

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİNDE APOLİPROTEİN E (APO E)  
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gürler AKPINAR**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır

**KOCAELİ  
2006**



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLON KANSERİNDE APOLİPOPROTEİN E (APO E)  
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gürler AKPINAR**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır

Danışman: Prof.Dr. Ali SAZCI

KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi  
tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: 2005/32

KOCAELİ  
2006

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Recep ÖZGÜLTEKİN

İMZA

Üye Prof. Dr. Ali SAZCI (Danışman)

İMZA

Üye Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ

İMZA

Üye Prof. Dr. N. Zafer CANTÜRK

İMZA

Üye Yrd. Doç. Dr. Kıvanç ERGEN

İMZA

---

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

..../..../2006

Prof. Dr. Emin Sami ARISOY

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### **Kolon Kanserinde Apolipoprotein E(APOE) Gen Polimorfizminin Araştırılması**

Apolipoprotein E (Apo E) pek çok serum lipoprotein ailesinin yapısal parçasıdır ve lipid metabolizmasında önemli yere sahiptir. APO E geni;  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  olarak tarif edilen üç yaygın allele sahiptir, bunlar da üç ayrı protein izoformunu kodularlar (E2, E3 ve E4). APO E polimorfizmi kliniksel olarak anlamlıdır.

Tezin amacı; kolon kanserinde Apolipoprotein E gen polimorfizminin rolünü araştırmaktır. Çalışmadaki temel soru; kolon kanser hastaları ve raslantısal seçilmiş sağlıklı bireyler arasındaki yaygın APO E allellerinin frekanslarını karşılaştırmaktır. Çalışmadaki hasta grubu radyoterapi ve/veya kemoterapi görmemiş hastalar arasından seçildi.

Bu çalışmada 112. ve 158. amino asitlerini içeren gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. APO E genotipleri restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ile belirlendi. PCR ile çoğaltılmış ürünler *Hin6I* restriksiyon enzimi ile kesilerek poliakrilamid jellerde elektroforezleri yapıldı.

APO E genotipleri Türkiye'nin Kocaeli bölgesindeki 222 kolon kanseri ve 300 sağlıklı kontrolden elde edildi. Bu gruplardan elde edilen genotipler karşılaştırıldığı zaman; kolon kanserli hastalarla bir bağlantı gözlenmedi (OR=1.011; %95 CI=0.713-1.434; P=0.94). Kontrollerde ki APO E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 ve E4/4 genotiplerinin dağılımı sırası ile %0.3, %12, %5.3, %65, %16.7 ve %0.7 iken, kolon hastalarındaki dağılımı sırası ile %0.0, %13.5, %1.8, %68.6, %15.3 ve %0.9 olarak bulundu.  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  allellerinin frekanslarına bakıldığında ise kontrol grubunda sırası ile %9, %79.33 ve %11.67 iken hasta grubunda ise %7.65, % 82.88 ve %9.45 olarak gözlemlendi. Allel frekansları Hary-Weinberg dengesine uygun olduğu bulundu. Sonuç olarak; APO E gen polimorfizmi Türkiyedeki kolonkanseri için bir risk faktörü oluşturmadığı tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** APO E geni, polimorfizm, kolon kanser, bağlantı

## ABSTRACT

### **The Investigation of Apolipoprotein E (APOE) Gene Polymorphism in Colon Cancer**

Apolipoprotein E (Apo E) is a structural constituent of several serum lipoprotein families. It plays an important role in lipid metabolism. APO E gene has three common alleles called  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$ , which code for three protein isoforms (E2, E3 and E4). The polymorphism is clinically significant.

The aim of the thesis was to investigate the role of Apolipoprotein E gene polymorphisms in the colon cancer. The main question of the study was to compare the frequency of common APO E alleles between colon cancer patients and randomly selected healthy individuals. In this study, the patient group was chosen among those who did not receive radiotherapy and/or chemotherapy before.

In the present study, APOE gene coding for amino acid residues 112 and 158 were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA extracted from blood samples. APO E genotypes were determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The amplification products were digested with *Hin6I* and subjected to electrophoresis on polyacrylamide gels.

APO E genotype was determined in 222 patients with colon cancer and 300 healthy controls from Kocaeli region of Turkey. When alleles and genotypes of 222 patients with colon cancer were compared with those of 300 healthy controls. No association was obtained in patients with colon cancer (OR=1.011; %95 CI=0.713-1.434; P=0.94). The distribution of the APO E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 and E4/4 genotypes was %0.3, %12, %5.3, %65, %16.7 and %0.7 in controls and %0.0, %13.5, %1.8, %68.6, %15.3 and %0.9 in patients with colon cancer respectively. The frequency of the  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  alleles was %9, %79.33 and %11.67 in the controls and %7.65, % 82.88 and %9.45 in patients with colon cancer respectively. The allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. In conclusion, APO E gene polymorphism is not a genetic risk factor for colon cancer in Turkey.

**Key words:** APO E gene, polymorphism, colon cancer, association

## TEŞEKKÜR

İki doktora tezi yazacak kadar emek verdiğim bu uzun ve zorlu süreçte yalnızca bilimsel ve teknik tecrübesi ile değil aynı zamanda dostluğu ile her zaman yanımda olan sevgili hocam, tez danışmanım ve dostum Prof. Dr. Ali SAZCI'ya,

Sıkıntı ve güçlükleri birlikte aştığım çalışma arkadaşım ve dostum Arş. Gör. Emel ERGÜL'e,

Tezin yapılmasındaki emeklerinin yanında her zaman, her konuda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. N. Zafer CANTÜRK'e ve Prof. Dr. N. Zafer UTKAN'a,

Bu uzun tez dönemini bitirmemi sabırla bekleyen arkadaşlarıma ve her zaman, her güçlükte yanımda olan Eşime ve Aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005/32)

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	1
1.1. Kolonun anatomisi	1
1.2. Kolon Kanseri	2
1.3. Etiyolojisi	6
1.3.1. Yüksek Yağlı Diet ve Safra Asitleri	6
1.3.2. DiyetSEL Lif, Sebze ve Meyve	7
1.3.3. Kalsiyum ve Vitaminler	7
1.3.4. Postmenaposal Hormon Kullanımı ve NSAID	8
1.3.5. Alkol Tüketimi, Sigara Kullanımı ve Fiziksel Aktivite	9
1.3.6. Kırmızı Et Tüketimi	9
1.4. Patolojisi	10
1.5. Prognozu	11
1.6. Kolon Kanserindeki Spesifik Mutasyonlar	11
1.6.1. RAS Geni	11
1.6.2. SRC Geni	12
1.6.3. APC Geni	12
1.6.4. p53 Geni	13
1.6.5. DCC Geni	13
1.6.6. MYH Geni	13
1.6.7. Yanlış Eşleşme Tamir Genleri	14
1.6.8. Kolorektal Kanselerde Allelik Kayıplar	15
1.7. Mutasyon ve Polimorfizm	15
1.7.1. Genetik Polimorfizm	18



1.7.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi	19
1.8. Apo E ve SNP	19
1.9. Lipoproteinler	21
1.10. Apolipoproteinler	22
1.11. Apolipoprotein E (APO E) geni	23
1.11.1. Apo E Varyantları	26
1.11.2. Apo E'nin Genetik Polimorfizmi	27
1.11.3. Apo E'nin Biyosentezi	29
1.11.4. Apo E'nin Protein Yapısı	30
1.11.5. Apo E Genotipi ve Plazma Lipoprotein-Lipid Seviyeleri	33
1.12. Apo E ile İlişkili Hastalıklar	34
1.12.1. Apo E ve Tip III Hiperlipidemia	34
1.12.2. Apo E ve Arteriosklerozis	36
1.12.3. Apo E ve Kardiyovasküler Hastalıklar	37
1.12.4. Apo E ve Kanser	38
1.12.5. Apo E ve Nörodejeneratif Hastalıklar	40
1.13. APO E Geninin Evrimi ve Dünya Popülasyonlarındaki Dağılımı	42
2. AMAÇ VE KAPSAM	45
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	47
3.1. Gereçler	47
3.1.1. Enzimler	47
3.1.2. Primerler	47
3.1.3. Kimyasallar	47
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	48
3.1.4.1. DNA İzolasyon Çözeltileri	48
3.1.4.2. Elektroforez Solüsyonları	49
3.1.4.3. Gümüş Boyama Solüsyonları	49
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	49
3.1.6. Hasta Grubu	50
3.1.7. Kontrol Grubu	50
3.2. Yöntemler	50
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	50

3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü	52
3.2.3. PCR Protokolü	52
3.2.3.1. PCR Koşulları	53
3.2.3.2. RFLP	53
3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi	54
3.2.3.2.2. Gümüş Boyama	54
3.2.4. İstatiksel Analiz	55
4.BULGULAR	57
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>APO E</b>	Apolipoprotein E geni
<b>Apo E</b>	Apolipoprotein E proteini
<b>bp</b>	Baz çifti (base pair(s))
<b>CAD</b>	Koroner arter hastalığı (Coronary artery disease)
<b>CE</b>	Kolesterol ester
<b>CHD</b>	Koroner kalp hastalığı (Coronary heart disease)
<b>FFA</b>	Serbest yağ asiti
<b>FH</b>	Familial Hypercholesterolemia
<b>HDL</b>	Yüksek densiteli lipoprotein (High density lipoprotein)
<b>HSPG</b>	Heparin sülfat preteoglikan
<b>IDL</b>	Orta densiteli lipoprotein (Intermediate density lipoprotein)
<b>kDa</b>	kilo Daltons
<b>LDL</b>	Düşük densiteli lipoprotein (Low density lipoprotein)
<b>LDL-C</b>	LDL-kolesterol
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipaz
<b>LRP</b>	LDL reseptör related protein
<b>MI</b>	Myocardial infarction
<b>SNP</b>	Tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
<b>TAG</b>	Triaçilgliserol
<b>TC</b>	Total kolesterol
<b>TG</b>	Trigliserid
<b>VLDL</b>	Çok düşük densiteli lipoprotein (Very low density lipoprotein)
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>LOH</b>	Heterozigotluğun kaybolması (Loss of heterozygosity)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1:</b>	Kalın barsağın başlıca bölümleri.	2
<b>Şekil 1.2:</b>	Kolon kanserinde çok adımlı kanser gelişim modeli.	16
<b>Şekil 1.3:</b>	Apo E geni içersinde bulunan yaygın SNP'lerin lokasyonları.	20
<b>Şekil 1.4:</b>	APO E geni.	24
<b>Şekil 1.5:</b>	Apo E geni ile ilişkili Alu ailesi dizileri.	25
<b>Şekil 1.6:</b>	Apo E geninin 5'- flanking bölgesindeki ve ilk intron içersindeki regülatör diziler.	26
<b>Şekil 1.7:</b>	Apo E'nin protein yapısı.	30
<b>Şekil 1.8:</b>	Apo E Polimorfizmi ve aminoasit değişimleri.	32
<b>Şekil 1.9:</b>	Apo E allellerinin lipid parametreleri üzerine olan etkisi	35
<b>Şekil 1.10:</b>	Apolipoprotein gen evrimi için model	43
<b>Şekil 3.1:</b>	Apo E allellerinin Hin6I restriksiyon kesimi sonucu oluşan fragmentler.	56
<b>Şekil 4.1:</b>	PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.	57
<b>Şekil 4.2:</b>	Apo E'nin PCR ürünü ve Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan tüm genotipleri.	58
<b>Şekil 4.3:</b>	Analizde kullanılan Hin6I enzimi ile kesilmiş bir Apo E jel görüntüsü.	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1:</b>	Kolorektal kanser sendromlarının sınıflandırılması.	4
<b>Çizelge 1.2:</b>	Türkiye’de kadınlarda en çok görülen on kanser türü.	5
<b>Çizelge 1.3:</b>	Türkiye’de erkeklerde en çok görülen on kanser türü.	5
<b>Çizelge 1.4:</b>	Kolorektal kanserlerde rol oynayan başlıca genler ve kromozomal lokalizasyonları	14
<b>Çizelge 1.5:</b>	Kolorektal neoplazmalarda risk faktörü olarak çalışılmış polimorfizmler	17
<b>Çizelge 1.6:</b>	Lipoproteinler	21
<b>Çizelge 1.7:</b>	Apolipoproteinler ve bilinen görevleri	23
<b>Çizelge 1.8:</b>	Apolipoprotein genlerinin kromozomal lokalizasyonları .	24
<b>Çizelge 1.9:</b>	Apolipoprotein allellerinin reseptör bağlama kapasiteleri ve Tip III hiperlipidemia ile ilişkileri.	27
<b>Çizelge 1.10:</b>	Apo E allelik varyantlarındaki nükleotid ve amino asit değişimleri.	28
<b>Çizelge 1.11:</b>	Farklı populasyonlardaki Apo E allel frekansları	44
<b>Çizelge 4.1:</b>	PCR ile çoğaltılan Apo E 112. ve 158. pozisyonlardaki SNP’leri içeren gen dizisi.	59
<b>Çizelge 4.2:</b>	Apo E3/3 (112. tgc [cys] – 158. cgc [arg]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.	59
<b>Çizelge 4.3:</b>	Apo E2/2 (112. tgc [cys] – 158. tgc [cys]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.	60
<b>Çizelge 4.4:</b>	Apo E4/4 ( 112. cgc [arg] – 158. cgc [arg]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.	60
<b>Çizelge 4.5:</b>	Apo E genotiplerinin gruplara göre dağılımı.	61
<b>Çizelge 4.6:</b>	Gruplara göre allelik frekanslar.	61
<b>Çizelge 4.7:</b>	Gruplara göre cinsiyet dağılımları.	61
<b>Çizelge 4.8:</b>	Hasta grubunun lipid profilleri.	62
<b>Çizelge 4.9:</b>	Hastalara ait sigara ve alkol kullanımı	62
<b>Çizelge 4.10:</b>	Hasta grubunda gözlenen genotiplerin tümör lokalizasyonlarına göre dağılımları	63

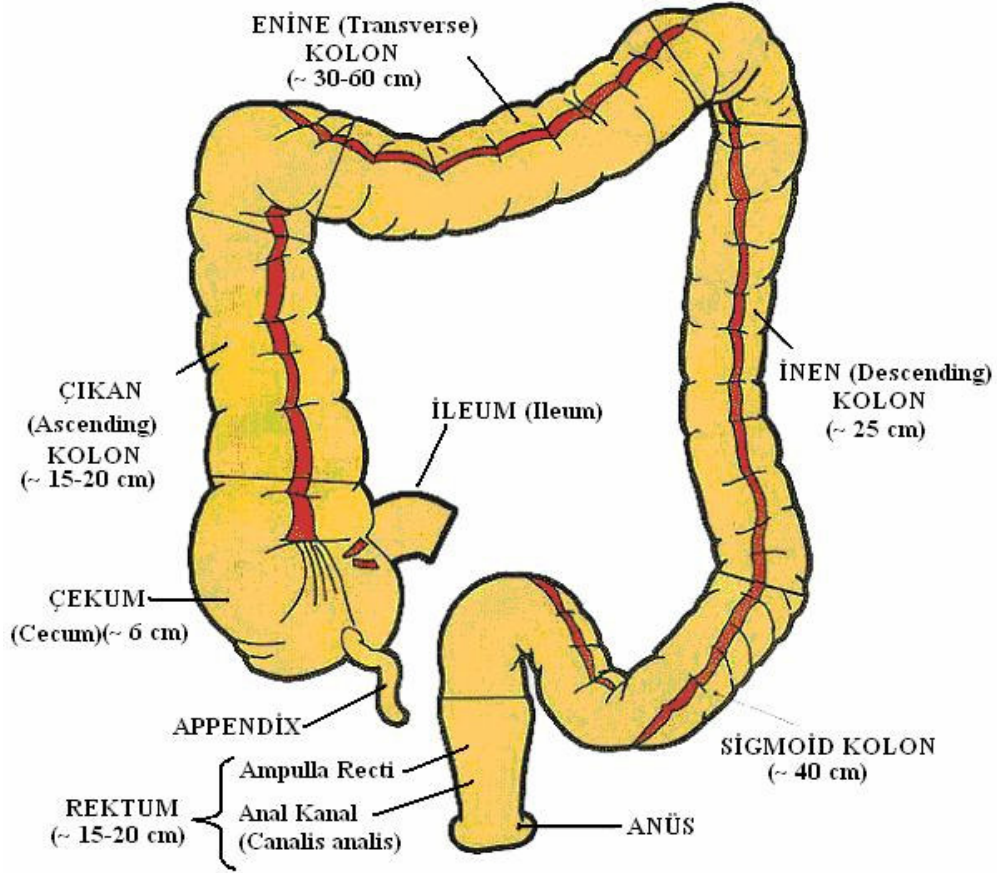
<b>Çizelge 4.11:</b>	Hasta grubundaki tümörlerin lokalizasyonu	63
<b>Çizelge 4.12:</b>	Deney gruplarının klinik özellikleri.	64
<b>Çizelge 4.13:</b>	Proksimal, distal kolon kanseri ve kontrollerdeki Apo E genotip dağılımları.	65
<b>Çizelge 4.14:</b>	Apo E genotiplerinin 65 yaş altı ve üstü dağılımları.	65
<b>Çizelge 4.15:</b>	Gruplara ve cinsiyetlere göre E3 allelinin dağılımları.	66

