

Embriyonik Beyin Gelişiminde Görevli *DCX* ve *PAFAH1B1* Genlerinde Meydana Gelen SNP'lerin *In Silico* Değerlendirilmesi: Biyoinformatik Çalışma

In Silico Evaluation of SNPs Occurring in *DCX* and *PAFAH1B1* Genes Involved in Embryonic Brain Development: Bioinformatic Study

 Ahmet TAMER^a

^aÜsküdar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nörobilim ABD, İstanbul, Türkiye

ÖZET Amaç: *DCX* geni, sinir sisteminin gelişimi sırasında nöronların mikrotübüllerine bağlanan doublecortin proteinini kodlamaktadır. Doublecortin, göç eden nöronlarda mikrotübülleri bağlar ve stabilize eder. Bu gen ailesinin üyeleri tarafından düzenlenen hücresel süreçler; nöronal göç, nörogenez ve göz reseptör gelişimini de içermektedir. *PAFAH1B1* geni nöronal göç sırasında hücre nükleusunun göçünden sorumludur. Literatürde bu genlerde tek nükleotid polimorfizmlerinin etkilerini *in silico* analizlerle bildiren bir çalışma kaydedilmemiştir. Bu araştırmanın amacı çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen Doublecortin-X (*DCX*) ve *PAFAH1B1* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin *in silico* analizlerle değerlendirilmesidir. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerinde oluşan SNP'lerin, bu genlerin kodladıkları proteinlerin fonksiyonel etkileri, stabilite analizleri ve modellemeleri; SIFT, PolyPhen, Provean, PhD-SNP, Mutation assesor, SNPs&GO, SNAP2, I-Mutant 3.0, MuPro, HOPE veritabanları ile yapıldı. GeneMANIA ile bu genlerin diğer genlerle etkileşimde olduğu gösterildi. Bu genlerdeki mikroRNA işlevlerinin, merkezi sinir sisteminin oluşan hastalıklarla ilişkisine bakmak için Human Disease MicroRNA Database 3.0 kullanıldı. **Bulgular:** Çeşitli veri tabanları ile yapılan bu çalışmada *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki SNP'lerin protein fonksiyonuna zararlı olduğu, stabilite analizlerinde protein kararlılığının bozulmasına neden olduğu sonucuna ulaşıldı. Proteinlerde boyut, yük ve hidrofobisite farklılığı oluşturduğu sonucuna ulaşıldı. **Sonuç:** Boyut, yük ve hidrofobisite değişimi proteinlerin çekirdeğine uyum sağlayamamasına, yük farkıyla etkileşimde olduğu molekülleri iteceği ve hidrofobisite farkından dolayı hidrojen bağlarının doğru pozisyonda oluşamamasına dolayısıyla protein katlanma sorunlarına yol açabileceği sonucuna ulaşıldı. GeneMANIA ile bu genlerin birçok genle etkileşimde olup, çeşitli süreçleri düzenlediği ve bu genlerin mikroRNA'larında değişimin şizofreni, otizm, glioblastoma, beyin neoplazmaları, iskemi, epilepsi, nöroblastoma gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarıyla ilişkili olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: *DCX* ve *PAFAH1B1* geni; kortikal malformasyonlar; tek nükleotid polimorfizmi; *in silico*

ABSTRACT Objective: The *DCX* gene encodes the doublecortin protein that binds to the microtubules of neurons during the development of the nervous system. Doublecortin binds and stabilizes microtubules in migrating neurons. Cellular processes regulated by members of this gene family; it also includes neuronal migration, neurogenesis and eye receptor development. The *PAFAH1B1* gene is responsible for the migration of the cell nucleus during neuronal migration. There is no study in the literature reporting the effects of single nucleotide polymorphisms in these genes by *in silico* analysis. The aim of this research is to evaluate single nucleotide polymorphisms in Doublecortin-X (*DCX*) and *PAFAH1B1* genes, which regulate various cellular processes, by *in silico* analysis. **Materials and Methods:** In this study, the functional effects, stability analyzes and modeling of the SNPs formed in *DCX* and *PAFAH1B1* genes and the proteins encoded by these genes; SIFT, PolyPhen, Provean, PhD-SNP, Mutation assesor, SNPs&GO, SNAP2, I-Mutant 3.0, MuPro, HOPE databases. These genes were shown to interact with other genes with GeneMANIA. Human Disease MicroRNA Database 3.0 was used to look at the relationship between microRNA functions in these genes and diseases in the central nervous system. **Findings:** In this study conducted with various databases, SNPs in *DCX* and *PAFAH1B1* genes are harmful to protein function, in stability analyzes, it was concluded that it caused deterioration of protein stability. It was concluded that there were differences in dimension, charge and hydrophobicity in proteins. **Conclusion:** It was concluded that the change in dimension, charge and hydrophobicity may cause the proteins to not adapt to their nuclei, repel the molecules with which they interact with the charge difference, and the hydrogen bonds cannot be formed in the correct position due to the hydrophobicity difference, thus leading to protein folding problems. With GeneMANIA, it has been shown that these genes interact with many genes and regulate various processes, and that changes in the microRNAs of these genes are associated with central nervous system diseases such as schizophrenia, autism, glioblastoma, brain neoplasms, ischemia, epilepsy, and neuroblastoma.

Keywords: *DCX* and *PAFAH1B1* gene; cortical malformation; single nucleotide polymorphism; *in silico*

Correspondence: Ahmet TAMER

Üsküdar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nörobilim ABD, İstanbul, Türkiye

E-mail: ahmt.tmr1@hotmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

Received: 20 Oct 2021

Received in revised form: 27 Mar 2022

Accepted: 04 Apr 2022

Available online: 04 Apr 2022

2146-9040 / Copyright © 2022 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Doublecortin-X (DCX) geni, sinir sisteminin gelişimi sırasında hücre iskeleti elemanlarından olan mikrotübüllere bağlanan doublecortin proteinini kodlayan gen ailesinin üyesidir.¹ Doublecortin proteini, embriyonik gelişim esnasında göç eden nöronlarda mikrotübülleri bağlar ve stabilize eder.² *DCX* gen ailesi; subkortikal bant heterotopisi, lizensefali, epilepsi, gelişimsel disleksi ve retinitis pigmentosa ile ilişkilidir. Ayrıca bu gen ailesinin üyeleri tarafından düzenlenen hücresel süreçler; nöronal göç, nörogeenez ve göz reseptör gelişimini de içermektedir.³

