daha büyük bir evrimsel mesafeyi yansıtır. Bu yüzden daha yüksek Grantham puanları daha zararlı olarak kabul edilir. Bu çalışmada en yüksek Grantham skoru görülen mutasyon tipi m.15326 A>G olduğu ve puanı 58 olarak belirlendi. Diğer mutasyon tiplerinin Grantham puanları ise m.14798T>C için 22, m.15257G>A için 23 ve m.14872C>T, m.15043G>A, m.15217G>A ve m.14905G>A için 0 olarak saptandı. Fakat m.15078A>G mutasyon türünün ise daha önce Grantham puanı bildirilmemiştir.

PI3K fosforile olduğu zaman AKT'yi aktive eder ve AKT'nin de mTOR'u aktive ettiği bilinmektedir<sup>38</sup>. PI3K-AKT sinyalizasyonu, nöronların hayatta kalması için kritik bir faktördür<sup>39</sup>. PI3K sinyal yolağı, hücre apoptozu, hücre metabolizması ve hücre içi vezikül taşınmasında da rol alır<sup>40</sup>. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, PI3K yolu aktivasyonu dendritlerin uzunluğunu ve karmaşıklığını artırır<sup>41</sup>. AKT onkogeni ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler, psikiyatrik hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır<sup>42</sup>. Yapılan çalışmalar, psikiyatrik hastalıkların patogeneğinde PI3K/AKT/mTOR ekseninin düzensizliğini işaret eden kanıtlar sağlarken, fakat bunun gelişimsel ve/veya sinyal kusurlarının sonucu olup olmadığı açık değildir<sup>42</sup>. Bu yüzden bu çalışmada şizofreni hastalarında PI3K/Akt/ mTOR sinyal yolağındaki PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon durumları araştırıldı. Bu genlerin mRNA ekspresyonları şizofreni hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca PIK3CA geni ile AKT1 geni arasında orta şiddette anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu gösterildi. ROC analizindeki bulgulara göre; PIK3CA geninin şizofreni hastaları için % 80 duyarlılık ve % 63,4 seçicilik ile önemli bir tanı değerine sahip olduğu, mTOR geni %75,6 duyarlılık ve %56,1 seçicilik ve AKT1 geni ise %75,6 duyarlılık ve %58,5 seçicilik ile önemli bir tanı değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Fakat farklı CYB mtDNA mutasyonu taşıyan şizofreni hastalarında PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyon durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. PIK3CA ve AKT1 genlerinin ekspresyonlarının en yüksek olduğu mutasyon türü I42I iken, mTOR geni ekspresyonunun en yüksek olduğu mutasyon türü ise L236I olarak saptandı.

Literatüre bakıldığında şizofreni hastalarında AKT1 geninin mRNA ekspresyon seviyesini yüksek veya düşük şeklinde farklı bulan çalışmalar mevcuttur. Bu

çalışmaların bir kaçını incelediğimizde, AKT1 geninin şizofreni hastalığı da dahil birçok beyin hastalığında<sup>43</sup> beyin dokusu ve kanda, protein ve mRNA ekspresyon seviyesinde düşüş olduğu bildirilmiştir<sup>44</sup>. Bunlara karşın Moretti ve ark. (2018) ise şizofreni hastalarında AKT1 geninin mRNA ekspresyon seviyesinin bu mevcut çalışmamızda olduğu gibi arttığını rapor etmişlerdir<sup>45</sup>. PUBMED veritabanında şizofreni hastalarında PI3K sinyal yolağındaki PIK3CA geni mRNA ekspresyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (Erişim tarihi: 29.09.2022). Gu ve ark. birçok çalışmada şizofreni ve diğer psikiyatrik bozuklukları olan hastalarda mTOR geninin bu çalışmamızda olduğu gibi anormal derecede yüksek ekspresyonu olduğunu vurgulamışlardır<sup>46</sup>. Fakat kendilerinin şizofreni hastalarında mTOR geni ekspresyonunu düşük olduğunu göstermişlerdir. Biz şizofreni hastalarında AKT1 ve mTOR geninin mRNA ekspresyonlarındaki yüksek veya düşük olma durumunun şizofreni hastalığının heterojenitesi, tanı ve tedavi süreçleriyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca şizofreni hastalarında kullanılan mevcut tedavi modellerinde yer alan ilaçlardaki farklılıklar da bunun sebebi olabilir. Bu mevcut çalışmamızda hem hasta sayısının az olması hem de kullanılan ilaçların çeşitliliğinden dolayı homojen gruplar oluşturulamadı ve bu üç genin ekspresyonu ile kullanılan ilaçların türü arasında anlamlı bir ilişki belirlenemedi.

Şizofreni hastalarında CYB mtDNA mutasyonlarıyla PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyonunu araştıran ilk çalışma olmasına rağmen, bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardı. İlk olarak araştırma herhangi bir proje desteği alınmadan yapılmış olup şizofreni hastalarında sadece CYB mtDNA mutasyonları araştırılabildiği. mtDNA'nın diğer genlerindeki (ND1 ve D310 gibi) mutasyonlar araştırılmamıştır. İkinci kısıtlı durum bu çalışmada az sayıda hastada (n=44) CYB mtDNA mutasyonları ile PIK3CA, AKT1 ve mTOR genlerinin mRNA ekspresyonlarına bakılabildiği.