## 1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

### 1.1. Kolonun anatomisi

Kolon ve rektum sindirim sistemine ait organlardır, karın boşluğu ile pelviste ince barsak ve anüs arasında yer almaktadırlar. Kolonun uzunluğu erişkinlerde değişken olup ortalama olarak 150 cm civarında ve ince barsağın 1/4 uzunluğundadır. Çapı esas olarak distansiyon ile artmakla beraber, çekumda 7,5 cm olup derece derece azalarak sigmoid kolonda 2,5 cm kadar iner. Sırasıyla çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolonla devam ederek rektosigmoid köşede rektumla birleşerek kalın barsağı meydana getirir. Embriyolojik olarak çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun sağ yarısı orta barsaktan (midgut), transvers kolonun sol yarısı, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anüs ise alt barsaktan (hindgut) köken alır. Kolon, ince barsak ve kalın barsak arasındaki bağlantıyı oluşturan ileoçekal sfinkter ile başlar. Kolonun ilk parçası çekumdur, boy ve genişliği 6–8 cm olan keseleşmiş bir organdır. Appendiks, çekumun postero-medial yüzünde ileoçekal kavşağın 3 cm altında doğal bir kör uzantıdır, ortalama uzunluğu 8–10 cm olup çapı ise yaklaşık 5 mm'dir. Çıkan kolon (ascending); ileoçekal kavşaktan sağ koloik veya hepatik dönemeçe uzanmakla birlikte uzunluğu yaklaşık olarak 15 cm'dir. Enine kolon (transverse) kalın barsağın en uzun parçasıdır (45 cm) ve abdomeni çaprazlayarak geçer. Bunu takip eden kısım inen kolon (descending) oluşturur splenik dönemeçten pelvis sınırına doğru uzanır ve yaklaşık 25 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolon, pelvik kenarda desendan kolonun alt ucundan başlayarak rektumun proksimal sınırına ulaşır uzunluğu değişken olmakla birlikte (15–50 cm, ortalama 38 cm) şeklide değişkenlik gösterir. Sigmoid kolon, kalın barsağın en dar kısmıdır ve rektuma açılır. Rektum proksimal ve distal sınırları tartışılabilir olmakla beraber 12–15 cm uzunluğa sahip gibi görülmektedir. Gastrointestinal sistemin son parçası olan rektum anüsle son bulur. Kolon ve rektum birbirlerine çok yakın olmalarından dolayı bu iki organın kanserleri kolorektal kanser terimi altında birlikte tartışılır (Buğra D. 2003). Kalın barsağın fizyolojik görevleri ise şunlardır; mikroflora metabolizması ile alınan gıdaların yıkılması, su ve elektrolitlerin emilmesi, semisolid maddelerin depolanması, mikrofloral metabolizma

ile alınan materyallerin yıkılması ve feçesin rektum ve anüse doğru ilerletilmesidir. (Menteş ve ark. 2003).



Şekil 1.1: Kalın barsağın başlıca bölümleri.

## 1.2. Kolon Kanseri

Kolon kanseri; erkek ve kadında gastrointestinal sistemde yaygın olarak görülen bir hastalıktır. İnsanların %5'inin (20 kişiden 1'i) bu hastalığı geliştirme olasılığı vardır, bu nedenle bu hastalıkla ilgili çalışmalar toplum sağlığı ve hasta açısından önemli bir yer tutmaktadır. Hastalığın gerçek yaygınlığının belirlenmesi oldukça zordur, fakat yapılan popülasyon çalışmaları hastalığın yaygınlığının Avrupa ve USA'da %35, Asya ve Afrika'da ise daha düşük olarak %10-15 olarak ortaya koymaktadır. Kolon kanseri dünyada kadın ve erkeklerde gözlenen en yaygın kanser tiplerinden biridir. Kolon kanser riski 40'lı yaşlardan itibaren artmaya başlar ve 50-



55 yaşları arasında ise risk oranı keskin şekilde artış gösterir, bunu takip eden her on yılda risk iki katına çıkar ve logaritmik olarak artmaya devam eder. Kolorektal kanserler Sağlık Bakanlığının 1999 verilerine göre ülkemizde her iki cinste en sık rastlanan ikinci kanser tipidir (<http://www.saglik.gov.tr>), yine aynı şekilde 1990 verilerine göre kolon ve rektum kanserleri birlikte akciğer kanserinden sonra Avrupa ülkelerinde (Yunanistan ve Lüksemburg hariç) de ikinci sırayı almaktadır, ABD’de ise 2005 yılında yapılan araştırmalarda ise tüm kanser tipleri arasında üçüncü sıradadır. Viale ve ark., (2005) yapmış olduğu bir çalışmada ABD’de 2005 yılında erkeklerdeki bütün yeni kanser olgularından %10’nun, kadınlardaki bütün yeni kanser olgularının ise %11’nin kolorektal kanser olacağı tahmin edilmiştir. (Viale et al, 2005; Ahmed et al, 2004). Hastalığı oluşturan risk grupları içerisinde öncelikli sırayı genetik faktörler oluşturmaktadır daha sonra lifli yiyecekleri, sebze ve meyveyi, folat içeriği zengin besinleri az tüketmek, bunun yanında kırmızı et ve alkol tüketiminin fazla olması hastalık için önemli bir risk faktörüdür. Hareketsiz hayat tarzı ve sigara kullanımı ise çevresel risk faktörleri arasında yer almaktadır (Shibuya et al, 2002; <http://telescan.nki.nl/iarc.html>).

Çoğu kalın barsak kanserleri adenomatos polipler veya adenomalar içerisinde oluşur. Bu lezyonlar oldukça yaygındır. Adenomalar histolojik yapılarına göre tubular, tubular villuslar ve villuslar olarak sınıflandırılırlar. Villus değişimi; büyük (adenomaların %25’inden fazlası 1cm çapından büyüktür) ve yüksek-grade epitel displasialı (şiddetli displasia adenomatos poliplerin %5-10’da bulunmuştur) yüksek malignant potansiyel ile ilişkilidir. Adenomatos poliplerin yaklaşık %5’inin 5–10 yılı içerisinde malignant hale geldikleri sanılmaktadır.

Sporadik olan hastalarda kalıtılmış veya ailesel yatkınlık söz konusu değildir. Sporadik kolon kanserleri gözlenen kolon kanserlerinin %70’ni oluşturmaktadır ve 50 yaşından daha yaşlı kişilerde gözlenmesi daha yaygındır (yaşlanmanın olduğu kadar diyetsel ve çevre faktörlerinin de bir sonucudur). Hastaların %10’nundan daha azı kolon kanserine karşı bir kalıtılmış yatkınlığa sahiptir. Kalıtılmış kolon kanseri sendromları; hastalığın belirgin göstergesi olarak kolonik polipleri olanları (polyposis) ve olmayanları (nonpolyposis) içermektedir. Poliposis sendromları; ailesel adenomatos poliposis (FAP, familial adenomatous polyposis) ve hamartomatos poliposis sendromları (hamartomatous polyposis syndrome) olarak

ikiye ayrılırlar. Poliposis olmayan (nonpolyposis) sendromlar öncelikle kalıtsal poliposis olmayan kolorektal kanseri (HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer) (Lynch syndrome I) ve kanser aile sendromunu (the cancer family syndrome) (Lynch syndrome II) içerirler. Üçüncü ve en az anlaşılan kolon kanser geliştirme şekli ise ailesel kolon kanserleri (familial colon cancer) olarak bilinmektedir. Etkilenmiş ailelerde, kolon kanseri geliştirme sıklığı sporadik kolon kanserlerine göre çok daha fazladır, fakat ailedeki bu hastalığın kümelenmesi ve kalıtım şekli kalıtılmış kanser sendromundaki patterne benzememektedir. Kolon kanserli tüm vakaların %25'e yakını bu grup içerisinde yer almaktadır.

**Çizelge 1.1:** Kolorektal kanser sendromlarının sınıflandırılması.

<b>KALITIMSAL (hereditary) POLİPOZİS SENDROMLARI</b>
<b>a). Adenomatöz polipozis sendromları</b> -Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) (APC gen mutasyonları) Gardner sendromu Turcot sendromu (medullablastoma ile beraber) Attenuated ailesel adenomatöz polipozis (AFAP) -MYH bağlantılı polipozis (MAP) (MYH gen mutasyonları)
<b>b). Hamartomatöz polipozis sendromları</b> -Peutz-Jeghers sendromu (LKB/STK11 gen mutasyonları) -Juvenil polipozis (SMAD4 gen mutasyonları) -Cowden sendromu (PTEN gen mutasyonları)
<b>KALITIMSAL OLMAYAN (nonhereditary) POLİPOZİS SENDROMLARI</b>
-Cronkhite-Canada sendromu -Hiperplastik polipozis sendromu -Lemfomatöz polipozis -Nodüler lenfoid hiperplazi
<b>NON-POLİPOZİS SENDROMLARI (MMR gen mutasyonları)</b>
-Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC-Lynch sendromu) -Muir-Torre sendromu -Turcot sendromu (glioblastoma ile beraber)

FAP otozomal dominant geçiş gösteren kolon ve rektumda diffüz adenomatöz polipler yanında çeşitli üst gastrointestinal sistem ve ekstra intestinal belirtiler ile karakterize kalıtsal bir sendromdur. FAP germline mutasyon ile geçiş gösterir, ancak sporadik olgularda söz konusudur. Erişkin dönemden itibaren kanserleşme riski başlar, 20 yaş civarındaki olgularda kolorektal kanser oranı %7 kadardır. Puberteden önceki dönemde polip ve kanser gelişimi çok nadirdir. Puberte ve adolesan dönemde gelişen kanser olgularının prognozu kötüdür. FAP'lı olgularda kolorektal kanser

geliştirme riski 30'lu yaşlardan itibaren artar ve 40'lı yaşlarda tüm olgular kanserleşmiş olur. FAP'ta, normal fonksiyonu normal apoptozisin gerçekleşmesini sağlayan APC geninde mutasyon gözlenir. HNPCC'de kansere yatkınlık, DNA onarım genleri olarak bilinen genlerden birinin (MLH1, MSH2, PMS1, PMS2 veya MSH6) kalıtılan mutasyonu ile yakın ilişkilidir. (Fearnhead et al, 2001; Molatore ve Ranzani 2004; Midgley ve Kerr 1999).

**Çizelge 1.2:** Türkiye'de kadınlarda en çok görülen on kanser türü,1999.

ORGANLAR	VAK'A	%	İNSİDANS(Yüzbinde)
Meme	2.390	24,1	7.32
Mide	693	6,99	2.12
Yumurtalık	556	5,61	1.70
Deri	684	6,9	2.10
Kolon	419	4,22	1.28
Akciğer	404	4,07	1.24
Serviks	310	3,13	0,95
Beyin	349	3,52	1.07
Kemik iliği	391	3,94	1.20
Rektum	381	3,84	1.17
Diğerleri	3342	33,69	10.24
<b>TOPLAM</b>	<b>9.919</b>	<b>100</b>	<b>30.38</b>

**Çizelge 1.3:** Türkiye'de erkeklerde en çok görülen on kanser türü, 1999.

ORGANLAR	VAK'A	%	İNSİDANS(Yüzbinde)
Akciğer	4.707	29,38	14,19
Mide	1.315	8.21	3,96
Mesane	1.165	7.27	3,51
Larenks	900	5.62	2,71
Deri	804	5.02	2,42
Prostat	836	5.22	2,52
Kemik iliği	573	3.58	1,73
Kolon	558	3.48	1,68
Beyin	545	3.40	1,64
Rektum	451	2.81	1,36
Diğerleri	4.169	26.02	12,57
<b>TOPLAM</b>	<b>16.023</b>	<b>100</b>	<b>48,30</b>

### 1.3. Etiyolojisi

Kolorektal kanserin kesin sebebi kolonik mukozanın epitelyum hücrelerindeki genetik değişikliklerdir. Kolon kanserlerinin çok büyük bir bölümünü adenokarsinomlar oluşturur (%97). Epidemiyolojik çalışmalar kalın barsak mukozasındaki kanser gelişim sürecini başlatan özel faktörleri ortaya koymuştur. Aşırı et tüketimi, düşük vitamin ve mineral alımı, safra asitleri, fekal mutajenler, fekal pH ve mutajenlerin etkilerine olan yatkınlıklar kolon kanseri gelişimini başlatabilecek ana faktörler olarak bilinmektedir. Yapılan klinik çalışmalara göre her iki cinstede kolon kanseri görünme sıklığı aşağı yukarı aynı olup bazı çalışmalarda erkek cinstede insidansı biraz daha fazla olmaktadır. Kolon kanseri orta yaşın üzerinde daha çok ortaya çıkmakla birlikte, en çok 60–70 yaş grubunda görülmektedir. Kolon kanserinin kesin etiyojisi bilinmemektedir. Ancak bazı genetik ve çevresel faktörlerin kolorektal kanserlerin oluşumunda önemli rol oynadıkları yapılan çalışmalara ortaya konmuştur. (Yılmazlar ve Öztürk, 2004; Sayek, 1991).

#### 1.3.1. Yüksek Yağlı Diet ve Safra Asitleri

Kolon kanser oranları aşırı yağlı yiyecek tüketen toplumlarda yüksek iken düşük yağ tüketen toplumlarda azdır. Ortalama olarak; hastalığın yüksek insidans gösterdiği batı toplumlarında alınan total kalorinin %40-45'ini yağ oluşturmaktadır, düşük riskli popülasyonlarda ise bu oran %10'dur. Laboratuvar çalışmaları yüksek yağ alınınının deney hayvanlarında indüklenmiş kolon tümörlerinin insidansını artırdığını ortaya koymuştur. Pek çok vaka-kontrol çalışması, et ve yağ alınıımı ile kolon kanseri riski arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Et veya yağ alınıımı ile pozitif bir ilişki bulunmasına rağmen, sonuçlar daima istatistiksel olarak anlamlı değildir. Safra asitlerinin kolorektal karsinogenezdeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir, bununla birlikte bu etkinin diaçilgliserol aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Diyetel fosfolipidlerin intestinal bakteriler tarafından diaçilgliserole çevrilmesi yüksek yağlı diyetlerle birlikte artmaktadır. Bu artış sonucunda da diaçilgliserolün direkt hücrelere girdiği ve hücre içi sinyal transdüksiyonuna katılan protein kinaz C'yi sitümüle ettiği düşünülmektedir.

Yağların sindirimi safra asitlerinin normal aktivitesini gerektirir, fakat safra asitleri kolonun epitel hücrelerinde hasara ve tahrişlere neden olurlar. Safra asitleri intestinal mukoza epitelyum hücrelerinin çoğalma oranlarını artırabilirler böylelikle kolorektal kanser riskini yükseltirler (Dolara et al, 2002; Wei et al, 2004). Kolon kanser etiolojisinde geniş ölçüde kabul edilen hipotez safra asitleinin küçük adenomalarda displastik olayları ve büyümeyi tetikleyerek onların büyüklüğünü ve malignant potansiyellerini arttırdığı yönündedir. Kolonik bakteriler safra asitlerini ikincil safra asitlerine çevirirler. İkincil safra asitleri öncelikle litokolik asit ve deoksikolik asit laboratuvar modellerinde hücre proliferasyonunu artırdığı ve kolon karsinogenezisini teşvik ettiği görülmüştür (Zoran et al, 1997).