Nöronal göç sırasında *DCX* gen ailesinin yanı sıra hücre göçünden sorumlu bir diğer gen ise trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz 1B alt birim alfa (*PAFAH1B1*) genidir. *DCX* geni, hücre hareketinden sorumlu mikrotübülleri stabilize ederken, *PAFAH1B1* geni nöronal göç sırasında hücre nükleusunun göçünden sorumludur. Bu 2 genin amino asitlerinde bir değişim ve mutasyon olduğunda, çocuklarda kortikal gelişimsel malformasyonlar gibi gelişimsel sorunlar ortaya çıkabilmektedir.⁴⁻⁶

Çocuklarda kortikal gelişimsel malformasyonlar, bu 2 genin işleyişinde bozulmalar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kortikal gelişimsel malformasyonlar, serebral korteksin düzenlenişi esnasında genlerin mutasyonu ile nöron göçünün ve organizasyonunun bozulmasıyla oluşabilmektedir. Serebral korteksin maturasyonu; nöronal proliferasyon, nöronal migrasyon ve kortikal organizasyon süreçlerini izler. Korteksi meydana getiren nöronlar, subventriküler bölge veya germinal bölgede lateral ventrikül duvarlarında oluşmaktadır. Burada bulunan kök hücreler mitoz geçirip çoğalarak, olgunlaşmış beyni oluşturacak olan nöron ve glia hücreleri üretirler.²

Prolifere olan nöronların bir kısmı buldukları alanda kalırken, büyük bölümü serebral korteksi oluşturacakları kalıcı olarak farklılaşacakları bölgelere göç etmeye başlarlar.

Nöron göçü, insan beyninin çeşitli bölgelerinde farklı görevleri yerine getirebilmek amacıyla hücrelerin yerleşmesi ve özelleşmesi açısından oldukça önemlidir. Nöronal göçün intraselüler düzeyde mekanizmalarının anlaşılması, gelişimsel malformasyonları anlayabilmemiz için gereklidir. Mikrotübül

transportu, sentrozomal konumlandırma, nükleus göçü ve mikrotübül stabilizasyonu nöronal göçte önemli yere sahiptir.⁷ Nöronal göçte görev alan bu 2 gen, mikrotübülleri etkileyerek normal hücre göçünü düzenlemektedir. Burada gerçekleşen bozukluklarda ise hücrelerin anormal göçüne, dolayısıyla kortikal malformasyonlara neden olmaktadır.⁸

Sinir sistemi hücrelerinde akson, iletimin gerçekleşebilmesi için önemli olan hücre bölgelerinden biridir. İletim, madde taşınması yapan proteinlerle aksonda bulunan mikrotübüller üzerinden gerçekleşmektedir.⁹ Mikrotübül oluşumunda önemli rolleri olduğu düşünülen bu 2 gen, sinir sisteminin dejeneratif hastalıklarında da etkili olabilir. Dejeneratif ve bazı psikiyatrik bozuklukların ortaya çıkışı, yalnızca yaşlılık dönemiyle ilişkili olmamakla birlikte, fizyolojik açıdan değerlendirildiğinde beyin işlevlerinde hayatın tüm evrelerinin önemli olduğu görülmektedir.¹⁰

Çocukluk döneminde ortaya çıkan gelişimsel bozukluklar; Alzheimer, Alzheimer dışı bunamalar, şizofreni gibi ileri dönemlerde ortaya çıkan nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarla ilişkili olabilmektedir.^{11,12} Gelişimsel sorunları ortaya çıkaran bu genlerin araştırılması, hem gelişimsel hem de hayatın ileri dönemlerinde ortaya çıkan santral sinir sistemi hastalıklarını daha iyi anlayabilmek için önemlidir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

VERİ ELDESİ

Bu çalışma, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapılmıştır. *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki genlerde tek nükleotid polimorfizmler [single nucleotide polymorphisms (SNP)], NCBI dbSNP veri tabanından 15 Ocak 2021 tarihinde elde edilmiş olup, yanlış anlamlı olan SNP'ler (missense SNP) belirlendi. Fonksiyonel, stabilite analizi ve modelleme analizleri gerçekleştirildi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

İN SİLİCO ANALİZLER

Bu çalışmada SNP'lerin işlevsel sonuç tahmini için SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/index.html>), SNAP2 (<https://www.rostlab.org/services/snap/>), Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>), PolyPhen2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PhD=SNP (<https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>), Mutation assessor(<http://mutationassessor.org/r3/>), SNP&GO (<https://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>) programlarını; Stabilizasyon analizleri için I-Mutant-3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>) ve MuPro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>) programlarını, modelleme için ise Project Hope (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>) *in silico* araçları kullanıldı.

Gen-Gen Etkileşimleri

Bu genlerin diğer genlerle olan etkileşimlerini araştırmak için GeneMANIA(<https://genemania.org/>) programı kullanıldı.

MikroRNA

Human Disease MicroRNA Database 3.0, insan mikroRNA'sı ve hastalık ilişkileri için deney destekli kanıtları derleyen bir veri tabanıdır. *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerinin mikroRNA-hastalık ilişkilerini araştırmak için bu veri tabanı kullanıldı.