Sonuç olarak şizofreni hastalarında CYB mtDNA mutasyonlarının sıklığının yüksek olduğu ve PIK3CA-AKT- mTOR genlerinde ekspresyon seviyelerinin de yüksek olduğu ilk kez bu çalışmada birlikte gösterildi. mtDNA'ya ait diğer genlerin sekans taramasının yapılması ve muhtemel şizofreni ilişkili mutasyonların açığa çıkarılması ileride yapılabilecek çalışmalar arasındadır. Ayrıca PIK3CA-AKT-mTOR yolağı çok sayıda farklı moleküle sahiptir. Şizofrenide bu moleküllerin gen ifadelerinin çalışılması ve hatta

bu moleküllerin etkileşime girdiği diğer yolların aydınlatılması hastalığın patogenezi için moleküler değişimleri çözülmesine katkı sağlayacaktır. Şizofreni sıklıkla kandan çalışılan bir hastalıktır fakat asıl değişimlerin beyin dokusunda olduğunu biliyoruz. Bu anlamda kandan yapılan çalışmaların mümkün mertebe post-mortem beyin dokuları ile doğrulanması çok daha net sonuçlar doğuracaktır. Çalışmalardaki daha populasyonlarının artırılması ve ırklara spesifik çalışmaların yapılması da şizofreniye ait daha güvenilir ve ırklara özgü mutasyon ve ekspresyon profillerinin çıkarılmasını sağlayacaktır.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: ED, SK; Veri toplama: ED, HÖ, SK; Veri analizi ve yorumlama: ED, HÖ; Yazı taslağı: ED, SK, HÖ; İçeriğin eleştirilme süreci: ED, HÖ, SK; Son onay ve sorumluluk: ED, HÖ, SK; Teknik ve malzeme desteği: ED, SK; Süpervizyon: ED, SK; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Bu çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. (Onay no: 2022/5-15)

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Desteği:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Author Contributions:** Concept/Design : ED, SK; Data acquisition: ED, HÖ, SK; Data analysis and interpretation: ED, HÖ; Drafting manuscript: ED, SK, HÖ; Critical revision of manuscript: ED, HÖ, SK; Final approval and accountability: ED, HÖ, SK; Technical or material support: ED, SK; Supervision: ED, SK; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** Approval for this study was obtained from the Atatürk University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee. (Approval number: 2022/5-15).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

## KAYNAKLAR

- Beeraka NM, Avila-Rodriguez MF, Aliev G. Recent reports on redox stress-induced mitochondrial DNA Variations, neuroglial interactions, and NMDA receptor system in pathophysiology of schizophrenia. *Mol Neurobiol.* 2022;59:2472-96.
- Alsharif KF, Albrakati A, omairi NE Al, Almalki AS, Alsanie WF, Elmageed ZYA et al. Therapeutic antischizophrenic activity of prodigiosin and selenium co-supplementation against amphetamine hydrochloride-induced behavioural changes and oxidative, inflammatory, and apoptotic challenges in rats. *Environ Sci Pollut Res.* 2022; doi: 10.1007/s11356-022-22409-x.
- Fusar-Poli L, Pries L-K, Os J van, Radhakrishnan R, Pençe AY, Erzın G et al. The association between cannabis use and facial emotion recognition in schizophrenia, siblings, and healthy controls: Results from the EUGEI study. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2022;63:47-59.
- Tomasik J, Rahmoune H, Guest PC, Bahn S. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2016;176:3-13.
- Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur Psychiatry.* 2011;26:45-56.
- Ivanova EM, Kandilarova SM, Lukanov TI, Naumova EJ, Akabalieva KV, Milanova VK. NGS-based mtDNA profiling could reveal genetic alterations in schizophrenia. *Curr Top Med Chem.* 2021;21:938-48.
- Ichikawa T, Arai M, Miyashita M, Arai M, Obata N, Nohara I et al. Schizophrenia: maternal inheritance and heteroplasmy of mtDNA mutations. *Mol Genet Metab.* 2012;105:103-9.
- Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature.* 1988;332:644-6.
- Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:1411-5.
- Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:515-34.
- Zhu K, Wu Y, He P, Fan Y, Zhong X, Zheng H et al. PI3K/AKT/mTOR-targeted therapy for breast cancer. *Cells.* 2022;11:2508.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:988-1004.
- Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016;143:3050-60.
- Arafah R, Samuels Y. PIK3CA in cancer: The past 30 years. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:36-49.
- Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal cell death. *Physiol Rev.* 2018;98:813-80.
- Mishra R, Barthwal MK, Sondarva G, Rana B, Wong L, Chatterjee M et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  induces neuronal cell death via direct phosphorylation of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem.* 2007;282:30393-405.
- Wang L, Zhou K, Fu Z, Yu D, Huang H, Zang X et al. Brain development and Akt signaling: the crossroads of signaling pathway and neurodevelopmental diseases. *J Mol Neurosci.* 2017;61:379-84.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5<sup>th</sup> edition. Washington DC, American Psychiatric Association, 2013.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1987;13:261-76.
- Busner J, Targum SD. The clinical global impressions scale: applying a research tool in clinical practice. *Psychiatry (Edgmont).* 2007;4:28-37.
- Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. *Psychol Rep.* 1962;10:799-812.