### **1.3.2. DiyetSEL Lif, Sebze ve Meyve**

Lifli besinlerin kanser riskini azalttığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak bu besin gruplarının lif bakımından zengin olmalarının yanında doğal antioksidantları da içermeleri dikkate alınmalıdır. Sebze, meyveler ve tahılgiller lif olarak yüksek oranda selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin içerirler. DiyetSEL liflerin kolorektal kanser riskini düşürmedeki muhtemel direkt mekanizmaları; suyun, suda çözünmeyen lifler tarafından absorpsiyonu, fecesteki karsinogenlerin yoğunluklarının seyrelmesi ve fecesin barsaktan geçiş süresinin kısalmasıdır. Ayrıca potansiyel karsinogenler direkt olarak suda çözünmeyen liflere bağlanabilirler bu da riski azaltıcı bir diğer direkt mekanizmadır. Muhtemel indirekt mekanizmalar ise; mikrobiyal büyümenin sitimülasyonu (mikrobiyal büyüme fecesin miktarını ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini artırır), safra asitlerinin üretiminin değişmesi, hücre proliferasyonunu etkileyen hücreSEL moleküllerin üretiminin etkilenmesi ve kısa zincirli yağ asitlerinin özellikle butiratın luminal pH'ya olan etkisi (David et al, 2001).

### **1.3.3. Kalsiyum ve Vitaminler**

Kalsiyum epitelyum hücrelerinin proliferasyonlarının ve farklılaşmasının her safhasına katılmaktadır. DiyetSEL liflerle birlikte kalsiyum seviyesi kolorektal kanser

etiyojisini değiştiren bir faktör olarak görülebilir. Hayvan deneylerinde sıçanlar fermente olabilen liflerle zenginleştirilmiş yüksek kalsiyum içeren diyetlerle beslendiğinde mitotik aktivitede rol oynayan ornitin dekarboksilaz aktivitesini anlamlı derecede dūřürdüęü görülmüştür. İnsan alışmaları, iyonize kalsiyumun safra asitlerine bağlanarak onları suda özölmeyen kalsiyum bileşiklerine çevirir, bu evirim sonucu safra asitlerinin kolonik mukozadaki potansiyel proliferatif etkisi azalmaktadır (Holt P.R., 1999). E vitamininin yüksek miktarda alınması özellikle 65 yaşın altındaki insanlarda kolon kanserine karşı riski anlamlı derecede azalttığı ortaya konmuştur (Bostick et al, 1999). E vitamininin kolon kanserli farelerde hücre büyümesini ve karaciğer metastas oranını azalttığı görülmüştür (Borek, 2004). Epidemiyolojik veriler günlük güneş işığı ile kolon kanser insidansı arasında ters ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Buna benzer ilişki serumdaki 25-hidroksivitamin D seviyesi ile kolon kanser oranı arasında görülmüştür. D vitamininin serum konsantrasyonu Batı toplumlarında özellikle yaşlılarda dūřüktür. D vitamini metabolitleri kolonuda içeren pek çok hücrenin hücresele metabolizmasını değiştirdiği bilinmektedir. (Holt P.R., 1999).

#### **1.3.4. Postmenaposal Hormone Kullanımı ve Nonsteroidal Anti-Inflammatuar İlaçlar (NSAID)**

Pek çok epidemiyolojik çalışma postmenaposal hormon kullanan bayanlar arasında kolon kanser riskinin azaldığını ileri sürmüştür. Kolon kanseri ve hormonun kullanım süresi arasında tam ortaya konulmamış bir ilişki vardır, kimi çalışmalar hormon kullanıp bırakmış bayanlarda riski daha az bulurken, bir kısmı uzun zamandır (>5 yıl) kullanan bayanlarda riski dūřürücü etkisini gözlemlemişlerdir. Österojenin ikincil safra asitleri üzerine olan etkisi kanseri riskinin azalmasında üzerinde durulan etki mekanizmalarından biridir. Österojen kullanımı safranın içeriğini, kolesterol salınımını artırması bunun yanında safra asiti salınımını azaltması ile değiştirir (Prihartono et al, 2000; Newcomb ve Storer, 1995; Grodstein et al, 1999). COX-2'nin ekspresyonu ise stres drumlarında, inflamasyon ve iyileşen yaralarda indüklenir. İlginç olarak COX-2 enzimi kolorektal adenomaların %45-50'sinde ve karsinomaların %80-85'inde aşırı olarak eksprese olur (Eberhart et al, 1994). Epidemiyolojik alışmalar, aspirin veya NSAID'lerin kullanımının kolorektal

kanser riskini %50'ye varan oranda düşürdüğünü ortaya koymuşlardır (Stürmer et al, 1998). FAP'lı hastalarda yapılan bir çalışmada selektif olmayan NSAID sulindan'la tedavi olan hastalarda poliplerin gerilediği ortaya konmuştur (Jalving et al, 2005). Ayrıca NSAID'lerin kemirgenlerde kimyasal olarak indüklenmiş intestinal kanserleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Chan, 2002).

### **1.3.5. Alkol Tüketimi, Sigara Kullanımı ve Fiziksel Aktivite**

Alkolün kolorektal kanser riski üzerine olan etkisine yönelik pek çok mekanizma ileri sürülmektedir. Alkolün oksidasyon ürünü olan asetaldehit kolorektal karsinogenezisten sorumlu olabilir. Yapılan son çalışmalarda asetaldehitin kolon kanseri riskini azaltan folatı degridde ettiği ortaya konulmuştur. Ayrıca alkol metil grubu metabolizmasının antogonistidir, böylelikle kolonik karsinogenezisin ilk basamağı olan abnormal DNA metilasyonunu indükleyebilir. Son olarak yüksek seviyede alkol tüketimi indirekt olarak immün supresyon, DNA tamirinde gecikme, sitokrom P-450 enziminin indüksiyonu ile karaciğer prokarsinojenlerinin aktivasyonu ve safra asitlerinin bileşimini değiştirerek kanser gelişiminde rol oynayabilir (Cho et al, 2004). Sigara kullanımı; kolorektal karsinoma riskini arttırdığı kadar, hiperplastik polip oluşumu ve kolon adenomaları içinde yüksek oranda risk faktörü olarak bulunmuştur. Geniş tabanlı klinik araştırmalar kolon adenoma ve kanser oluşumunun sigara içme dozuna bağlı olduğunu göstermiştir. 20 yıldan daha az sigara tüketenlerle kolonda küçük adenoma riski ilişkilendirilirken 20 yıldan fazla içenlerde ise büyük adenomalar oluşmaktadır. Fazla ve uzun süre sigara içenlerde (>35 yıl) kolon kanser riski yüksek bulunmuştur. Kolorektal kanserden ölüm oranları sigara kullananlarda veya uzun süre kullanıp bırakmışlarda hiç kullanmayanlara göre daha fazladır (Ye et al, 2005).

### **1.3.6. Kırmızı Et Tüketimi**

Kırmızı et tüketimi ve koleraktal kanserden ölüm arasında yüksek bir korelasyon vardır. Kırmızı et ve kolorektal kanser riski arasındaki ilişkinin önemli bir kısmını yüksek sıcaklıkta pişirilen kırmızı ette oluşan heterosiklik aminler oluşturur (heterosiklik aminlerin ana kaynağı kızartılmış kırmızı ettir). N-

asetiltransferaz enzimi heterosiklik aminlerden mutajenik ürünlerin oluşumunu katalizler. Bu enzimin aktivitesindeki değişiklikler bireyleri yavaş ve hızlı asetilatörler olarak ayırır. Eğer kırmızı et tüketimi fazla ve enzim aktivitesi de hızlı ise bu durum kolorektal kanser gelişimi için önemli bir risk oluşturmaktadır (Butler et al, 2003). Kızartma metodu ve kırmızı et tüketim sıklığı distal kolorektal adenomlarla ilişkili olabilir. Haftada iki kez kırmızı eti ızgara veya kızartma ile tüketen kişilerin kolorektal adenoma geliştirmeleri haftada bir kez veya daha az hafif pişmiş kırmızı et tüketenlere göre daha fazladır (Gerhardsson et al, 1991). Aynı zamanda kolon kanseri riski ve doymuş hayvansal yağ, omega 6 yağ asidi içeren yağca zengin diyetler arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu maddeler barsak içersinde karsinojenlere yıkılırlar (Jones et al, 2003; Pierre et al, 2003).

#### **1.4. Patolojisi**

Kolorektal karsinomların gelişmesinde klinik olarak üç evre olduğu gösterilmiştir. Preneoplastik evrede kolonik mukozada hiperproliferasyon ve displazi; prekanseröz evrede sırasıyla tübüler, tubulovillöz adenom ve villöz adenom; son olarak karsinom evresinde önce insitu, sonra invaziv karsinoma ve daha sonrada metastaz gelişir. Bu tümörlerin önemli bir çoğunluğu glandüler epitelden kaynaklanır ve adenokarsinomadır. Makroskobik olarak polipoid, ülseratif veya skiröz (annüler) olabilir. Sağ kolon karsinomları daha çok polipoid, sol kolon tümörleri ise daha çok annüler veya skirözdür. Mikroskobik olarak kolorektal karsinomlar iyi, orta veya az derecede diferansiye olabilirler. Bu karsinomların %10–15 kadarı müsin salgılar. Müsin salgılayan karsinomların prognozları daha kötüdür. Kolorektal karsinomların dağılımına bakıldığında tümörlerin önemli bir kısmı rektosigmoid bölgede (%55-60), inen kolonda (%10-15), transvers kolonda (%5-10) ve çıkan kolon ile çekumda (%15-20) yerleşir. Kolorektal karsinomların dağılımı 40 yaşından geç olanlarda benzerlik gösterir. Bu tümörlerin multisentrik olabilme oranları da %5 dolayındadır. ( Sayek, 1991).



## 1.5. Prognozu

Kolorektal kanserler, çekum ve çıkan kolonda %38, transvers kolonda %18, inen kolonda %8, rektosigmoidde %35 ve değişik bölgelerde multipl olarak %1 oranında izlenir. Sol ya da sağ kolon tümörlerinin daha iyi gidişli olduğunu bildirenler varsa da yerleşim yerinin ve çapının prognoza etkisi olmadığı kabul edilmektedir. Diğer kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserlerde de hastalığın erken teşhisi prognozu büyük ölçüde etkilemektedir. Tümörün patolojik evresi prognozu büyük ölçüde belirleyen faktördür. Ayrıca hastanın yaşda prognoz için önemlidir. Diğer tedavi seçeneklerinin yanında standart tedavi tümörlü bölgenin cerrahi olarak çıkarılması şeklindedir ( Sayek,1991).

## 1.6. Kolon Kanserindeki Spesifik Mutasyonlar

### 1.6.1. RAS Geni

RAS genleri bütün insan kanserlerinin %15-20'in de bulunmaktadır. K-RAS gen mutasyonları, H-RAS ve N-RAS gen mutasyonlarından daha sık gözlenmektedir. H-RAS ilk önce belirlenmiş olmasına rağmen mesane kanserlerinin %10'unda H-RAS mutasyonu gözlenmiştir. Bunun yanında K-RAS mutasyonları kolorektal kanserlerin %60'ında, pankreatik kanserlerin %70-90'ında ve akciğerin adenokarsinomalarının %30'unda gözlenmiştir. N-RAS mutasyonları ise akut nonlenfotik lösemilerin %20-30'unda gözlenirken epitel kanserlerde oldukça nadirdir. Kolorektal kanserlerde genin 12, 13 ve 61. kodonlarında sıklıkla nokta mutasyon oluşmaktadır. Bu kodonlardaki kritik mutasyonlar normal sinyal transdüksiyonunu engellemekte ve hücre gelişiminde deregülasyona neden olmaktadır. *Ras* mutasyonları yaygın olarak kolondaki premalignanat adenomator poliplerde oluşur. Kodon 12'deki spesifik mutasyon daha agresif tümör tipleri ile ilişkili olabilir. *Ras* mutasyonunun belirlenmesi kolorektal kanserlerin erken tanı ve taraması için oldukça yardımcı olabilmektedir. Bu mutasyonun tanısı sonrası, terapötik yaklaşım söz konusu olabilmektedir. (Okulczyk et al, 2003).

### 1.6.2. SRC Geni

*Src* onkogeni ilk olarak rous sarcoma virusde tanımlanmıştır. Kodladığı transforming protein direkt olarak hücre iskeletini modifiye etmektedir. Hücre iskeletinin bozulması malignant transforming ve karsinogenezisde ki basamakların erken safhalarında oluşabilir. Sporodik kolon kanseri ile ilişkisi olduğu düşünülen diğer iki onkogen *c-myc* ve *c-erbB2* onkogenleridir (Calvert ve Frucht, 2002).

### 1.6.3. APC Geni

APC embriyonik gelişim ve hücre çoğalmasında çok önemli role sahiptir. APC geni  $\beta$ -katenini inhibe ederek hücre çoğalmasını kontrol eder. APC'nin fonksiyonunu kaybetmesi  $\beta$ -kateninin hedeflerinin transkripsiyonlarını artırır. Bu hedefler; cyclin D, C-myc, ephrinler ve caspaselerdir. APC aynı zamanda pek çok aktin ve mikrotübül ilişkili proteinlerle interaksiyon halindedir (Senda T, 2005, Behrens J, 2005). Germline mutasyonlar genellikle kodlama yapan bölgede stop kodon oluşturmaktadır, bu da prematür translasyon ürünlerinin oluşmasına sebebiyet vermektedir. Bu abnormal protein invitro transkripsiyon-translasyon deneyleri ile etkilenmiş hastaların %60-70'inde belirlenebilmektedir. Bu yaklaşım FAP aile öyküsü olmayan multipli polipe sahip hastalarda uygulanabilecek klinik pratiği yüksek olan bir yöntemdir. Ayrıca FAP vakalarının %20-30 APC lokusunda yeni bir mutasyona sahiptirler, bu test onların belirlenmesini kolaylaştırabilir. APC geninin 15. exonunda bir "hotspot" vardır, bu bölge özellikle çok fazla sayıda gelişen polip ile ilişkili bulunmuştur. 1250 ve 1464. kodonlar arasındaki germline mutasyonlar 5000 veya daha fazlası polipe sahip fenotiple ilişkili bulunmuştur ("profuse type"), bu bölgenin dışında kalan bölgelerde meydana gelen germline mutasyonlar daha az sayıda polip geliştiren fenotiplerde görülmüştür ("sparse type"). (Fearnhead et al, 2001; Calvert ve Frucht 2002; Boland ve Meltzer 1997).

#### **1.6.4. p53 Geni**

Farklı tiplerdeki insan kanserlerinin % 60'ından fazlasında p53 geni mutasyona uğramış vaziyettedir. Normal p53 geni DNA'nın koruyucusu olarak görev yapar ve oluşan DNA hasarlarına karşı hücrel yanıtın önemli bir parçasıdır. %75'den fazla sporadik kolorektal tümörlerde p53 inaktivasyonu gözlenmiştir (Liu, 2006). Kolorektal kanserlerde p53 mutasyonunun belirlenmesi hastalığın prognozu açısından önemlidir. p53 mutasyonu taşıyan kolorektal kanser hastaları mutasyon taşımayanlara göre daha kötü bir hastalık seyrine ve kısa hayatta kalma oranına sahiptirler. (Boland and Meltzer, 1997).

#### **1.6.5. DCC Geni**

DCC (deleted in colorectal carcinogenesis) bir tümör supresör genidir. Bu genin delesyonu ve mutasyonları kolorektal kanserlerin %70'inde ve ileri derecede displazi gösteren adenomalarında %50'sinde saptanırken hafif displazi gösteren adenomlarda görülmemektedir. DCC proteininin eksprese olmaması kolorektal adenokarsinomalı hastaların belirli altgruplarında prognozun daha kötü olması ile ilişkilidir. DCC geninin kolorektal kanserlerde mutasyona sahip olduğu bilinmesine karşılık genin çok büyük olmasından dolayı henüz çok özel bir mutasyon gösterilememiştir (Mehlen ve Fearon, 2004).