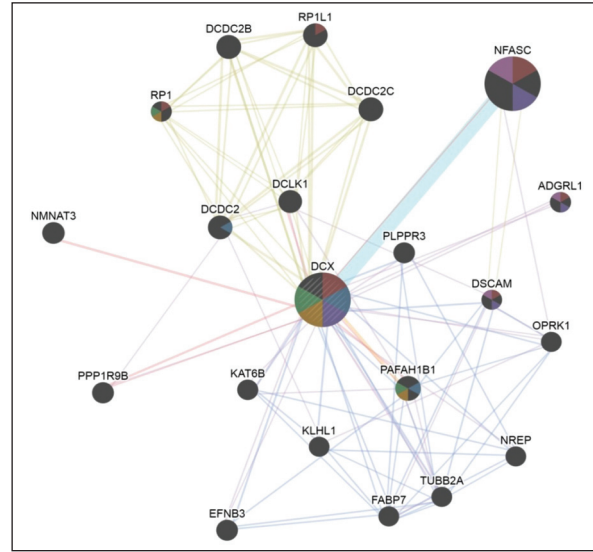
BULGULAR

GEN-GEN ETKİLEŞİMLERİ

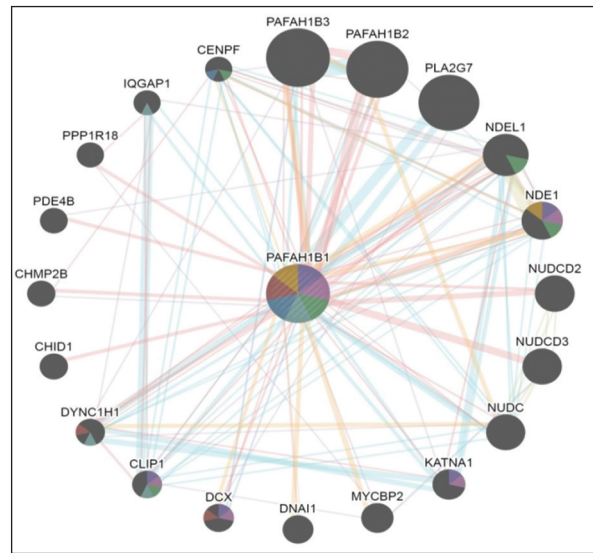
DCX ve *PAFAH1B1* genlerinin gen-gen etkileşimleri Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir. *DCX* geni 20 gen ile *PAFAH1B1* geni 20 gen ile bağlantılıdır. *DCX* geninin; nöron parçası, nöron göçü, nöron projeksiyonu, mikrotübül ile ilişkili kompleks, mikrotübül bağlama ve akson gelişimi üzerine etkisinin olduğu gösterildi. *PAFAH1B1* geninin; mikrotübül bağlama, tubulin bağlama, mikrotübül, dynein bağlama, mikrotübül ile ilişkili kompleks, protein-DNA kompleksi, mitotik mil lokalizasyonunun kurulması üzerine etkisinin olduğu gösterildi.

DCX VE PAF1B1 GENLERİNDEKİ SNP'LERİN PROTEİN YAPISI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN TAHMİNİ

NCBI veri tabanından *DCX* geni için toplam 19.896 SNP elde edildi. Bunlar arasından 189 yanlış anlamlı SNP'ler önce SIFT ile analiz edildi. Toplam 25 zararlı SNP elde edildi. Daha sonra 189 yanlış anlamlı SNP PolyPhen-2 programına sunuldu. Burada Hum-



ŞEKİL 1: *DCX* geni ağ görüntüsü.



ŞEKİL 2: *PAFAH1B1* geni ağ görüntüsü.

Div; 34 zararlı, HumVar; 30 zararlı sonuca ulaşıldı. Provean programında 123 SNP'nin zararlı olduğu bulundu. PhD-SNP programında 97 SNP'nin hastalık yapıcı etkisi olduğu sonucuna, Mutation Assessor veri tabanında 5 yüksek zararlı, 12 orta derecede zararlı SNP sonucuna ulaşıldı. SNAP2 programında 100 SNP'nin etkili sonucuna ulaşıldı. SNPs&GO'da 60 SNP'de hastalık yapıcı sonuç bulundu. *PAFAH1B1* geni için toplam 26.072 SNP elde edildi. Bunlar arasından, 310 yanlış anlamlı SNP SIFT programına su-

TABLO 1: DCX geni SIFT, Polyphen-2, Provean, PHD-SNP, SNAP2, Mutation Assessor, SNPs&GO sonuçları.

SNP no	ND	AA değişimi	PolyPhen-2													
			SIFT-skor	Humdiv-skor	Humdiv-skor	Provean	Skor	PHD-SNP-skor	Snap2	Skor	Mutation assessor	Skor	SNPs&GO	Olasılık	I-Mutant 3.0	MuPro
Rs104894779	C>T	D62N	Zararlı-0	Muhtemelen zararlı-0,999	Muhtemelen zararlı-0,998	Zararlı	-4,238	Hastalık-9	Etkili	94	-	-	Hastalık	0,918	Azalan	Azalan
Rs104894783	T>G	S128R	Zararlı-0,003	Muhtemelen zararlı-0,877	Muhtemelen zararlı-0,787	Zararlı	-2,592	Hastalık-3	Etkili	19	Nötral	0,345	Nötral	0,339	-	-
Rs587783544	C>T	G122R	-	Muhtemelen zararlı-0,991	Muhtemelen zararlı-0,916	Zararlı	-6,439	Hastalık-5	Etkili	33	-	-	Hastalık	0,561	Azalan	Azalan
Rs866659463	T>A	K134N	-	Muhtemelen zararlı-0,779	Muhtemelen zararlı-0,699	Zararlı	-	Hastalık-7	Etkili	44	Yüksek	4,07	Hastalık	0,663	Azalan	Azalan
Rs61729440	C>G	R89P	Zararlı-0,003	Muhtemelen zararlı-0,997	Muhtemelen zararlı-0,990	Zararlı	-5,505	Hastalık-8	Etkili	63	-	-	-	-	Azalan	-

ND: Nükleotid değişimi, AA: Amino asit değişimi, Humdiv-Humvar=Polyphen2.

Not: 0-0,500 arası zararsız, 0,500-1,000 arası zararlı.

nuldu ve toplam 8 zararlı SNP elde edildi. PolyPhen-2 programında, HumDiv; 115 zararlı, HumVar; 103 zararlı sonuca ulaşıldı. Provean programında 112 SNP'nin zararlı olduğu sonucuna ulaşıldı. PhD-SNP veri tabanında 77 hastalık etkili sonuca, Mutation Assessor programında 15 yüksek, 52 orta derecede zararlı etkili SNP sonucu bulundu. SNAP2, 79 zararlı etkili sonuç verdi. SNPs&GO'da 83 SNP'nin hastalık yapıcı etkisi olduğu sonucuna ulaşıldı (Tablo 1, Şekil 3, Tablo 2, Tablo 3).

DCX VE PAFAH1B1 GENLERİNDEKİ SNP'LERİN PROTEİN STABİLİZASYONU ÜZERİNDEKİ TAHMİNİ

DCX ve PAFAH1B1 genlerindeki SNP'lerin protein stabilizasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için I-Mutant 3.0 ve MuPro programları kullanıldı.

Protein yapısı üzerindeki etkileri araştırdığımız 7 programdan, ortak zarar verici olan SNP'lerin protein kararlılığında değişime ve azalmaya neden olduğu sonucuna ulaşıldı.