22. Yanbastı G. Kişilik Kuramları. 53rd ed. İzmir, Ege Üniversite Yayınları, 1996.
23. Kostakoğlu AE, Batur S, Tiryaki A GA. Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeğinin (PANSS) Türkçe uygulamasının geçerlik ve güvenilirliği. *Türk Psikol Derg.* 1999;14:23-32.
24. Guy W. ECDEU assessment manual for psychopharmacology. U.S. dept. of health, education, and welfare, public health service, alcohol, drug abuse, and mental health administration, national institute of mental health, psychopharmacology research branch, division of extramural research programs, rockville, md., , 1976.
25. Yıldızhan E; Türkcan A, İnan S, Erenkuş Z; Özhan Y, Erdoğan A. İlk psikoz atağı: belirtiler, tedavi başlangıcı ve klinik yanıt ilişkisi. *Türk Psikiyat Derg.* 2014;25:1-10.
26. Dirican E, Savrun ŞT, Aydın İE, Gülbay G, Karaman Ü. Analysis of mitochondrial DNA cytochrome-b (CYB) and ATPase-6 gene mutations in COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2022;94:3138-46.
27. Avcılar T, Kirac D, Ergec D, Koc G, Ulucan K, Kaya Z, et al. Investigation of the association between mitochondrial DNA and p53 gene mutations in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett.* 2016;12:2872-9.
28. Dirican E, Çınar İ. Gossypin'in prostat kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 genleri üzerindeki etkisi. *Cukurova Med J.* 2022;47:1290-5.
29. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science (80).* 1974;185:862-4.
30. Abkevich V. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet.* 2004;41:492-507.
31. Huang G, Osorio D, Guan J, Ji G, Cai JJ. Overdispersed gene expression in schizophrenia. *npj Schizophr.* 2020;6:9.
32. Das SC, Hjelm BE, Rollins BL, Sequeira A, Morgan L, Omidshar AA et al. Mitochondria DNA copy number, mitochondria DNA total somatic deletions, Complex I activity, synapse number, and synaptic mitochondria number are altered in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry.* 2022;12:353.
33. Enriquez-Barreto L, Morales M. The PI3K signaling pathway as a pharmacological target in Autism related disorders and Schizophrenia. *Mol Cell Ther.* 2016;4:2.
34. Gonçalves VF, Giamberardino SN, Crowley JJ, Vawter MP, Saxena R, Bulik CM et al. Examining the role of common and rare mitochondrial variants in schizophrenia. *PLoS One.* 2018;13:e0191153.
35. Ivanova EM, Kandilarova SM, Lukanov TI, Naumova EJ, Akabalieva KV, Milanova VK. NGS-based mtDNA profiling could reveal genetic alterations in schizophrenia. *Curr Top Med Chem.* 2021;21:938-48.
36. Bi R, Tang J, Zhang W, Li X, Chen S-Y, Yu D et al. Mitochondrial genome variations and functional characterization in Han Chinese families with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2016;171:200-6.
37. Schulmann A, Ryu E, Goncalves V, Rollins B, Christiansen M, Frye MA et al. Novel complex interactions between mitochondrial and nuclear dna in schizophrenia and bipolar disorder. *Complex Psychiatry.* 2019;5:13-27.
38. Polak P, Hall MN. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:209-18.
39. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell.* 2000;103:211-25.
40. He W, Yuan Q-H, Zhou Q. Histamine H3 receptor antagonist Clobenpropit protects propofol-induced apoptosis of hippocampal neurons through PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22:8013-20.
41. Jaworski J. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3-kinase-akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.* 2005;25:11300-12.
42. Tsimberidou A-M, Skliris A, Valentine A, Shaw J, Hering U, Vo HH et al. AKT inhibition in the central nervous system induces signaling defects resulting in psychiatric symptomatology. *Cell Biosci.* 2022;12:56.
43. Arguello PA, Gogos JA. A signaling pathway AKTing up in schizophrenia. *J Clin Invest.* 2008.
44. Aubry J-M, Schwald M, Ballmann E, Karege F. Early effects of mood stabilizers on the Akt/GSK-3β signaling pathway and on cell survival and proliferation. *Psychopharmacology (Berl).* 2009;205:419-29.
45. Moretti PN, Ota VK, Gouvea ES, Pedrini M, Santoro ML, Talarico F et al. Accessing gene expression in treatment-resistant schizophrenia. *Mol Neurobiol.* 2018;55:7000-8.
46. Gu S, Cui F, Yin J, Fang C, Liu L. Altered mRNA expression levels of autophagy- and apoptosis-related genes in the FOXO pathway in schizophrenia patients treated with olanzapine. *Neurosci Lett.* 2021;746:135669.