#### **1.6.6. MYH Geni**

MYH genindeki germ line mutasyonlar çok sayıda kolorektal adenomaların resesif kalıtımı ile ilişkili bulunmuştur ( Miyaki et al, 2005). MYH SNP'lerinin bir kısmı bu protein protein interaksiyonlarının oluşumunu potansiyel olarak engelleyebilir, böylelikle DNA onarımında hatalara sebep olarak sonuçta kolorektal karsinogenezisi tetikleyebilir. MYH geninin kromozomal lokalizasyonu 1p32-34'dür, bu bölgenin kolorektal karsinom oluşumunun hiperplastik polipler ve adenomaları içeren erken lezyonlarında heterozigotitesini kaybettiği (LOH) gözlenmiştir (Sieber et al, 2003; Kambara et al, 2004).

### 1.6.7. YANLIŞ EŞLEŞME TAMİR GENLERİ (Mismatch Repair Genes, MMR)

Tüm MMR genleri (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6) DNA replikasyon hatalarının onarımına katılmaktadır. Genomdaki dizi tekrarları (örn. Mikrosatellitler) replikasyon esnasında DNA polimeraza birtakım problemler çıkarabilirler. DNA polimeraz bu tekrar eden bazlar üzerinde kayarak fazla tekrarlar halinde sentez yapar. Eğer MMR sistemde mutasyonlardan dolayı bozukluk meydana gelmişse bu tekrarlar kalıcı hale gelir ve microsatellite instability denen durumu meydana getirir. MSI nin varlığı DNA sentezi sırasında hata oluşma olasılığını artırmaktadır. MMR mutasyonları sporadik kolorektal karsinomaların yaklaşık %15-20'sinde görülür ve özellikle HNPCC'li hastaların karakteristik bulgusudur (Narayan ve Roy, 2003).

**Çizelge 1.4:** Kolorektal kanserlerde rol oynayan başlıca genler ve kromozomal lokalizasyonları (Calvert ve Frucht, 2002).

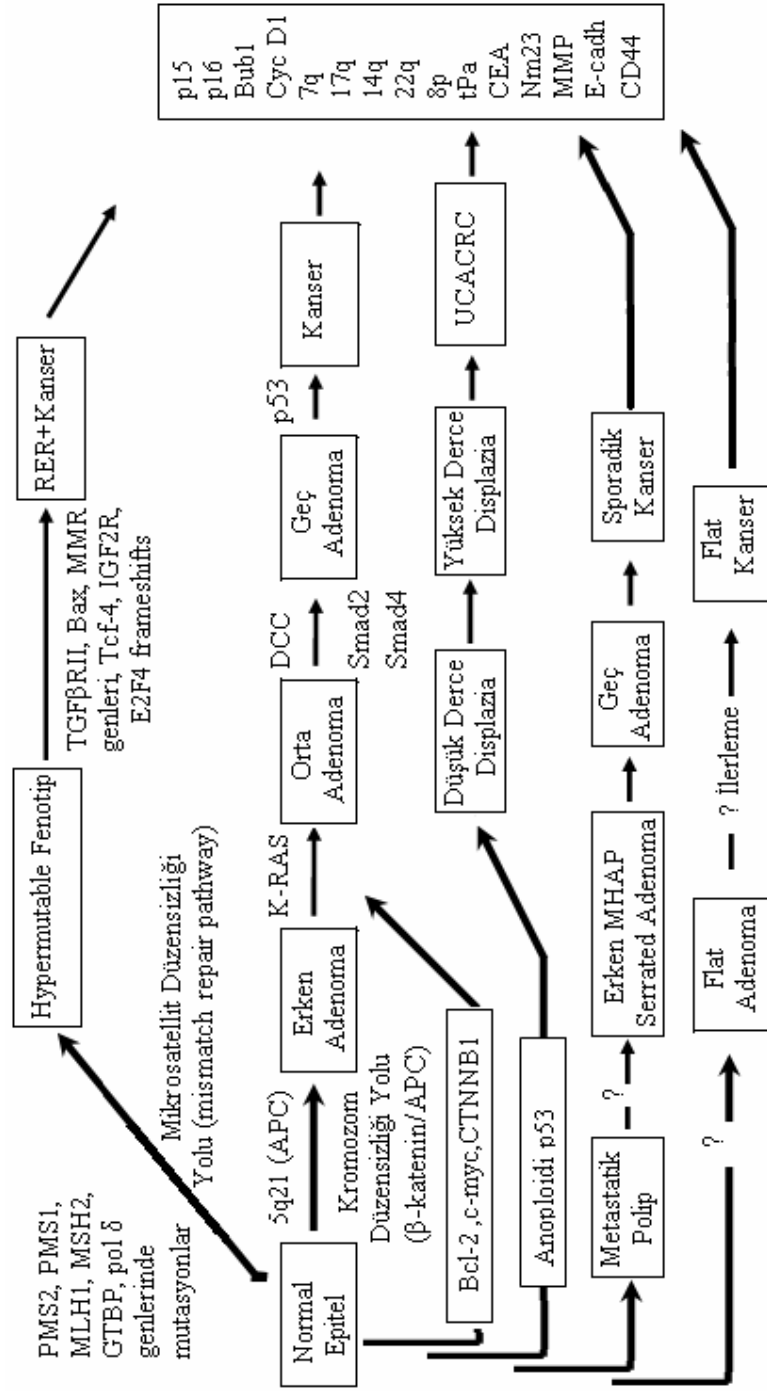
Mutasyon Tipi	Gen	Yeri	Hastalık Tipi
Germline	APC	5q21	FAP
	MMR genleri		HNPCC (Lynch I)
Somatik	<b>Onkogenler</b>		
	myc	8q24.12-q24.13	Sporadik kolon kanseri
	K-ras	11p15.5	
	src	20q12-q13	
	erbB2	17q21.1	
	<b>Tümör supresör</b>		
	p53	17p13.1	
	DCC	18q21.1-q21.2	
	APC	5q21	
	<b>MMR genleri</b>		
	hMSH2	2p22-p21	
	hMLH1	3p21.3	
	hPMS1	2q31-q33	
	hPMS2	7p22	
	hMSH6	2p16	
hMSH3	5q11-q12		

### **1.6.8. Kolorektal Kanselerde Allelik Kayıplar**

Kolorektal kanser örnekleri ile yapılan çalışmalarda ilk gözlenen kromozomal anomali kromozom 12p'deki delesyondur (Pathak ve Goodacre, 1986) . Fearon ve ark., (1987) yapmış olduğu çalışmada kolorektal karsinomaların %75'inde 17p'deki kayıpları belirlemiş ve 17. kromozomun kısa kolunun kayıplarının benign safhadan malignant aşamaya geçişte rol aldığını ileri sürmüştür (Fearon et al, 1987) . FAP'lı 25 ve kolon karsinomalı 20 hastayla yapılan çalışmada çoğunlukla 22. kromozomun allelik kayıplarına ek olarak kromozom 5, 6, 12q ve 15'de allelik kayıplara rastlanmıştır (Okamoto et al, 1988). Vogelstein ve ark., (1989) yapmış olduğu çalışmada kolorektal kanserlerde dört ana değişimi gözlemlemişlerdir. Bunlar 5., 17. ve 18. kromozomlardaki dizilerde delesyon ve RAS gen mutasyonlarıdır. RAS gen mutasyonlarını adenomlarda (%58) ve karsinomalarda (%47), kromozom 5'deki kayıpları FAP'larda, kromozom 18'deki allelik kayıpları kolon karsinomalarda (%73) ve ilerlemiş adenomlarda (%47) gözlerken kromozom 17'deki kayıpları sadece karsinomalarda (%75) gözlemlemişlerdir (Vogelstein et al, 1988). Vogelstein ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında da kolorektal tümörlerde 17p ve 18q'deki kayıpları %75 oranında, 1q, 4p, 5q, 6p, 6q, 8p, 9q, 18p ve 22q'daki kromozomal kayıpları ise %25'den %50'ye kadar saptamışlardır (Vogelstein et al, 1989).

### **1.7. Mutasyon ve Polimorfizm**

Aynı türün bireyleri arasındaki farklılıkların kaynağının genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle olduğu bilinmektedir. İnsanda bu farklılığı meydana getiren genetik faktöre baktığımızda; herhangi iki insan arasındaki nükleer DNA'nın dizisi yaklaşık %99.9 oranında birbirinin aynısı olduğu görülmektedir. DNA'da ki dizilerde meydana gelen bir takım değişiklikler fenotipik olarak gözlenmese de, bazıları hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olabilmektedir. Bu genetik farklılıklar anatomik, fizyolojik, tıropatik ilaçlara cevaplarda, ilaçların advers reaksiyonlarda, enfeksiyona hassasiyet, kansere yatkınlık, hatta pek çok kişisel özellik, atletik beceri gibi birtakım yeteneklerde varyasyonlara neden olmaktadır. DNA'da ki değişimler sonucu varyasyonlara neden olayların temelinde mutasyon ve polimorfizm bulunmaktadır (Nussbaum et al, 2001).



**Şekil 1.2:** Kolon kanserinde çok adımlı kanser gelişim modeli (Narayan ve Roy, 2003'den uyarlanmıştır).

**Çizelge 1.5:** Kolorektal neoplazmalarda risk faktörü olarak çalışılmış polimorfizmler (Houlston and Tomlinson , 2001).

Genler	Nükleotid değişimi	Amino asit değişimi	Fonksiyon üzerine etkisi
<i>CYP1A1</i>	A4889G (exon 7) T <sup>6235</sup> C (3' UTR)	Ile462Val Yok	?Artmış aktivite ?Yok
<i>NAT1</i>	A1088T C559T G560A C190T C97T A72T	Yok ( <i>NAT1*10</i> ) Arg187Stop( <i>NAT1*14</i> ) Arg187Stop( <i>NAT1*15</i> ) Arg64Trp( <i>NAT1*17</i> ) Arg33Stop( <i>NAT1*19</i> ) Asp251Val( <i>NAT1*22</i> )	?Artmış aktivite Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel
<i>NAT2</i>	C341T G590A G857A G191A	Ile114Thr( <i>NAT2*5</i> ) Arg197Gln( <i>NAT2*6</i> ) Gly286Glu( <i>NAT2*7</i> ) Arg64Gln( <i>NAT2*14</i> )	Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel Düşük aktv.allel
<i>GSTM1</i>	Delesyon	Null	Aktivite yok
<i>GSTT1</i>	Delesyon	Null	Aktivite yok
<i>GSTP1</i>	A1578G C2293T	Ile105Val (I <sub>105</sub> ) Ala144Val (V <sub>144</sub> )	Azalmış aktv.
mEPHX	Exon 3T→C Exon 4A→G	Try113His His139Arg	?Azalmış aktv.
<b>Metilasyon</b>			
<i>MTHFR</i>	C677T	Ala222Val	Azalmış aktv.
<i>MTR</i>	A2756G	As919Gly	
<b>Mikroçevre değiştiricileri</b>			
<i>PLA2G2A</i>	Ex.1-5'UTRC→G Exon 3G→C	Yok Yok	
<i>APO-E</i>		Cys112Arg Cys158Arg(E4)	Değişmiş lipoprotein met.
<b>Tumor Supress/Oncg.</b>			
<i>APC</i>	T3920A G3949C	Ileu1307Lys(I1307K) Gln1317Glu(E1317Q)	?Artmış somatik mut. Bilinmiyor
<i>HRAS1</i>	28-bpVNTR	Yok	?Değişmiş trnsk.
<i>TP53</i>	Exon 3G→C İntr. 316bp Dup İntron 6G→C	Arg72Pro	Bilinmiyor Muhtemeldeğil Muhtemeldeğil
<i>MLH1</i>	C2006T (intron12)	Yok	Bilinmiyor
<b>Diğer genler</b>			
<i>TNF-α</i>	-380G→A	Yok	?Artmış bazal ve indüklenabilir
<i>TNF-β</i>	-238G→A	Yok	TNF seviyesi

### 1.7.1. Genetik polimorfizm

Populasyon genetiğinde, polimorfizm (kelime karşılığı birden fazla form) terimi bir populasyon daki birden fazla çeşitlilik gösteren gözlenebilir özelliği ifade etmektedir. Dünya üzerindeki pek çok farklı bireyin kromozomlarına bakıldığında, aynı kromozomun belirli bir bölgesinde lokalize olmuş DNA parçasının yüksek oranda benzerlik gösterdiği dikkati çekecektir. Gerçekte, populasyondaki iki insan arasında herhangi 1200 bp uzunluğundaki DNA dizisinde ortalama bir baz çiftinin farklı olduğu gözlenmiştir. Genetik terminolojide belirli bir kromozomal lokasyondaki (locus), belirli DNA dizilerinin farklı versiyonlarına allel adı erilir ve genetikçiler polimorfik terimini, populasyonda yaygın olarak iki veya daha çok alleli bulunan bir geni tanımlamada kullanırlar. Monomorfik gen, bir populasyonda ağırlıklı tek allel olarak bulunan gendir. Bir allelin populasyonda ki yaygınlığı en az %99 oranında bulunuyorsa bu gen monomorfiktir. Diğer bir anlatımla, polimorfik gen bir veya daha fazla allele sahip olmalı ve bu allel populasyonda %1'den fazla oranda bulunmalıdır. Bunlara karşılık populasyonda %1'den daha az gözlenen allele ise nadir varyantlar (rare variant) adı verilir. Bazı alleller, genler arasındaki veya intronlar içersindeki DNA dizilerindeki değişikliklerle oluşurlar, bu değişimlerin genin fonksiyonu üzerine bilinen bir etkisi yoktur, bu tip alleller sadece direkt DNA analizi ile belirlenebilirler. Kodlama yapan diziler içersindeki değişimler sonucu oluşan alleller farklı protein varyantlarının oluşumuna neden olup ciddi fenotipik bozukluklar, değişimler ortaya çıkarabilirler. Genetik hastalıklara sebebiyet veren çoğu mutasyon (hepsi değil) nadir varyantlardır ve bu alleller genetik diversitenin en belirgin formlarıdır. Doğadaki pek çok populasyonda, genlerin büyük bir yüzdesi polimorfiktir. Bununla birlikte, küçük populasyonlarda (örneğin; nesli tükenmekte olan) genetik varyasyonun çok düşük olması beklenir çünkü gen havuzu az sayıdaki bireylerden meydana gelmiştir. İnsan da bulunan genlerinin %30'u polimorfiktir. İnsanda yaklaşık olarak 25,000 farklı gen vardır ve bu genlerden yuvarlak olarak 10,000 tanesi iki veya daha fazla allelli polimorfik olarak bulunmaktadır (Nussbaum et al, 2001).