SNP SONUCU OLUŞAN AMİNO ASİTLERİN MODELLENMESİ

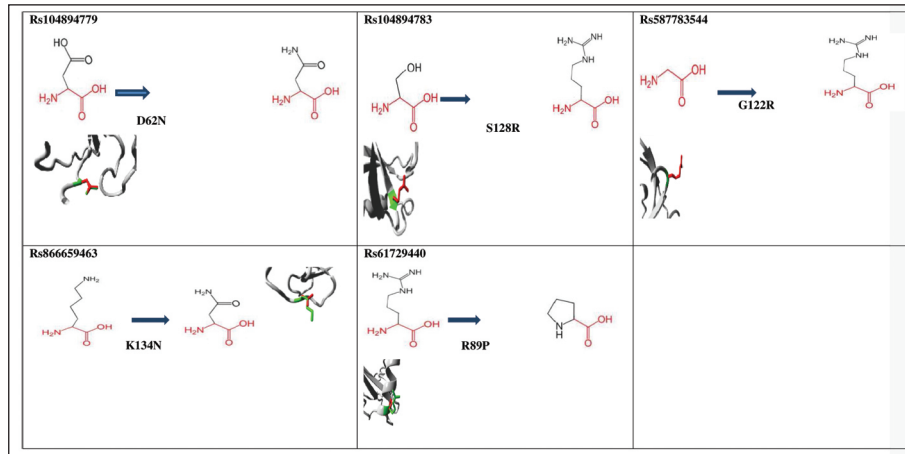
Amino asitlerin yük, boyut ve hidrofobisite özellikleri bulunmaktadır. Bu özelliklerin değişmesi, protein yapısı ve görevlerinde değişime yol açabilmektedir. Bu etkileri araştırmak için Project HOPE veri tabanı kullanıldı ve bu SNP'lerin amino asitlerde boyut, yük ve hidrofobisite değişimine yol açtığı bulundu. Bu değişim, proteinlerin çekirdeğine uyum sağlayamamasına, yük farkıyla etkileşimde olduğu molekülleri iteceği ve hidrofobisite farkından dolayı hidrojen bağlarının doğru pozisyonda oluşmamasına, dolayısıyla protein katlanma sorunlarına yol açabileceği sonucuna ulaşıldı (Şekil 3, Tablo 2, Tablo 3, Şekil 4).

MİKRORNA

MiRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin baskılanması ve bu bölgelerde SNP'nin meydana gelmesi gen ifadesinde değişikliğe yol açıp, çeşitli hastalıkların ortaya çıkma ihtimalini artırabilme özelliğine sahiptirler.¹³ Human Disease MikroRNA Database v3.2 veri tabanı kullanıldı. Bu genlerin miRNA'larındaki değişimin otizm, beyin neoplazmaları, epilepsi, şizofreni ve nöroblastoma hastalıklarıyla ilişkili olduğu sonucuna ulaşıldı. Hsa-miR-20b, hsa-miR-92a, hsa-miR-92b, hsa-miR-106b miRNA'larının aşağı regüle olduğu sonucuna ulaşıldı. Hsa-miR-106b miRNA'nın otizm, beyin neoplazmaları, epilepsi, şizofreni ve nöroblastoma hastalıklarıyla ilişkili olduğu, hsa-miR-20b'nin şizofreni patogeneziyle ilişkili olduğu bulundu.

TARTIŞMA

Protein işlevlerinde değişikliğe neden SNP ve insan hastalıkları arasındaki ilişkiyi anlamak önemlidir. Son yıllar içerisinde modelleme



ŞEKİL 3: DCX geni zararlı SNP'lerin Project HOPE modelleme sonuçları.

TABLO 2: DCX geni Project Hope yabanıl tip ve polimorfizm sonucu oluşan amino asitlerin özellikleri.

SNP no	Amino asit değişimi	Yabanıl amino asit özellikleri			Yeni oluşan amino asit özellikleri		
		Boyut	Yük	Hidrofobisite	Boyut	Yük	Hidrofobisite
Rs104894779	D62N	-	(-)yük	-	-	Nötr yük	-
Rs104894783	S128R	<	(-)yük	>	>	(+)yük	<
Rs587783544	G122R	<	Nötr yük	>	>	(+)yük	<
Rs866659463	K134N	>	(+)yük	-	<	Nötr yük	-
Rs61729440	R89P	>	(+)yük	<	<	Nötr yük	>

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi.

yaklaşımları biyoloji ve tıp alanında, hayvan deneyleri ve laboratuvar uygulamalarının iyileştirilmesi ve verimli şekilde yapılabilmesi için önemli hâle gelmiştir.¹⁴

Bu çalışmada, DCX ve PAFH1B1 genlerindeki yanlış anlamlı SNP'lerin protein fonksiyonu üzerindeki etkisi SIFT, PolyPhen-2, Provean, SNPs&GO, Mutation assessor, PhD=SNP, SNAP2 *in silico* araçlarıyla analiz edildi. Bir veri tabanında bulunan sonucun, diğer veri tabanlarında yeniden analiz edilerek daha kapsamlı ve doğru sonuç elde etmek amacıyla fonksiyon analizi için farklı programlar kullanılmıştır.

Protein stabilizasyonu üzerindeki etki, I-Mutant 3.0 ve MuPro programlarıyla analiz edildikten sonra protein 3 boyutlu modellemesi ve boyut, yük ve hidrofobisite değişimleriyle ilgili bilgiler için Hope programına sunuldu (Tablo 2, Tablo 3, Şekil 4, Tablo 4).

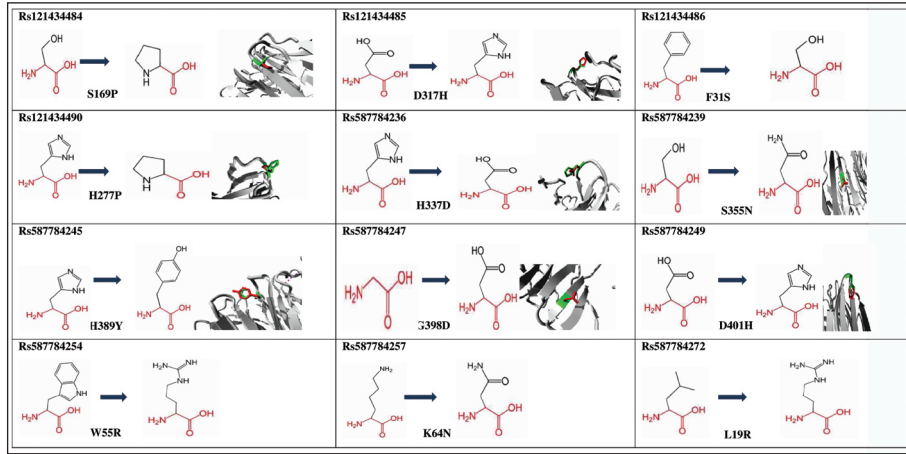
DCX geninde 189 yanlış anlamlı SNP'den; D62N(rs104894779), S128R (rs104894783), G122R (rs587783544), K134N (rs866659463), R89P (rs61729440) bu rs kodlu olan amino asit değişimlerinin protein fonksiyonu üzerinde en yüksek zarar verici etkisi olduğu bulundu. Bu 5 SNP, I-Mutant 3.0'da analiz edildiğinde; D62N (rs104894779), G122R (rs587783544), K134N (rs866659463), R89P (rs61729440) SNP'lerinin protein kararlılığını azalttığı sonucuna ulaşıldı. MuPro programı analizinde; D62N (rs104894779), G122R (rs587783544), K134N (rs866659463) SNP'lerinin protein kararlılığını azalttığı sonucuna ulaşıldı. Hope modellemesi ile bu SNP'lerin boyut, yük ve hidrofobisite değişimleri gösterildi. DCX geni, D62N (rs104894779), S128R (rs104894783), G122R (rs587783544), K134N (rs866659463) ve R89P (rs61729440) SNP'lerinde yeni oluşan kalıntıdaki boyut farkı etkileşim kaybına, yük farkı yabanıl tip amino asidin etkileşimde olduğu moleküllerin itilmesine,