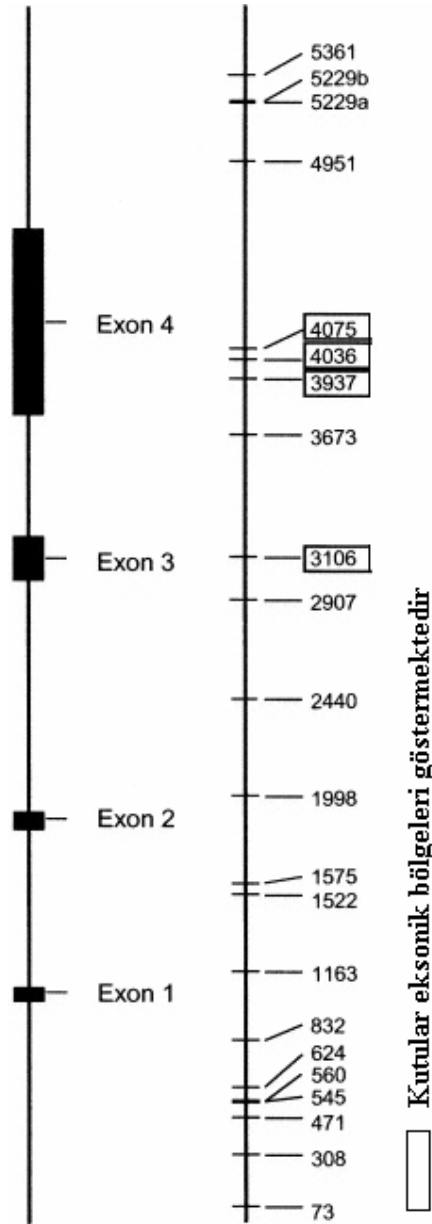
### 1.7.2. Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphisms, SNPs)

SNP'ler DNA dizisindeki varyasyonlardır, genomdaki dizide meydana gelen tek nükleotidlik (A, T, G veya C) değişim sonucu meydana gelir. Örneğin bir SNP DNA dizisini AAGGCTAA'dan ATGGCTAA'ya çevirebilir. Bir varyasyonun SNP olarak kabul edilebilmesi için, populasyonda en az %1 oranında izlenebiliyor olması gerekmektedir. SPN'ler bütün insan genetik varyasyonlarının %90'nı oluşturmaktadırlar,  $6.4 \times 10^9$  büyüklüğündeki insan genomunda, yaklaşık her 1000-2000 bazda bir SNP oluşur. Her üç SNP'den ikisi sitozinin ( C ) timinle ( T ) yer değiştirmesinden oluşur. SNP'ler bir genin hem kodlama yapan hem de kodlama yapmayan bölgesinde bulunabilir. Pek çok SNP'nin hücrel fonksiyon üzerine bir etkisi yok iken, bir kısmının hastalıklarda, ilaçlara cevapta ve hücrel aktivitelere etkisi olduğu gösterilmektedir. İnsan DNA dizisinin %99'dan daha fazlasının aynı populasyonda aynı olmasına rağmen, DNA dizilerindeki varyasyonların insanların hastalıklar, virus, bakteri, toksinler, kimyasallar gibi çevresel faktörlere, ilaçlara ve diğer tedavilere nasıl cevap vereceği üzerine önemli etkileri vardır. Bunlar da SNP'lerin çalışmasını biyomedikal araştırmalar veya tıbbi teşhisler açısından çok değerli yapmaktadır. SNP haritalarının, kanser, diyabet, vaskular hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve zekâ bozuklukları gibi pek çok karmaşık hastalıkla ilişkili genlerin belirlenmesine yardımcı olacaktır. SNP'leri evrimsel olarak mikrosatellit markerlarına göre daha stabildirler, daha düşük mutasyon oranına sahiptirler. Bir generasyondan diğerine değişimleri az olduğundan populasyon çalışmalarında kullanılmaları daha kolay ve bilgilendiricidir. Bunun yanında SNP'lerin sayılarının fazla oluşu hastalık ve allel korelasyonunun kurulmasında şans ve avantaj doğurmaktadır (Nussbaum et al, 2001).

### 1.8. Apo E ve SNP

Son çalışmaların sonucu olarak, 3' ve 5' flanking bölgeleride katılıp 5.5 kb'lık Apo E geni incelendiğinde 21 değişken bölgenin varlığı ortaya konulmuştur. Gözlenen bu bölgelerden 20 tanesi biallelik SNP'lerdir kalan birtanesi ise bir multiallelik insersiyon/delesyon polimorfizmi (5229a) ve bir SNP'dir (5229b). 21 SNP'den 17 tanesi kodlama yapmayan bölgede lokalize olmuştur, kalan 4 tanesi ise

eksonik bölge içersindedir. Ekson 4 deki iki SNP (pozisyon 3937 ve 4075) üç yaygın Apo E isoformunu kodlamaktadır, üçüncü SNP ise bu ikisi arasına lokalize olmuştur (pozisyon 4036). Dördüncü eksonik SNP ise üçüncü ekson içersindedir (pozisyon 3106). Bu dört SNP'nin her birisindeki varyasyon proteinde aminoasit değişimi ile sonuçlanır (Stengard et al, 2002).



**Şekil 1.3:** Apo E geni içersinde bulunan yaygın SNP'lerin lokasyonları (Stengard et al, 2002).

## 1.9. Lipoproteinler

Lipidler suda çözünmeyen moleküller olmalarına rağmen vücudun tamamında transportları yapılmaktadır. Suda çözülmeyen lipidler çeşitli proteinlerle (apolipoproteinler) birlikte, lipoprotein kompleksi olarak transport edilirler. Lipoproteinler küre şekilli yapılardır. Bu kürenin merkezinde hidrofobik yapıdaki lipidler bulunur. Hidrofilik proteinler (apolipoproteinler), lipidlerin baş kısımları yüzey kısmında bulunur. Kolesterol ise integral olarak bir dağılım gösterir. Beş ana sınıfa ayrılan lipoproteinler densitelerine, kompozisyonlarına (lipoproteinler farklı oranlarda protein, triaçilgliserol, fosfolipid ve kolesterol içerirler), büyüklük ve fonksiyonlarına göre birbirlerinden ayrılırlar. Çeşitli lipid ve protein kombinasyonları şilomikronlardan HDL'ye kadar farklı densitelerde partiküllerin oluşumuna olanak verirler (Dominiczak, 1997).

**Çizelge 1.6:** Lipoproteinler (Dominiczak, 1997'den uyarlanmıştır).  
(\* İçeriklerin toplamının %100 olmamasının nedeni kalan kısmın apolipoproteinlerce oluşturulmasıdır)

Lipoprotein	Densite (kg/L)	Apolipoprotein	İçerikleri*	Ortalama çap (nm)
Şilomikronlar	<0.95	AI, AII, B48, CI, CII, CIII, E	%85 triaçilgliserol, %8 fosfolipid, %4 kolesterol	80–1200
VLDL	0.95-1.006	B100, CI, CII, CIII, E	%56 triaçilgliserol, %20 fosfolipid, %23 kolesterol	30–80
IDL	1.006-1.019	B100, CIII, E	%29 triaçilgliserol, %26 fosfolipid, %43 kolesterol	23–35
LDL	1.019-1.063	B100	%29 triaçilgliserol, %26 fosfolipid, %43 kolesterol	18–25
HDL	1.063-1.21	AI, AII, CI, CII, CIII, D, E	%16 triaçilgliserol, %43 fosfolipid, %41 kolesterol	5–12

### 1. Şilomikronlar

- En büyük ve en çok triglisderidce zengin lipoprotein partikülü.
- Major apoproteini Apo B48'dir (bunun yanında Apo AI ve Apo E de bulundurur).
- İnce bağırsaktan dokulara diyetsel triaçilgliserollerin transportunu sağlar.

## **2.VLDL**

- Bir diğer major trigliserid taşıyıcısıdır.
- Apo B100 major apoproteinidir.
- Karaciğerde oluşturulan lipidlerin periferel dokulara transportunu sağlar.

## **3.IDL**

- VLDL katabolizmasının orta densiteli remnanları.
- Kolesterol ve trigliseridce zengin.
- Apo E major apoprotein.
- VLDL ve LDL arasında geçiş formu.

## **4.LDL**

- Endojen kolesterol ve kolesterol esterlerinin major taşıyıcısı.
- Apo B100 tek apoproteinidir.
- Periferel dokular için kolestrol transportunu sağlar.

## **5. HDL**

- En küçük proteince zengin lipoproteindir.
- İki alt sınıfı vardır HDL<sub>2</sub> ve daha küçük HDL<sub>3</sub>.
- Apo AI major apoproteinidir.

(Epstein, 2003)

### **1.10. Apolipoproteinler**

Apolipoproteinler kandaki lipidleri bağlayan proteinlerdir. Triaçilgliserollerin, fosfolipidlerin, kolesterol ve kolesterol esterlerinin hücre, doku ve organlar arasındaki transportunda önemli rolleri vardır. Apolipoproteinler lipidlerle birlikte lipoproteinlerin pekçok sınıfını oluştururlar. Apolipoproteinler farklı sınıf lipoproteinler arasında transfer edilirler. Apolipoproteinlerin başlıca fonksiyonları şunlardır: yapısal rolleri, reseptörlere bağlanma bölgesi ve lipid metabolizmasına katılan enzimler için kofaktör ya da aktivatör olarak görev yaparlar (Dominiczak, 1997).

**Çizelge 1.7:** Apolipoproteinler ve bilinen görevleri (Dominiczak, 1997).

<b>Apolipo- protein</b>	<b>Molekül Ağırlığı(Da)</b>	<b>Lipoprotein içeriği</b>	<b>Kromozom</b>	<b>Lipid transportu haricindeki diğer muhtemel fonksiyonu</b>
<b>A-I</b>	29,016	HDL Şilomikronlar	11	HDL'nin yapısına katılır, HDL ligandı, LCAT kofaktörü.
<b>A-II</b>	17,400	HDL	1	HDL'nin yapısına katılır, HDL ligandı, LCAT kofaktörü. LPL ve HTGL aktivatörü (?).
<b>A-IV</b>	46,000	VLDL HDL	11	HDL ligandı, LCAT aktivatörü.
<b>Apo(a)</b>	300,000- 800,000			Lp(a) yapısına katılır.
<b>B-48</b>	241,000	HDL, VLDL Şilomikronlar	2	Şilomikronların yapısına katılır. TG sekresyonu
<b>B-100</b>	513,000	HDL, VLDL	2	VLDL, IDL ve LDL'nin yapısına katılır. LDL reseptör ligandı. TG sekresyonu
<b>C-I</b>	7,600	Şilomikronlar HDL, VLDL	19	LCTA ve LPL aktivatörü.
<b>C-II</b>	8,916	HDL, VLDL Şilomikronlar	19	LCTA ve LPL aktivatörü.
<b>C-III</b>	8,750	HDL	11	LPL inhibitörü.
<b>D</b>	33,000	HDL	3	LCAT aktivatörü
<b>E</b>	34,000	VLDL, HDL	19	LRP ve B/E reseptörü ligandı. Doku remodelling, İmmün regulasyon, Hücre çoğalması.
<b>F</b>	28,000	HDL, LDL	12	Kolesterol transportu
<b>G</b>	72,000	VHDL, HDL	?	?
<b>H</b>	50,000	VLDL, HDL, LDL, Şilomikronlar	17	?
<b>J</b>	70,000	VHDL, HDL	8	HDL metabolizması, Hücre koruması

### 1.11. Apolipoprotein E (APO E) geni

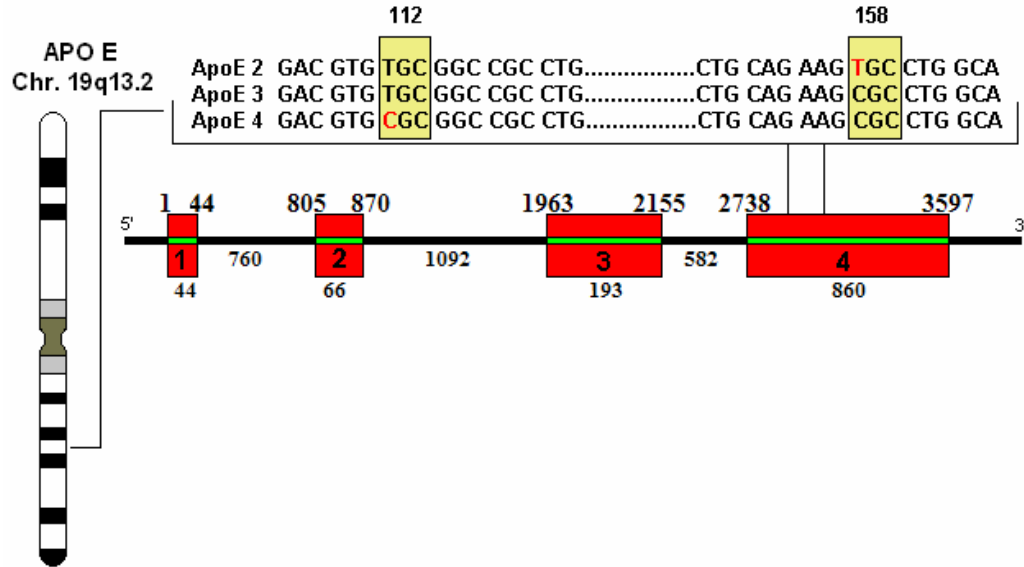
APO E geni diğer apolipoprotein genlerinin de içinde bulunduğu multigenik bir aileye aittir. Bu aileye ait genlerin her biri benzer şekilde dört exonu sahiptir ve bu exonlar üç intron ile birbirinden ayrılmışlardır. Apo E'yi kodlayan gen 19. kromozomun uzun kolunda 19q13.2 pozisyonunda yer almaktadır (Siest et al, 2002,

Paik et al,1985; Das et al, 1985). Apo E geni aynı kromozom bölgesi üzerinde apo C-I, apo C-II, apo C-IV genleri ve apo C-I pseudogeni ile bir arada bulunmaktadır. APO E geni 3597 nükleotid uzunluğundadır ve diğer apolipoprotein genleri ile yapısal birçok benzerlikleri paylaşmaktadır (Rall et al, 1982; Mahley ve Rall 2000).

**Çizelge 1.8:** Apolipoprotein genlerinin kromozomal lokalizasyonları .

Apo A-II	Kromozom 1
Apo B-100	Kromozom 2
Apo D	Kromozom 3
Apo A-I/C-III/A-IV	Kromozom 11
Apo E/C-I/C-II	Kromozom 19

APO E geninin dört eksonu vardır, bu eksonlar üç intron ile birbirinden ayrılmışlardır. Bütün intronları G-T nükleotidleri ile başlayıp, A-G nükleotidleri ile bitmektedir. 5' → 3' doğrultusunda sıralandığında eksonları 44, 66, 193 ve 860 nükleotid, intronları ise 760, 1092 ve 582 nükleotid uzunluklarındadır (Paik et al, 1985; Das et al, 1985, Hixson ve Vernier, 1990).



**Şekil 1.4:** APO E geni. Eksonik ve intronik bölgelerin büyüklükleri ile yaygın alleller arasındaki nükleotid farklılıkları.

Dört eksonlu apo E geni 1163 nükleotidlik bir mRNA'yı kodlamaktadır. APO E'nin ilk eksonu kodlamaz. Exon 2 ise signal peptidin ilk 14 amino asitini kodlar.

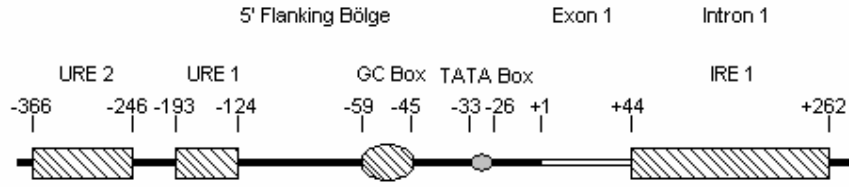
Exon 3, signal peptidin kalan 4 amino asitini ve mature proteinin ilk 61 amino asitlik kısmını kodlar. Exon 4 ise olgun proteinin ana parçasını kodlamaktadır. Ayrıca exon 4, 3' bölgesinde 100 noncoding nükleotid içerir. Pek çok regülatör element içeren kompleks bir promotör bölgesi genin 5' proksimal bölgesine lokalize olmuştur, ayrıca ilk intron da da regülatör bölgeler bulunmaktadır. Genin 5' ve 3' bölgelerinde belirlenmiş regülatör elementlerin bazıları dokusal spesifite gösterirler. Apo E geninin TATA box elementi (TATAATT), transkripsiyon başlama bölgesinin 33 bp upstream'inden başlar (Hixson and Vernier, 1990; Paik et al, 1985). Ayrıca, Apo E geninin 5' flanking kısmının, mRNA başlangıç noktasına 150 nükleotid yakınlığındaki bölge içersinde iki büyük inverted tekrarlayan dizi bulunmaktadır. Bu iki diziden proksimaldaki -76 ile -46. ve distaldaki de -144 ile -108. nükleotidler arasına lokalize olmuştur. Bu iki dizide yüksek oranda G-C tekrarı içermektedir. Apo E genin proksimal flanking bölgesi ve intronları incelendiğinde, Alu ailesine ait dört tekrarlayan dizinin gen ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu dizilerden iki tanesi ikinci intronda lokalize iken diğer ikisi genin her iki uçlarına yakın transkribe olmayan bölgede bulunmuştur. Alu dizilerinin uzunlukları 280 ile 324 nükleotid arasındadır. Yapısal orientasyonları, ikinci intron içersine lokalize olmuş olanlardan bir tanesi ( III ) , exonlar ile aynı polariteye sahiptir. Diğer üçü ise ters orientasyondadır (Paik et al, 1985).



**Şekil 1.5:** Apo E geni ile ilişkili Alu ailesi dizileri (gri kutular). Oklar, Apo E geninin kodlama yapan strand'ine göre alu dizilerinin orientasyonunu göstermektedir.

İnsan Apo E geninin 5'- flanking bölgesi ilgiçekici yapısal özelliklere sahiptir, bununla birlikte bu dizilerin genin fonksiyonu üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar en az üç regülatör domainin 5' ucunun proksimal 383 nükleotidlik kısmında bulunduğu ve ayrıca ilk intron içersinde de regülatör bölge olduğunu ortaya koymuştur. 5' proksimalinde bulunan domainlerden biri GC box transkripsiyon kontrol elementidir, diğer iki element ise enhancer-like

aktivitesi taşımaktadır. Üçüncü enhancer-like aktivite gösteren element de ilk intron içerisine lokalize olmuştur. Enhancer-like elementler 5' proksimalinde -366 ile -246 ( URE 2; Upstream Regulatory Element 2 ) ve -193 ile -124 ( URE 1; Upstream Regulatory Element 1) arasında, ilk intron da ise +44 ile +262. (IRE 1; Intron Regulatory Element 1) nükleotidler içerisinde bulunmaktadır. GC box ise -59 ile -45. nükleotidler içersindedir. Bu dizilere SP-1 ve AP-2 gibi transkripsiyon faktörler bağlanabilmektedir (Paik et al, 1988; Weisgraber et al, 1981; Zannis et al, 1984).



**Şekil 1.6:** Apo E geninin 5'- flanking bölgesindeki ve ilk intron içersindeki regülötör diziler.

### 1.11.1. Apo E Varyantları

İnsan plazma Apo E ile yapılan yüksek çözünürlüklü two-dimensional electrophoretik çalışmaları sonucunda, büyüklük ve/veya yüklerinden dolayı pek çok izoformunun olduğu ortaya çıkmıştır. Apo E deki bu heterojenitesinin; apoprotein E'deki birbirinden bağımsız iki değişikliğin kombinasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir: (a) bir gen lokusunda, üç bağımsız allelden kaynaklanan proteindeki kalımsal (gen düzeyinde) değişiklikler ve (b) major isoformların bir veya daha fazla negatif yüklü sialic asit residüleri ile post-translasyonel modifikasyonlarıdır. Bu iki farklı değişkenin etkisi oluşan proteinlerin çeşitliliğini arttırmaktadır (Zannis et al,1982; Weisgraber et al, 1981).



**Çizelge 1.9:** Apolipoprotein allellerinin reseptör bağlama kapasiteleri ve Tip III hiperlipidemia ile ilişkileri.

Allel	Amino asit değişimi	Reseptöre Bağlanma (% normal)	
<b>YAYGIN</b>			
<b>E2</b>	Arg158→Cys	<2	Azalmış total ve LDL kolesterolü ile ilişkili. Resesif Tip III hiperlipidemiinin yaygın nedeni.
<b>E3</b>	Yok	100	Wild tip allel
<b>E4</b>	Cys112→Arg	>100	Artmış total ve LDL kolesterolü ile ilişkili.
<b>NADİR</b>			
<b>E1</b>	Lys146→Glu	Bilinmiyor	Dominant Tip III
<b>E2</b>	Arg136→Ser	40	Bilinmiyor
<b>E2</b>	Arg136→Cys	Bilinmiyor	Tip III için resesif
<b>E3</b>	Arg142→Cys	<4	Tip III için dominant. Erken yaşta ekspresyonu.
<b>E2</b>	Arg145→Cys	45	Bilinmiyor
<b>E2</b>	Lys146→Gln	40	Dominan Tip III.
<b>E3</b>	İnsersiyon	25	Leiden varyant. 121-127'ye 7 amino asit insersiyonu.

### 1.11.2. Apo E'nin genetik polimorfizmi

Apo E yapı-fonksiyon kompleksitesinin başlıca nedeninin gendeki mutasyon ve polimorfizmlerden kaynaklanması sürpriz değildir, ayrıca bunların neden olduğu farklılıklar proteinin fonksiyonu üzerine önemli etkiler yapmaktadır (Hixson and Vernier, 1990). Apo E geninde 30'dan fazla allelik varyantın farklı transkripsiyon ürünlerini kodladığı belirlenmiştir (de knijff et.al, 1994). Bu allelerden çok nadir olan dört tanesi diğer isoformlardan farklı büyüklükte proteinleri kodlarlar. Dört tane nadir allelden biri 4. exonda 21 bp bir insersiyona sahiptir, diğeri exon 3'te tek nükleotidlik delesyona sahiptir ve bu frame shift delesyon erken stop kodonunun oluşmasına neden olur, bir diğeri intron 3'te tek nükleotid mutasyona sahiptir ve abnormal splice edilmiş mRNA formlarının oluşmasını sağlar ve sonuncu olarak exon 3'te tek nükleotid mutasyonu erken stop kodonu meydana getirir. Diğer geri kalan tüm Apo E isoformlarını kodlayan allelik varyantlar sadece bir veya daha fazla pozisyonadaki amino asitin farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu alleler içersinde

en yaygın olarak gözlenenler ve üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmış olanları kodlama yapan bölgede; exon 4' deki 112. ve 158. codonlarda meydana gelen tek nükleotid polimorfizmine (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) bağlı ortaya çıkan üç tanesidir. Bu polimorfik olan üç alleli APO E geni ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) üç farklı Apo E isoformunu kodlar: E2, E3, E4. Bu alleller orijinal olarak ilk defa isoelektrik focusing ile belirlenmişlerdir.  $\epsilon 4$  allelinin 112. ve 158. codonlarının her ikisinde de arjinin (Arg) amino asidi kodlanmaktadır (CGC) ,  $\epsilon 3$  alleleline bakıldığında ise 112. codonda CGC  $\rightarrow$  TGC nokta mutasyonu ile bir sitozin (C) timin (T) nükleotidinde dönüşmekte ve bu kodon Arg amino asidi yerine sistein'i (Cys) kodlamaktadır. Son olarak  $\epsilon 2$  allelinde ise hem 112. hem de 158. kodonlarında CGC  $\rightarrow$  TGC dönüşümü olmakta ve sonuçta her iki pozisyonda Cys amino asidi sentezlenmektedir. Bu amino asit değişimleri üç izoform arasında yük olarak değişikliklere neden olur, sonuç olarak E2 iki Cys'den dolayı nötrdür, bunun yanında E3 112. pozisyonda Cys yerine Arg dolayı +1, E4 ise hem 112 de hem de 158 de Arg bulundurmasından dolayı +2 yüke sahiptir . Yaygın olarak gözlenen üç homozigot ve üç heterozigot fenotip bu üç allelden herhangi ikisinin ekspresyonu ile ortaya çıkar (Main et al, 1991; Breslow et al, 1982; Zannis et al, 1982). Buradaki nükleotid dönüşümlerinden bahsedilirken,  $\epsilon 4$  formunun atasal form olduğu ve diğer iki formun bundan evrimleştiği şeklindeki evrimsel çalışmaların ağırlık kazanmaya başlaması göz önüne alınmaktadır (Mahley and Rall, 1999; Fullerton et al, 2000).

**Çizelge 1.10:** Apo E allelik varyantlarındaki nükleotid ve amino asit değişimleri.

Amino asit pozisyonu	112	158	112	158	112	158
Nükleotid	T	T	T	C	C	C
Kodon	TGC	TGC	TGC	CGC	CGC	CGC
Amino asit	CYS	CYS	CYS	ARG	ARG	ARG
İsoform	E2		E3		E4	
Allel	$\epsilon 2$		$\epsilon 3$		$\epsilon 4$	
Olası genotipler	$\epsilon 2 / \epsilon 2$	$\epsilon 2 / \epsilon 3$	$\epsilon 2 / \epsilon 4$	$\epsilon 3 / \epsilon 3$	$\epsilon 3 / \epsilon 4$	$\epsilon 4 / \epsilon 4$

Çok yaygın olarak gözlenen bu üç allelin yanında, nadir olan diğer beş allel daha vardır, bu allellerde SNPs den dolayı meydana gelmişlerdir ve hatta bazı popülasyonlarda bulunmayabilirler; kodon 3'de Glu  $\rightarrow$  Lys, kodon 28 de Leu  $\rightarrow$ Pro,

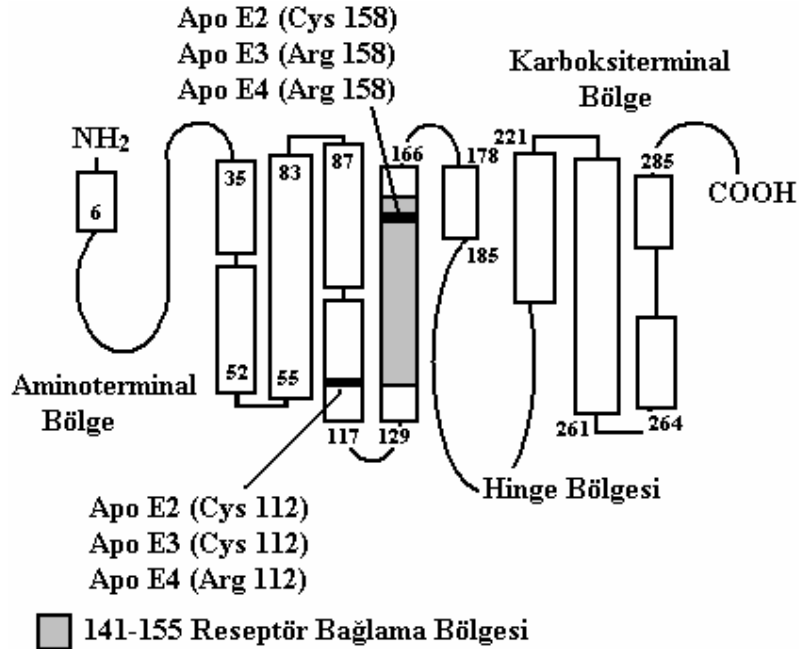
kodon 84 de Pro→ Arg, kodon 142 de Arg→ Cys ve kodon 244 ile 245 de Glu→ Lys (de knijff et al, 1994; Nickerson et al, 2000). Kodlama yapan bölgedeki polimorfizimlere ek olarak, kodlama yapmaya bölgelerde de en az 18 polimorfizim saptanmıştır (Nickerson et al, 2000). Bu polimorfizimleri popülasyonlarda görülme frekansları oldukça düşüktür. Genin 5' kodlama yapmayan bölgesi ve exon 1'i de içine alan regülatör bölge polimorfizimleri nispeten 3' kodlama yapmayan ve intron polimorfizimlerine göre daha sıktır. Genin regülatör bölgesinde meydana gelen polimorfizimler kliniksel açıdan önemlidir, bazıları yaşlanma ile ortaya çıkan patolojiler ile ilişkili bulunmuştur. (Lambert et al, 1998; Lambert et al, 2004; Bullido and Valdivieso, 2000; Artiga et al, 1998).

### **1.11.3. Apo E'nin Biyosentezi**

Apo E'nin pek çok organ ve hücre tarafından sentezi olan bir glikoproteindir. Özellikle sentez yeri karaciğerdeki hepatik parankimal hücrelerdir. Karaciğer haricinde özellikle beyin, ovaryumlar, adrenal, testis, dalak ve böbreklerde sentez edildiği belirlenmiştir. Karaciğer plazmada bulunan Apo E'nin yaklaşık olarak 2/3'nü sentezlemektedir Karaciğerden sonra en fazla Apo E mRNA'sının sentezi beyinde görülür. Beyinde özellikle astrositler Apo E sentezinden sorumludur. Çok sayıda organdaki pek çok hücre tipinin Apo E sentezine katılmaları, Apo E'nin lipid transportundaki ve bunun haricinde bilinmeyen diğer rollerinin önemini göstermektedir. Periferik sinirlerde Apo E'nin sekresyonu makrofajlar tarafından olur. Ayrıca arterial duvarlardaki makrofajlar tarafından da sentezi yapılmaktadır. Apo E'nin primer translasyon ürünü pre-Apo E (317 amino asit uzunluğunda) 18 amino asitlik bir sinyal peptidine sahiptir. Daha sonra karbonhidrat yanzincirlerin eklenmesiyle modifikasyonu golgide olur ve sinyal peptidin çıkarılması ise intraselüler olarak meydana gelir (Zannis et al, 1984; Paik et al, 1985; Paik et al, 1987).

#### 1.11.4. Apo E'nin protein yapısı

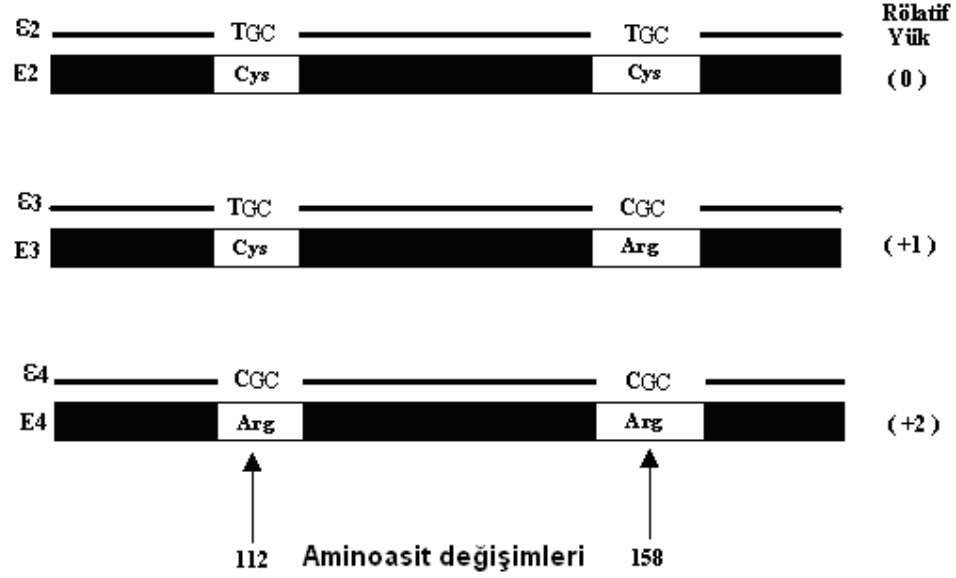
1970'lerin başında VLDL'nin (very low density lipoprotein) arginin'ce zengin komponenti olarak tanımlanması ile Apo E çalışmaları başlar. İlk başlarda Arg amino asiti oranı %11 bulunduğundan dolayı "arginine-rich apoprotein, ARP" olarak adlandırılır, daha sonraki çalışmalarla birlikte bu alandaki alfabetik adlandırmaya uygun olarak "Apo E" olarak adlandırılır. Apo E, mRNA'sı 1163 bp uzunluğundadır. Birincil translasyon ürünü 317 amino asitten oluşmaktadır. Bu birincil ürüne 18 amino asitlik sinyal peptidi dahildir. Olgun Apo E, 34,200 kDa moleküler ağırlıkta ve 299 amino asitlik bir proteindir. Ayrıca plazmadaki Apo E'nin yaklaşık %20'si threonine 194'de N-acetylneuraminate (sialik asit) eke sahiptir. Apo E, bir bağlantı bölgesi (Hinge Region) ile birbirinden ayrılan iki bağımsız olarak katlanmış domaine sahiptir; 22kDa N-terminal domain (1-191. residüler) ve 10 kDa C-terminal domain (216-299. residüler). Bu iki domain thrombin, elastase, trypsin ve chymotripsin gibi enzimlerle, Apo E'nin hidrolizi ile birbirinden ayrılabilirler. (Nolte and Atkinson, 1992; Narayanaswami and Ryan, 2000)



Şekil 1.7: Apo E'nin protein yapısı (Nolte and Atkinson, 1992 'den uyarlanmıştır).