TABLO 3: PAFAH1B1 geni SIFT, Polyphen-2, Provean, PhD-SNP, SNAP2, Mutation Assessor, SNPs&GO sonuçları.

SNP no	ND	AA değişimi	SIFT-skor	Humdiv		Skor	Humvar		Skor	Provean	Skor	PhD-SNP	Skor	Snap2	Skor	Mutation ass.-skor	SNPs&GO	Olasılık	I-Mutant 3.0	MuPro
				Muhtemelen zararlı	Muhtemelen zararlı		Muhtemelen zararlı	Muhtemelen zararlı												
Rs121434484	T>C	S169P	Zararlı-0,002	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Zararlı	-4,983	Hastalık	7	Eklii	97	Yüksek-3,49	Hastalık	0,845	Azalan	Azalan	
Rs121434485	G>C	D317H	Zararlı-0	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Zararlı	-6,696	Hastalık	6	Eklii	98	Yüksek-3,555	Hastalık	0,831	Azalan	Azalan	
Rs121434486	T>C	F31S	Zararlı-0,003	0,999	Muhtemelen zararlı	0,979	Muhtemelen zararlı	0,979	Zararlı	-5,48	Hastalık	7	Eklii	85	Orta-2,97	Hastalık	0,882	Azalan	Azalan	
Rs121434490	A>C	H277P	Zararlı-0,006	1,000	Muhtemelen zararlı	0,997	Muhtemelen zararlı	0,997	Zararlı	-8,84	Hastalık	6	Eklii	94	Orta-2,01	Hastalık	0,811	Azalan	Azalan	
Rs587784236	C>G	H337D	-	0,997	Muhtemelen zararlı	0,957	Muhtemelen zararlı	0,957	Zararlı	-8,99	Hastalık	4	Eklii	83	Orta-2,635	Hastalık	0,881	Azalan	Azalan	
Rs587784239	G>A	S355N	-	0,944	Muhtemelen zararlı	0,920	Muhtemelen zararlı	0,920	Zararlı	-2,896	Hastalık	1	Eklii	56	Yüksek-4,245	Hastalık	0,76	Azalan	Azalan	
Rs587784245	C>T	H389Y	-	0,999	Muhtemelen zararlı	0,979	Muhtemelen zararlı	0,979	Zararlı	-4,322	Hastalık	0	Eklii	34	Orta-2,255	Hastalık	0,724	Azalan	Azalan	
Rs587784247	G>A	G398D	-	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Zararlı	-6,175	Hastalık	3	Eklii	74	Yüksek-3,98	Hastalık	0,711	Azalan	Azalan	
Rs587784249	G>C	D401H	-	1,000	Muhtemelen zararlı	0,996	Muhtemelen zararlı	0,996	Zararlı	-6,687	Hastalık	1	Eklii	84	Yüksek-4,495	Hastalık	0,689	Azalan	Azalan	
Rs587784254	T>A	W58R	-	1,000	Muhtemelen zararlı	0,961	Muhtemelen zararlı	0,961	Zararlı	-13,635	Hastalık	5	Eklii	80	Yüksek-3,865	Hastalık	0,897	Azalan	Azalan	
Rs587784257	G>C	K64N	-	0,997	Muhtemelen zararlı	0,952	Muhtemelen zararlı	0,952	Zararlı	-4,805	Hastalık	3	Eklii	34	Orta-3,42	Hastalık	0,797	Azalan	Azalan	
Rs587784272	T>G	L19R	-	1,000	Muhtemelen zararlı	0,996	Muhtemelen zararlı	0,996	Zararlı	-5,434	Hastalık	8	Eklii	39	Orta-3,48	Hastalık	0,908	Azalan	Azalan	
Rs757993270	G>T	W55L	-	0,999	Muhtemelen zararlı	0,949	Muhtemelen zararlı	0,949	Zararlı	-12,619	Hastalık	6	Eklii	72	Yüksek-3,865	Hastalık	0,843	Azalan	Azalan	
Rs773975872	C>G	S169C	-	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Zararlı	-4,994	Hastalık	2	Eklii	55	Orta-2,72	Hastalık	0,809	Azalan	Azalan	
Rs697228864	G>A	G148E	-	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Muhtemelen zararlı	1,000	Zararlı	-7,972	Hastalık	5	Eklii	69	Orta-2,395	Hastalık	0,835	Azalan	Azalan	
Rs980416636	G>T	G350V	-	1,000	Muhtemelen zararlı	0,995	Muhtemelen zararlı	0,995	Zararlı	-8,903	Hastalık	3	Eklii	64	Orta-2,665	Hastalık	0,902	Azalan	Azalan	

Not: 0-0,500 arası zararsız, 0,500-1,000 arası zararlı.