Bu iki domain farklı fiziksel özelliklere sahiptirler; N- terminal domain daha çok tipik bir globular protein gibi davranırken, C-terminal domain daha çok tipik bir apolipoprotein gibi davranmaktadır. Apo E'nin bu iki domaini farklı fonksiyonlara sahiptirler. 22 kDa'luk N-terminal domaini resptör ve heparin (preteoglikan) bağlamaktan sorumludur. Resptör bağlama bölgesi özellikle 136–150. residülere lokalize olmuştur, fakat 171–183. residülerde reseptöre bağlanma da önemlidir. Reseptörlere bağlanmada Arg ve Lys residüleri özellikle önemlidir. C-terminal domainin 245–299. residüleri ana lipi bağlama bölgesidir. Lipid olmadığı durumlarda, C-terminal üzerindeki 267–299. residüler serbest Apo E'nin (lipid-free) tetramerizasyonuna aracılık eder. Ek olarak 21–62. residülere karşılık gelen bölge tiroid hormonu için bağlanma bölgesi oluşturur. Apo E , Apo AII ile Cys amino asit residülerini içeren disülfid bağları ile homodimer veya heterodimer oluşturabilir. Üç Apo E izoformunda N-terminal domainlerinin üçüncül yapıları x-ışını kristalografisi ile çözülmüştür. Apo E'nin N-terminal domaini dört heliksin şu şekilde sıralanması ile meydana gelmiştir: heliks 1, 24–42. residüler; heliks 2, 58–81. residüler; heliks 3, 87–122. residüler ve heliks 4, 130–164. residüler arasında meydana gelmektedir. Ayrıca kısa bir helikte (44–53. residüler) 1. ve 2. heliksleri birbirine bağlar. Bu dört heliks birbirlerine antiparalel olarak düzenlenmişlerdir. Reseptör ve heparin bağlama bölgesi 4. heliks içersinde bulunmaktadır. Apo E4 izoformunda, 112. pozisyonda Cys amino asidinin yerine Arg bulunması (E3 formu ile karşılaştırıldığında) birkaç tuz köprüsünün yeniden düzenlenmesi kadar spesifik residülerin yan zincir oriyantasyonlarında da dikkat çekici bazı kaymalara neden olur. 112. residüde Arg bulunması, 3. helksi üzerinde ki bu Arg ile 2. heliks bulunan 109. pozisyonadaki glutamik asit arasında yeni bir tuz köprüsünün oluşmasına neden olur. Lipoprotein bağlamadaki farklılıklar, izoformlarda ki N- ve C-terminal domainlerin arasında meydana gelen interaksiyon değişiklikleri tarafından belirlenir. C-terminal domainin kritik lipid bağlama bölgesi içersinde olan 255. glutamik asidin yan zinciri E4 formunda 61. pozisyonda ki Arg'nin yan zincirin ile tuz köprüsü oluşturur, E2 ve E2 de Arg 61'in oriyantasyonundaki farklılıktan dolayı bu tuz köprüsü oluşmaz. Sonuçta; E4 formu öncelikle daha geniş, trigliseridlerce zengin VLDL'ye bağlanırken, E3 ve E2 formu daha küçük, fosfolipidçe zengin HDL'ye öncelikli olarak bağlanır. E4 formunda 61 veya 255. pozisyonlarda bir mutasyon

meydana gelirse lipid bağlama tercihi VLDL'den HDL'ye değişir (Mahley and Rall, 2000; Weisgraber et al,1990).



**Şekil 1.8:** Apo E Polimorfizmi ve aminoasit değişimleri.

Aynı şekilde E3 formu ile karşılaştırıldığında E2 isoformunun reseptöre neden daha zayıf bağlandığını konformasyonel değişikliğe bağlı olarak açıklayabiliriz. 158. pozisyondaki Cys, 4. heliks içersindeki ve heliks 3 ile 4 arasındaki tuz köprülerinin organizasyonunu ciddi şekilde değiştirir ve aynı zamanda 140–150. residülerin reseptör bağlama bölgesinin pozitif iyon potansiyelini düşürerek E2'nin reseptöre bağlanma kapasitesini azaltır (Dong et al, 1994; Mahley and Rall, 2000). Apo E'nin reseptör bağlanma fonksiyonu dikkate değer olarak isoform spesifiktir. In vitro çalışmalar E3 ve E4 formlarının bağlanma özellikleri karşılaştırıldığında; E4'ün biraz daha fazla afinite ile LDL reseptörlerine bağlandığı gözlenmiştir. Fakat E2 formu bağlanma yönüyle eksik kapasitedir en fazla E3'ün bağladığı miktarın %2 ile bağlanabilmektedir. E2'deki 140–150. residülerdeki pozitif iyon potansiyelinin düşüklüğü bu zayıf bağlanma aktivitesinin en büyük sebebi olarak görülebilir. İlk yapılan biyokimyasal çalışmalar, Arg 158'in direkt iyonik interaksiyona katılmadığını ve 158. residüdeki Cys subsitasyonunun reseptör bağlanma bölgesini indirekt etkilediğini ortaya koymuşlardır ve bu görüş daha sonra yapılan x-ışını kriptalografisi ile de desteklenmiştir. Apo E'nin bu yaygın polimorfik

yapıları insan popülasyonlarında plazma lipid ve lipoprotein konsantrasyonunu etkiler. Apo E4 formu LDL kolesterol (LDL-C) ve total kolesterol (TC) konsantrasyonunun artmasında rol oynar. Apo E2 formu ise LDL-C konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Erkeklerde ve kadınlarda yaygın Apo E allelerinin frekansları farklılık göstermemektedir. Apo E, HDL metabolizmasında ve revers kolesterol transportunda önemli rol oynar (Siest et al, 2002).

Apo E'nin fizyolojik fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. LDL (Apo B/E) ve Apo E (LRP) reseptörleri için ligand rolü vardır. TG'ce zengin lipoproteinlerin (VLDL, şilomikronlar, şilomikron remnantları) temizlenmesinde önemlidir ayrıca VLDL'nin LDL'ye dönüşümünde gerekli olabilir. Apo E taşıyan HDL'nin kandan uzaklaştırılmasından sorumlu olduğu görülür.
2. HDL aracılığıyla revers kolesterol transportuna yardımcı olur.
3. Makrofajlar tarafından sentezlenen Apo E, scavenger reseptörleri üzerinden okside olmuş VLDL'nin düzensiz alınımını inhibe eder ve makrofajların foam hücrelerine dönüşümünü engeller. Ayrıca makrofajlar tarafından sentezlenen Apo E reverse kolesterol transporu için ek bir pathway sağlar.
4. Apo E, sinir hücresi rejenerasyonuna, immün cevabın düzenlenmesinde ve nöronlar ile düz kas hücrelerinin farklılaşması veya gelişiminde rol oynar (Mahley and Rall, 2000.)

#### **1.11.5. Apo E Genotipi ve Plazma Lipoprotein-Lipid Seviyeleri**

Pek çok popülasyon çalışmasında, E2 ve E3 allelleri karşılaştırıldığında; düşük seviyedeki plazma total kolesterolü (TC) ve LDL kolesterolü (LDL-C) E2 alleli ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bunun yanında E2 allelinin yüksek trigliserid (TG) seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. E4 alleli E3 alleli ile karşılaştırıldığında ise bunun tersi olarak E4 plazmadaki TC ve LDL-C seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Plazma Apo E konsantrasyonu, E2/2 isoformu taşıyıcılarında en yüksek, E3/3 taşıyıcılarında orta derecede ve E4/4 taşıyıcılarında ise en düşük seviyededir. En yaygın genotipli bireylerle (E3/3), E2 alleli taşıyıcıları

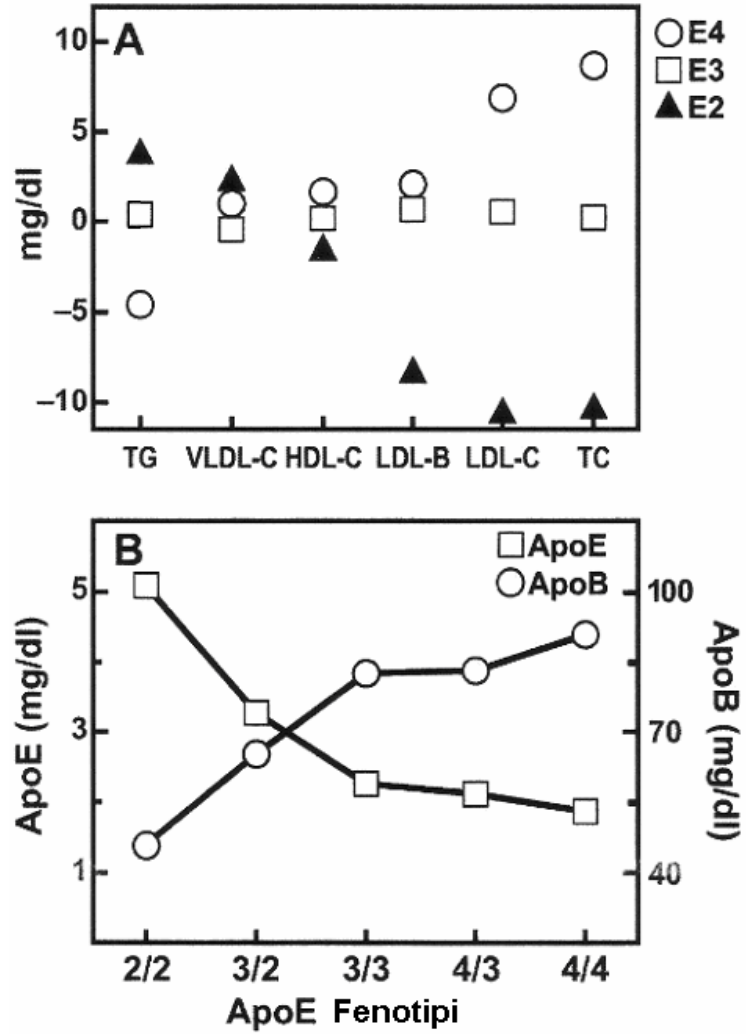
karşılaştırıldığında TC, LDL-C ve APO B konsantrasyonlarındaki ortalama %5-15'lik bir düşüş gözlenirken, E4 alleli taşıyıcılarında ise aynı parametrelerde %5-10'luk bir artış söz konusudur. Başka hiçbir tek gen polimorfizmi, bireyler arasındaki plazma lipoprotein konsantrasyonundaki varyasyona Apo E yaygın gen polimorfizmleri kadar katkıda bulunmaz. Yaygın Apo E polimorfizmlerinin plazma lipid ve apolipoprotein üzerine etkisi değişmez değildir, bu etki farklı populasyonlarda ve etnik subgruplarda farklıdır. Apo E bireyin total lipid ve apolipoprotein seviyesi üzerindeki tek etken değildir, Apo E hangi formda olursa olsun diyet, cinsiyet, kilo dağılımı ve yaş gibi bireyin genel durumunu oluşturan parametrelerde bu seviyeleri etkileyen faktörlerdir. Örneğin, Apo E4 allelinin kolesterol artırıcı etkisi, kolesterol ve doymuş yağasidi içeren diyetle artmaktadır, aynı zamanda cinsiyetin dışı oluşu E4 allelinin bu etkisini artırmaktadır. Plazma lipid seviyelerinin Apo E isoformlarına göre farklılık göstermesinin başlıca nedeni, sirkülasyondan remnantların temizlenmesine olan etkileridir. E2 isoformu E3 ile karşılaştırıldığında sirkülasyondan remnant temizlenmesine olan etkisi düşüktür, bunun sebebi ise Apo E2 içeren partiküllerin defektif reseptör bağlanma kapasitelerinden kaynaklandığı görülmektedir. Bunun tersi olarak E4'de remnant temizlenmesi E3 göre çok daha fazladır. Ayrıca Apo E isoformlarının lipoprotein tercihlerinin farklı olması plazma seviyelerindeki değişimi açıklayabilir. E4 isoformu daha çok VLDL, IDL ve LDL ile bağlanırken, E2 formu ise HDL'yi tercih etmektedir (Mahley and Rall, 2000; Mahley, 1988).

## **1.12. Apo E ile İlişkili Hastalıklar**

### **1.12.1. Apo E ve Tip III Hiperlipidemia (Familial Dysbetalipoproteinemia)**

Ailesel tip III hiperlipidemia (FHL) lipoprotein metabolizmasında medya gelen genetik bir hastalıktır. Hastalığın biyokimyasal ve klinik özellikleri farklılık gösterebilir, hastalığı oluşturan bütün bozukluklar her hastada gözlenmeyebilir. Hastalarda plazma kolesterol ve trigliserid seviyesi yükselmiştir, bu yükselişin başlıca nedenlerinden biride  $\beta$ -VLDL'nin plazmada birikmesidir.





**Şekil 1.9:** (A) Apo E allellerinin lipid parametreleri üzerine olan etkisi. (B) Apo E fenotiplerinin plazma Apo E ve Apo B üzerine olan etkileri. (TG, total plazma gliserid; VLDL-C, VLDL kolestrol; HDL-C, HDL kolestrol; LDL-B, LDL Apo B; LDL-C, LDL kolestrol; TC, total plazma kolestrol) (Mahley ve Rall, 2000)

$\beta$ -VLDL, şilomikron ve VLDL'den türemiş karaciğer ve ince barsak orjinlidir, ayrıca Apo C içeriği daha az kolestrol ve Apo E'ce ise zengin bir bir remnant lipoproteinidir. Tip III FHL, erişkinlerde gözlenmeye başlar ve özellikle periferik arterlerde ateroskleroz geliştirmeye yatkınlık sağlar, ayrıca erkeklerde kadınlardan daha yaygındır. Kadın hastaların hepsi postmenopozdur. Xanthoma'lar belirgin klinik özelliğidir, xanthoma striata palmaris tip III FHL için spesifiktir. Bu hastalarda birincil metabolik defekt VLDL ve şilomikron remnantları üzerindeki Apo E'nin mutant formlarının yol açtığı karaciğerde bu remnant partiküllerinin yetersiz

kandan uzaklaştırılışıdır. Hastaların hepsi Apo E2 alleli için homozigottur. Apo E2/2 isoformunun lipoprotein reseptörlerine bağlanmasındaki zayıflık (Apo E3'ün bağlanma kapasitesinin %2'si) remnant temizlenmesini geciktirir. Bütün Apo E2 homozigotlar tip III FHL hastası değildirler. Gerçekte pek çok Apo E2/2'li birey normal hatta hipolipidemik olabilir (HDL ve LDL seviyelerinin düşük olması nedeniyle dolaylı). Bu kişilerde de  $\beta$ -VLDL gözlenebilir fakat plazmada birikmez. Bu da açıkça tip III FHL gözlenebilmesi için diğer sekonder faktörlerin hastalığın gelişimine katkıda bulunması gerektiğini gösterir. Ayrıca Apo E'nin diğer Apo E3 (Cys112→Arg; Arg142→Cys), E2 (Lys146→Gln), E1-Harrisburg (Lys146→Glu), E2 (Arg→Cys), E2-Christchurch (Arg136→Ser) ve E3-leiden gibi nadir mutantları da tip III FHL ile ilişkili bulunmuştur (de Knijff et al, 1994)

### 1.12.2. Apo E ve arterosklerozis

Apo E'nin lipid metabolizmasında ve özellikle arterial duvarların biyolojisine ilişkin önemli rolü vardır. Genel olarak Apo E'nin ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır, fakat bu koruyucu etki Apo E isoformuna, Apo E'nin total plazma seviyesine ve Apo E'yi sentezleyip sekresyonundan sorumlu hücre tipine bağlı olarak değişir. Apo E'nin aterosklerozdaki koruyucu etkisi, onun normal lipoprotein metabolizmasındaki özellikle remnant lipoproteinlerinin dolaşımdan uzaklaştırılması ve revers kolestrol transportundaki rolünden açıkça bellidir. Aynı şekilde, Apo E knockout fare çalışmaları, Apo E'nin aterosklerozun önlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur. Apo E null fareler normal diyetle beslenmelerine rağmen yüksek lipid seviyelerine ve aşırı miktarda kolesterolce zengin  $\beta$ -VLDL'ye sahiptirler bu fareler ciddi aterosklerotik lezyon geliştirirler. Apo E belirli şartlar altında ateroskleroz riskini artırmaktadır. Tip III FHL'li bireylerin taşıdığı Apo E2 riski artırmaktadır. Diğer yandan, artmış kolesterol seviyeleriyle Apo E4 riski artırıcı olarak bulunmuştur. Apo E'nin plazma seviyesinin optimal oluşu aterosklerozda en koruyucudur, bu seviyenin optimalin üzerinde veya altında oluşu aterosklerozu koruyucu yöndeki etkiden çok riski artırıcı olmaktadır. Yaygın Apo E genotiplerinin, ateroskleroz gelişimi ve kardiyovaskular hastalıklarla ilişkisi genotip spesifik plazma lipoprotein profillerinin farklı oluşuyla ilişkili

olabilir. Apo E2 taşıyıcıları Apo E3/3 genotiplilerden daha az riske sahiptir çünkü Apo E2 taşıyıcıları daha düşük aterojenik lipoprotein profiline sahiptirler, hâlbuki Apo E4 taşıyıcıları ise lipoprotein profillerinden dolayı daha yüksek risk taşımaktadırlar (Nakashima et al, 1994; Slotter et al, 2001; Soufi et al, 2002).