hidrofobisitede oluşan fark ise çekirdekte oluşan hidrofobik etkileşimlerin kaybolmasına, hidrojen bağlarının oluşmamasına ve bu nedenle proteinin katlanmasında sorunlara yol açabileceği bulundu. PAFAH1B1 geni yanlış anlamalı SNP'lerden S169P (rs121434484), F31S (rs121434490), H277P (rs121434490), H337D (rs587784236), S355N (rs587784239), H389Y (rs587784245), G398D (rs587784247), D401H (rs587784249), W55R (rs587784254), K64N (rs587784257), L19R (rs587784272), W55L (rs757993270), S169C (rs773975872), G148E (rs897228864), G350V (rs980416636), Y24N (rs984548299), G49D (rs1266351305), C372Y (rs1268498334), R410C (rs1292467643), V279A (rs1395194347), H149R (rs121434482), C168Y (rs200390886), V124D (rs587784261), D129V (rs587784263), W219C (rs587784276), G224D (rs587784281), S251R (rs587784287), S313F (rs587784293), H117R (rs797045860), R6G (rs200258896), T397I (rs1131691295), K46R (rs746864477), R241W (rs906198937), L50F (rs1030320727), L146H (rs1169708134), T150I (rs1174082142), V134A (rs1259396933), A285P (rs1275216248), K217I (rs1305223107), M123T (rs1334642659) bu rs kodlu olan amino asit değişimlerinin protein fonksiyonu üzerinde zarar verici etkisi olduğu bulundu. Bu SNP'ler I-Mutant 3.0 programında analiz edildiğinde; D317H, W55L, G148E, C168Y, S251R, T397I, T150I SNP'lerinin protein kararlılığını artırdığı, diğer 34 SNP'nin protein kararlılığını azalttığı sonucuna ulaşıldı. MuPro'da T397I'nin(rs1131691295) protein kararlılığını artırdığı, diğer 40 SNP'nin protein kararlılığını azalttığı sonucuna ulaşıldı. HOPE modellemesi ile bu amino asit değişimlerinin boyut, yük ve hidrofobisitede oluşturdukları farklılıklar gös-



ŞEKİL 4: PAFAH1B1 geni zararlı SNP'lerin Project HOPE modelleme sonuçları. SNP: Tek nükleotid polimorfizmi.

terildi. *DCX* geni için zararlı olduğu bulunan yanlış anlamlı SNP, *PAFAH1B1* geni için zararlı olduğu bulunan yanlış anlamlı SNP ile ilgili *in silico* çalışma gösterilmemiştir. Bundan dolayı bu çalışma, *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki yanlış anlamlı SNP'lerin etkilerini inceleyen ilk *in silico* analizdir.

X'e bağlı lizensefalili hastalardan hazırlanan DNA örnekleriyle *DCX* geni ve mutasyon arasındaki etkileşim için mutasyonel analiz daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda, bazı hastaların dizi analizinde çerçeve kayması mutasyon olduğu bildirilmiştir.¹⁵ *PAFAH1B1* ve *DCX* genlerinde çift mutant fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, gelişim sırasında farelerin hipokampus, serebellum ve kortikal alanlarda düzensizlikler olduğu gösterilmiştir.¹⁶ PAF asetilhidrolazın düzenleyici alt birimi olan LIS1 üzerine yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, LIS1 mutant farelerin serebellar hücre göçü kusurları olduğu gösterilmiştir.

PAF reseptör eksikliği olan farelerde ise embriyonik beyincikte histolojik anormallikler olduğu gösterilmiştir.¹⁷

Göç mekanizması ile ilgili yapılan *in utero* elektroporasyon ve RNAi çalışması, *DCX* ve *PAFAH1B1*, RNAi'sinin ön beyin gelişimi esnasında amigdala ve piriform kortekse olan göçü bozduğu ve birçok nöronun amigdala bölgesinde birikmesine neden olduğu gösterilmiştir.¹⁸ Subkortikal bant heterotopi hastalarının *DCX* ve *LIS1* genlerinin DNA sekans analizinde incelenen 11 erkek çocuğunun

3'ünde, yanlış anlamlı mutasyon olduğu tespit edilmiştir.¹⁹

Çalışmamızda *DCX* geni; S128R (rs104894783), G122R (rs587783544) değişimlerinde bir yük ve hidrofobisite farkı getirmiştir. Bu yük değişimi ve hidrofobisite, proteinin işlevi için gerekli olan katlanmada sorunlara yol açabilir. Yük değişiminin, diğer amino asitler arasında itmeye neden olabileceği belirtilir. G122R (rs587783544) değişimi, en esnek amino asit olan glisinin değişimidir. Bu değişimin, omurgada konformasyonel değişime ve omurga yapısının bozulmasına neden olabileceği sonucuna ulaşıldı. K134N (rs866659463) değişiminde boyut farkı oluşmuştur. Boyut farkı, hidrojen bağlarının doğru pozisyonda olmamasına neden olur. Hidrojen bağları, molekülün kararlı olabilmesi için çok önemlidir. Bu bağların bozulması, protein kararlılığının da bozulmasına yol açar. R89P'deki (rs61729440) değişim, çift kortin 1 etki alanı içindedir. Değişim, bu alanın işlevini bozabilmektedir. Burada yabancı tip amino asit, aynı zamanda alfa sarmalda bulunmaktadır.

Yeni kalıntı prolin alfa sarmalın ilk 3 konumunda bulunmadığından, alfa sarmalın yapısının bozulacağı ve protein üzerinde ciddi etkilerin olacağı sonucuna ulaşıldı. Yapılan çalışmada, subkortikal bant heterotopili 11 erkek çocuğu incelenmiş ve 1'inde çalışmamızda zararlı sonuç elde ettiğimiz *PAFAH1B1* geni; S169P SNP'sinde yanlış anlamlı mutasyon olduğu gösterilmiştir.²⁰

TABLO 4: PAFAH1B1 geni Project Hope yabanıl ve polimorfizm sonucu oluşan amino asitlerin özellikleri.

SNP no	Amino asit değişimi	Yabanıl amino asit özellikleri			Yeni oluşan amino asit özellikleri		
		Boyut	Yük	Hidrofobisite	Boyut	Yük	Hidrofobisite
Rs121434484	S169P	<	-	<	>	-	>
Rs121434485	D317H	<	(-)yük	-	>	Nötr	-
Rs121434486	F31S	>	-	>	<	-	<
Rs121434490	H277P	>	-	<	<	-	>
Rs587784236	H337D	>	Nötr	-	<	(-)yük	-
Rs587784239	S355N	<	-	>	>	-	<
Rs587784245	H389Y	<	-	<	>	-	>
Rs587784247	G398D	<	Nötr	>	>	(-)yük	<
Rs587784249	D401H	<	(-)yük	-	>	Nötr	-
Rs587784254	W55R	>	Nötr	>	<	(+)yük	<
Rs587784257	K64N	>	(+)yük	-	<	Nötr	-
Rs587784272	L19R	<	Nötr	>	>	(+)yük	<
Rs757993270	W55L	>	-	-	<	-	-
Rs773975872	S169C	-	-	<	-	-	>
Rs897228864	G148E	<	Nötr	>	>	(-)yük	<
Rs980416636	G350V	<	-	<	>	-	>
Rs984548299	Y24N	>	-	>	<	-	<
Rs1266351305	G49D	<	Nötr	>	>	(-)yük	<
Rs1268498334	C372Y	<	-	>	>	-	<
Rs1292467643	R410C	>	(+)yük	<	<	Nötr	>
Rs1395194347	V279A	>	-	-	<	-	-
Rs121434482	H149R	<	Nötr	-	>	(+)yük	-
Rs200390886	C168Y	<	-	>	>	-	<
Rs587784261	V124D	<	Nötr	>	>	(-)yük	<
Rs587784263	D129V	>	(-)yük	<	<	Nötr	>
Rs587784276	W219C	>	-	-	<	-	-
Rs587784281	G224D	<	Nötr	>	>	(-)yük	<
Rs587784287	S251R	<	Nötr	>	>	(+)yük	<
Rs587784293	S313F	<	-	<	>	-	>
Rs797045860	H117R	<	Nötr	-	>	(+)yük	-
Rs200258896	R6G	>	(+)yük	<	<	Nötr	>
Rs1131691295	T397I	<	-	<	>	-	>
Rs746864477	K46R	<	-	-	>	-	-
Rs906198937	R241W	<	(+)yük	<	>	Nötr	>
Rs1030320727	L50F	<	-	-	>	-	-
Rs1169708134	L146H	<	-	>	>	-	<
Rs1174082142	T150I	<	-	<	>	-	>
Rs1259396933	V134A	>	-	-	<	-	-
Rs1275216248	A285P	<	-	-	>	-	-
Rs1305223107	K217I	>	(+)yük	<	<	Nötr	>
Rs1334642659	M123T	>	-	>	<	-	<

>=daha büyük, <=daha küçük.

Çalışmamızda, S169P (rs121434484) değişiminde boyut ve hidrofobisite farkından dolayı hidrojen bağlarının kaybına ve doğru katlanmanın

bozulmasına neden olacağı ve amino asit değişimi diğer moleküllerin bağlanması için önemli olan bir alanda bulunduğundan, bu alanın işlevinin bozulabi-

leceği sonucuna ulaşıldı. Başka bir çalışmada ise yine bizim de çalışmamızda gösterdiğimiz rs121434486 kodlu F31S SNP’de hücre fenotipinde proteinin aşırı ekspresyonuyla değiştirilebileceği gösterilmiştir.²¹ F31S değişimi, LisH alanında gerçekleşmiştir. Değişim, bu alanın işlevini bozabilir. Oluşan boyut ve hidrofobisite farkının, etkileşim kaybına ve protein katlanma sorunlarına sebep olabileceği gösterilmiştir.

Manyetik rezonans görüntülemesinde, pakigiri (düz girus) ve subkortikal bant heterotopisi gözlenen, nöbet ve global gelişim geriliği ile kliniğe başvuran 5 yaşındaki erkek çocuk hastada, *PAFAH1B1* (LIS-1) geni dizi analizinde, çalışmamızda da gösterdiğimiz H389Y (rs587784245) mutasyonu tanımlanmıştır.²²

Bu çalışmada, H389Y değişiminde boyut ve hidrofobisitede fark olduğu ortaya koyulmuştur. Bu fark, hidrojen bağ oluşumunu etkilemekte ve protein kararlılığını bozabilmektedir. Aynı zamanda buradaki amino asit değişimi dynein-dynactin etkileşim bölgesinde gerçekleşmiştir. Değişim bu alanı etkileyip, protein işlevini bozabileceği sonucu elde edildi.

Yine yapılan başka bir çalışmada, anne ve babası akraba olan, miyastenik semptomlar görülen 8 yaşındaki bir erkek çocukta, yine bu çalışmada analiz edilen W55R (rs587784254) mutasyonu gösterilmiş, aynı aileden doğan ve benzer şekilde etkilenen 3 kardeşin de bebeklik dönemlerinde öldüğü bildirilmiştir.²³ Bu çalışmada gösterilen rs587784254 kodlu W55R değişiminde oluşan yük değişimi, aynı yüke sahip ligandların veya diğer kalıntıların itilmesine neden olabilir. Buradaki amino asit değişimi, NDEL1 ile etkileşimin olduğu bölgede yer aldığından, amino asit değişimi bu bölgenin işlevini bozabilir. Bu çalışmada gösterdiğimiz diğer SNP’lerde de boyut, yük, hidrofobisite ve etkileşim alanlarında değişim olduğu sonucuna ulaşıldı. Boyut farkının, protein çekirdeğine gömülü olan yabancı tip amino asitlerde yeni kalıntının daha büyük olduğu durumda bu bölgeye sığmayıp hidrojen bağlarının oluşmamasına ve dolayısıyla protein kararlılığında bozulmalara yol açacağı, daha küçük olduğu durumda etkileşim kaybına yol açacağı sonucuna ulaşıldı. Yük farkının etkileşim hâlinde olan diğer moleküllerde itmeye ve etkileşim kaybına, hidrofobisite farkında ise proteinde kat-

lanma sorunlarına neden olabileceği sonucuna ulaşıldı.

Bir miRNA birçok genin düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Çeşitli araştırmalar, miRNA’ların embriyonik gelişim, hücre çoğalması, hücre farklılaşması gibi birçok süreçte önemli düzenleyiciler olarak görev aldığı bildirilmiştir.²⁴ *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerinin santral sinir sistemi hastalıkları ve miRNA ilişkisini araştırmak için, Human Disease MikroRNA Database v3.2 veri tabanı kullanıldı.

Bu genlerle ilişkili hsa-miR-20b, hsa-miR-92a, hsa-miR-106b miRNA’larının ilişkide oldukları genleri aşağı regüle ettiği sonucuna ulaşıldı. Ve hsa-miR-106b’nin otizm, beyin neoplazmaları, epilepsi, şizofreni, nöroblastoma hastalıkları ile hsa-miR-20b’nin yine şizofreni patogeneğinde etkili olduğu gösterildi.

DCX ve *PAFAH1B1* genlerinin embriyonik dönemde beyin gelişimi esnasında nöron göçü ve hücre hareketleriyle ilişkili olan mikrotübülleri düzenleyip stabilize ettiği düşünülmektedir.² Ancak bu genlerin SNP’leriyle ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmada araştırılan genlerin yanlış anlamlı SNP’leri farklı parametreler ve farklı yazılımlar kullanılarak, embriyonik dönem beyin gelişimiyle ilgili genlerin protein fonksiyon ve stabilitesi üzerindeki etkileri gösterildi.

SONUÇ

Bu çalışma, yanlış anlamlı zararlı SNP’lerin *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri üzerine etkilerini belirlemek için yapılan ilk *in silico* analizidir. Bu sonuçlar, gelişimsel beyin malformasyonlarının ve embriyonik gelişim esnasında oluşan bozuklukların ileri yaş dönemlerinde ortaya çıkan nörodejeneratif ve diğer beyin hastalıklarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak ve deneysel çalışmalar için SNP seçiminde önem taşımaktadır. Bu genlerdeki SNP’lerin belirlenmesi; lizensefali, subkortikal bant heterotopisi, epilepsi, otizm, şizofreni, nöroblastoma, beyin neoplazmaları ve gelişimsel beyin hastalıkları gibi pek çok santral sinir sistemi hastalıklarının prelinik çalışmalarında çeşitli hayvan modellerine de katkıda bulunup, yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini sağlaya-

caktır. Tedavilerde yeni terapötik hedeflerle farmakogenomik araştırmalarına yardımcı olabilir. Gelişimsel beyin malformasyonlarının ve embriyonik gelişim esnasında oluşan malformasyonların ve bu malformasyonların sebep olabileceği ileri yaş dönemlerinde ortaya çıkan beyin hastalıklarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir. Bu sebeple bu çalışmadaki SNP'lerin belirlenmesi önemlidir ve çalışmadaki sonuçlar, prelinik ve klinik çalışmaların önünü açarak destekleyecektir.

Birçok *in silico* analiz aracıyla farklı parametrelerle yapılan bu çalışmadan anlaşılmaktadır ki *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki amino asit değişimlerinin, fonksiyonel etkilerini araştırmak için kullanılan 7 veri tabanından ortak zarar verici olanlar değerlendirildi. İleri stabilite analizleri ve Project hope modellemesi için sadece ortak zarar verici olanlar (*DCX* geni için 5 SNP, *PAFAH1B1* geni için 41 SNP) analiz edildi. Bu çalışmada, *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerindeki fonksiyonel SNP'lerin etkisi, kapsamlı olarak çeşitli *in silico* araçlarıyla araştırılmıştır. *DCX* ve *PAFAH1B1* genlerinin kodladıkları proteinlerdeki yapısal ve işlevsel değişikliklerinden, *DCX* geninde ortak zarar verici olan 5 SNP'nin (D62N, S128R, G122R, K134N, R89P), *PAFAH1B1* geninde ortak zarar verici olan 41 SNP'nin (S169P, D317H, F31S, H277P, H337D, S355N, H389Y, G398D, D401H, W55R, K64N, L19R, W55L, S169C, G148E, G350V, Y24N, G49D, C372Y, R410C, V279A,

H149R, C168Y, V124D, D129V, W219C, G224D, S251R, S313F, H117R, R6G, T397I, K46R, R241W, L50F, L146H, T150I, V134A, A285P, K217I, M123T) yüksek zarar verici etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Teşekkür

Bu araştırma aşamasında, teorik bilgilerinden faydalandığım başta Prof. Dr. Sultan TARLACI, Dr. Tuğba KAMAN'a ve Anaksimandros'tan bugüne bilim dünyasının inşası için çabalayan tüm bilim adamlarına ve son olarak bugüne kadar bana maddi ve manevi destek olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Zare I, Paul D, Moody S. Doublecortin mutation in an adolescent male. *Child Neurol Open*. 2019;6:2329048X19836589. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Aydın K. Bölüm 14: Çocuklarda kortikal gelişimsel malformasyonlar. Tatlı B, Özmen M, editörler. *Yenidoğan Nörolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2016. p.201-28.
- Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E. The doublecortin gene family and disorders of neuronal structure. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010;10(1):32-46. [Crossref] [PubMed]
- Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, et al. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*. 1996;47(2):331-9. [Crossref] [PubMed]
- Pinard JM, Motte J, Chiron C, Brian R, Andermann E, Dulac O. Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(8):914-20. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, et al. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet*. 1998;7(13):2029-37. [Crossref] [PubMed]
- Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, et al. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum Mutat*. 2007;28(11):1055-64. [Crossref] [PubMed]
- Guedes-Dias P, Holzbaur ELF. Axonal transport: driving synaptic function. *Science*. 2019;366(6462):eaaw9997. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Tanrıdağ O, Dil, Konuşma ve Davranışlar Açısından Çocuk Beyninin Gelişimi ve Nörogelişimsel Problemler. Bölüm 4. *Beyin gelişiminden psikiyatriye ve geriatriye giden yol*. 1. Baskı. İstanbul: Üsküdar Üniversitesi Yayınları; 2018. p.67-70.

10. Geschwind DH, Robidoux J, Alarcón M, Miller BL, Wilhelmsen KC, Cummings JL, et al. Dementia and neurodevelopmental predisposition: cognitive dysfunction in presymptomatic subjects precedes dementia by decades in frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. 2001;50(6):741-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Murray RM, Lewis SW. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;295(6600):681-2. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
12. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
13. Pappalardo F, Russo G, Tshinanu FM, Viceconti M. In silico clinical trials: concepts and early adoptions. *Brief Bioinform*. 2019;20(5):1699-708. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, et al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998;92(1):63-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
15. Pramparo T, Youn YH, Yingling J, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in Dcx mutant mice are exacerbated by Lis1 reduction. *J Neurosci*. 2010;30(8):3002-12. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
16. Tokuoka SM, Ishii S, Kawamura N, Satoh M, Shimada A, Sasaki S, et al. Involvement of platelet-activating factor and LIS1 in neuronal migration. *Eur J Neurosci*. 2003;18(3):563-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Bai J, Ramos RL, Paramasivam M, Siddiqi F, Ackman JB, LoTurco JJ. The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain. *Dev Neurosci*. 2008;30(1-3):144-56. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Pilz DT, Kuc J, Matsumoto N, Bodurtha J, Bernadi B, Tassinari CA, et al. Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(9):1757-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
19. Caspi M, Coquelle FM, Koifman C, Levy T, Arai H, Aoki J, et al. LIS1 missense mutations: variable phenotypes result from unpredictable alterations in biochemical and cellular properties. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38740-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Mineyko A, Doja A, Hurteau J, Dobyns WB, Das S, Boycott KM. A novel missense mutation in LIS1 in a child with subcortical band heterotopia and pachygyria inherited from his mildly affected mother with somatic mosaicism. *J Child Neurol*. 2010;25(6):738-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Shen XM, Brengman JM, Edvardson S, Sine SM, Engel AG. Highly fatal fast-channel syndrome caused by AChR ϵ subunit mutation at the agonist binding site. *Neurology*. 2012;79(5):449-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
22. Felekis K, Touvana E, Stefanou Ch, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14(4):236-40. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
23. Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, et al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex*. 2003;13(6):620-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 1999;23(2):257-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]