### **1.12.3. Apo E ve Kardiyovasküler Hastalıklar**

Koroner kalp hastalıklarının (CHD) içine alan kardiyovaskular hastalıklar (CVD) gelişmiş ülkelerde ölümlerin en önemli sebebidir. Nadir olarak gözlenen lipoprotein hastalıklarının CHD üzerine olan etkileri düşüktür. Bu hastalıklarda genel populasyona bakıldığında en yaygın olarak gözlenen mutasyon Apo E lokusunda olanlardır. Yapılan çalışmalar Apo E polimorfizminin plazma kolestrol seviyesinde %2-11'lik bir varyasyona yol açtığını göstermiştir. E4 yüksek LDL kolestrol seviyesi ile ilişkili bulunurken E2 LDL kolesterol seviyesini düşürmektedir. Bunların yanında yapılan meta analiz çalışmaları trigliserid seviyelerindeki farklılıklarla Apo E formları arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca son çalışmalar Apo E'nin makrofajlardan kolesterolün hücre dışına atılması, platelet agregasyonu, allel spesifik antioksidant ve immün aktiviteler üzerine olan etkisinin CHD oluşumu üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Apo E'nin aterosklerozisdeki ve ayrıca yukarıda sayılan etkileri göz önünde bulundurulduğunda Apo E'nin yaygın olan polimorfik formlarının CVD ile ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Apo E'nin bu hastalıklarla olan ilişkisi farklı populasyonlarda yapılan hasta-kontrol düzeyindeki allel dağılımlarını ve risk oranlarını ortaya koyan tarzdaki çalışmalardır (Frikke-Schmidt et al, 2000; Eichner et al, 2002; Lahoz et al, 2001). Song ve arkadaşlarının (2004) yılında yapmış oldukları meta analiz çalışmasında ise 48 çalışmayı incelemişlerdir. Bu meta analiz toplam 15 492 hasta ve 32 965 kontrolü içermektedir. 1966 yılından Ocak 2004'e kadar MEDLINE'da "apolipoprotein E, apo E, APOE polymorphism, atherosclerosis, coronary heart disease, ischemic heart disease, coronary artery disease, myocardial infraction" başlığı ile yapılmış arama sonucu elde edilen yayınlanmış çalışmalar bu meta analizin kaynağını oluşturmuştur. Kontrol gruplarındaki Apo E allel frekanslarının varyasyonları dikkat çekicidir, en yaygın olan E3 alleli %67'den (Fransız çalışması) %90'lara (Japon) çıkabilmektedir. Yine

aynı şekilde E2 için %03 (İtalyan) - %15 (Alman) ve E4 alleli için %03 (Türkler) - %23 (Finlandiya) gibi coğrafik ve etnik farklılıklar gözlenmektedir. Meta analiz sonucunda E3/3 genotipi ile E4 alleli taşıyıcıları karşılaştırıldığında CHD için bu allelin riski %42 arttırdığı, E2 allelinin ise herhangi bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Apo E polimorfizmi ve CHD arasındaki sebep sonuç ilişkisi tam olarak ortaya çıkarılmadıysa da E4 allelinin yüksek LDL-C ve düşük HDL-C ile ilişkili olması bu etkide önemli rol oynamaktadır (Song et al, 2004). Stengard ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, orta yaştaki bireylerin seçildiği dokuz popülasyonda E3/3 genotipi veya E2 alleli taşıyıcıları ile E4 taşıyıcıları karşılaştırıldığında; CHD için ölüm riskini E4 allelinin yaklaşık %40 artırdığını göstermişlerdir (Stengard et al, 1998). Türkiye’de yapılmış olan bir çalışmada ise MI geçirenler ve sağlıklı kontrollerdeki Apo E genotiplerinin dağılımı incelenmiştir. Allel dağılımları hasta grubunda E3 %91, E2 %7, E4 %2 ve kontrol grubunda E3 %87.5, E2 %6.7, E4 %5.8 bulunmuştur (Hergenc ve ark, 1995). Attila ve ark.’nın (2001) yılında Güney Anadolu bölgesinde Adana’da, 107’si CAD hastası toplam 199 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada E2 ve E4 allel frekanslarını ve E4 alleli taşıyan genotiplerin CAD’lı hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir (Attila ve ark, 2001).

#### **1.12.4. Apo E ve Kanser**

Apo E lipid transport ve metabolizmasında önemli rol oynamasının yanında neoplastik gelişim için potansiyel önemi olan; hücre çoğalması, immünoregulasyon ve anjiyogenesis gibi farklı fonksiyonlarda sahiptir (Mahley and Rall, 2000). Apo E yüksek afinite ile preteoglikan ve heparine bağlanır, böylelikle lenfositleri, düz kas hücreleri, endotelial hücreleri ve tümör hücrelerini içeren pek çok hücre tipinin proliferasyonunu inhibe eder. Apo E’nin antiproliferatif mekanizması halen geniş ölçüde tam olarak bilinmemektedir. Bazı son bulgular apoptotik hücre ölümünü artırdığını ileri sürmektedir (Niemi et al, 2002). Düşük kolesterol seviyesinin kanser riskini artırdığı, dolayısıyla E2/2 ve E2/3 genotipli bireylerde  $\epsilon$  2 allelinin düşük kolesterol seviyesi ile ilişkisinden olayı kanserde risk taşıyabileceği görüşü ileri

sürülmüştür (Katan, 2004). Bütün bu özellikler Apo E'yi karsinogesisdeki bazı safhalar için sorumlu yapmaktadır.

Farklı Apo E varyantları varlığında safra asitlerinin ve kolesterolün hepatik metabolizmasında değişiklikler olur. Rol oynadığı bir diğer yerde insan fecesindeki ikincil safra asitlerinin sentezlenmesi ve sekresyonu ile yakından ilgilidir. Bu ikincil safra asitlerinin kolorektal karsinogenesisi teşvik ettiği düşünülmektedir. Böylelikle Apo E genotipleri kolestrol absorpsiyonu ve safra asidi üretimindeki varyasyonlarla ilişkili olarak kolorektal carsinogenesisde önemli olabilirler (Watson et al, 2003). Apo E  $\epsilon$  4 allelini taşıyan bireylerde kolesterolün intestinal absorpsiyonunda artış ve deoksikolik asitin safra salınımında düşüş gözlemlendi. Luminal kolesterol iletimi ve fecal safra asit seviyesindeki değişimler, proksimal adenomalar ve kanserlerle Apo E  $\epsilon$  4 alleli arasındaki olası koruyucu ilişki altındaki biyolojik mekanizmayı açıklamakta kullanılmaktadır. Deoksikolik asit gibi ikincil safra asitlerinin sıçanlarda kimyasal olarak indüklenmiş kolon karsinogenesisini artırdığı bilinmektedir. Kolorektal kanser ve adenomalı hastalarda ikincil safra asitlerinin fecal salgılanması artmıştır ve ayrıca kolorectal adenomalılarda deoksikolik asitin serum seviyesi de yükselmiştir (Shinomiya et al, 2001). Apo E polimorfizmi ve kolorektal kanser (CRC) riski arasındaki ilişki üzerine ilk çalışma Finlandiya'da gerçekleştirildi. 135 kolorektal adenomalı ve 122 kolorektal karsinomalı hasta grubu ile 199 kontrolün araştırıldığı. Bu çalışmanın sonunda Apo E geninin  $\epsilon$  4 allelinin varlığının proksimal kolonda adenom ve karsinom (distal olanlarda değil) gelişimine karşı koruyucu rolü olduğu ileri sürüldü (Kervinen et al, 1996). Apo E 4 alleleline sahip bireylerde safra asidinin üretiminde bir azalmanın gözlenmesi bu durumun açıklanmasında kullanıldı. Japonya'da yapılan bir çalışmada ise Apo E genotipleri, serum lipidleri ve kolorektal adenomalar arasındaki ilişki incelenmiş. Apo E  $\epsilon$  4 alleli taşıyanlar arasında proksimal kolon adenoma riskini azalması yönünde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Distal adenomalar kontrollerle karşılaştırıldığında serum trigliserid konsantrasyonunun özellikle  $\epsilon$  4 alleli olmayan subgruplarda anlamlı derecede yükseldiği gösterilmiştir (Shinomiya et al, 2001). Niemi et al. (2002) Yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre; gastrointestinal sistemdeki makrofaj ve endokrin hücrelerinin Apo E'nin başlıca kaynağı olduğunu gösterdiler. Makrofaj kaynaklı Apo E'nin epitel integritesinde ve hücre büyümesinde etkili olduğunu ileri sürdüler

(Niemi et al, 2002). Apo E polimorfizminin CRC'deki muhtemel rolü sorusuna verilecek cevap, uygun dizayn edilmiş çalışmaların yokluğu nedeniyle halen açık değildir. Meme kanseri ve Apo E arasındaki ilişki; meme kanserli hastalarda ölçülen yükselmiş trigliserid seviyesi ile kurulmuştur. Apo E  $\epsilon$  4 trigliseridin temizlenmesini azaltmak kaydıyla total plazma trigliserid seviyesini yüksek tutmaktadır. Artmış trigliserid seviyesinin globulin bağlı seks hormonu seviyesinde azalma ile ilişkili olduğu bununda serbest estradiol seviyesini yükselterek meme kanseri riskini artırdığı düşünülmektedir. Moysich ve ark., yaptıkları çalışmada yüksek trigliserid seviyesi ve meme kanseri arasında buldukları ilişkiyi  $\epsilon$  4 allelinin etkilediğini ortaya koymuşlardır (Moysich et al, 2000). Benign meme kanserli ve benign prostat kanserli hastalarla yapılan bir diğer çalışmada ise; Apo E allelik frekanslarının meme, benign meme ve kontrol grupları arasında anlamlı bir değişim göstermediği yönündedir. Prostat kanserli, benign prostat ve kontroller arasında da allelik frekans bakımından bir değişim gözlenmemiştir (Niemi et al, 2000). Yaylım ve ark.(2003) yine Niemi'nin çalışmasında olduğu gibi Türk meme kanserli hastalarla Apo E genotipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemezken, Sazcı ve ark. Apo E  $\epsilon$  4 allelini koruyucu allel olarak bulmuşlardır (Yaylımve ark, 2003, Sazcı ve ark, 2003). Apo E'nin meme kanseri üzerine olan etkisini hücre proliferasyonu ve kliniksel sonuçları açısından inceleyen bir çalışmaya göre de; genel bu hipotezlere karşı olarak Apo E'nin tümör büyüme oranını ve kliniksel sonuçları etkilemediği gösterilmiştir (Zunarelli et al, 2000a). İleri yaştaki Apo E  $\epsilon$  4 taşıyan merkezi sinir sistemi neoplasmlı hastalarda nispeten hastalığın daha iyi bir seyir izlediği gözlenmiştir (Zunarelli et al, 2000b). Yapılmış ve yapılmakta olan çalışmalar halen Apo E genotipleri ve genel kanser patogenesisi arasındaki ilişkiyi tam olarak ortaya koyamamış veya açık bir pattern gösterememiştir. Özellikle Apo E'nin lipid metabolizması haricindeki hücresel faaliyetlerdeki rolünün tam aydınlatılmasıyla, kanserleşme mekanizmasındaki rolünün daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

#### **1.12.5. Apo E ve Nörodejeneratif Hastalıklar**

Alzheimer hastalığı (AH) ilk önce otozomal dominant özelliğe sahip ailesel bir hastalık olarak tanımlanmasına rağmen daha sonraları hastalığın çoğunlukla

sporadik olarak gözleendiği ortaya konmuştur. Üç gendeki mutasyonlar (APP, PS1 ve PS2) early-onset ailesel AH ile ilgili olarak gösterilirken, APO E esas olarak daha kompleks olan sporadik late-onset AH ile ilişkili bulunmuştur (Bales et al, 2002; Higgins et al, 1997) . Apo E nin AH'na olan etkisi; bu genin üç ana alleleline göre değişmektedir. Merkezi sinir sistemi içersinde Apo E birincil olarak astrositlerde ve mikroglialarda sentezlenmektedir. Beyinde sentezlenen Apo E'nin serebrospinal sıvıda Apo E içeren lipoproteinlerin taşınmasında rol aldığı kadar membran tamiri esnasında lipid ve kolesterolün iletimi ayrıca snaptik plastisitede de rol aldığı görülmüştür. Yaygın olarak gözlenen allelerin AH geliştirmekteki riskleri E4>E3>E2 şeklindedir. E4 ve late-onset AH arasındaki kritik ilişki hasta-kontrol çalışmaları ile ortaya konmuş ve risk hesaplamaları yönünden rutin uygulamalara da girmiştir. E2 alleli ise yapılan çalışmalarda AH riskini azaltıcı yönde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Apo E genotiplenmesi tanıda tek başına AH için spesifik ve tam duyarlı tanımlayıcı test değildir, fakat klinik kriterlere birlikte kombine olarak değerlendirildiğinde tanıda kesinliği artırmaktadır (Mayeux et al, 1998; Raber et al, 2004; Bales et al, 2002; Higgins et al, 1997). Apo E alleleri ile AH arasındaki moleküler mekanizma tam olarak ortaya konulmamıştır. 112. ve 158. aminoasitlerde meydana gelen değişiklikler proteinin reseptörlerine ve diğer proteinlere olan bağlanma özelliklerini değiştirdiği bilinmektedir. Bu aminoasit farklılıkları isoformların Aβ ve Tau proteinlerine bağlanmalarında farklılıklar oluşturmaktadır. Özellikle ApoE4 isoformu Aβ peptide ApoE3 isoformundan çokdaha hızlı ve fazla bağlanma özelliği göstermektedir. Aβ peptidi ile bağlanmış ApoE4'ün oluşturduğu monofibriller plaklar halinde yapıları oluşturmaktadır. ApoE4, ApoE2 ve E3'den farklı olarak in vitro Tau proteinine bağlanmamaktadır. Apo E3 ve Tau proteini arasındaki interaksiyon tau fosforilasyonuna ve nörofibrilar yumak (tangle) oluşumuna karşı koruma sağlamaktadır. Apo E3 mikrotübül associated proteinleri olan Tau ve MAP2c ile kompleks oluşturarak mikrotübül stabilizasyonunda rol oynar, ApoE4 ise bu proteinleri stabil bir kompleks oluşturacak şekilde bağlayamamaktadır. ApoE4'ün bu özelliği nörofibrilar yumak ve helikal filamentlerin oluşumunu sağlayarak AH riskini artırmaktadır (Laws et al, 2003; Rocchi et al, 2003). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki Apo E genotipi AH riskini ve patolojisini büyük oranda etkilemektedir, bu etkileşimin tam olarak ne olduğu Apo

E'nin fizyolojik rollerinin ne olduğunun tam olarak ortaya konulması ile aydınlanacaktır.

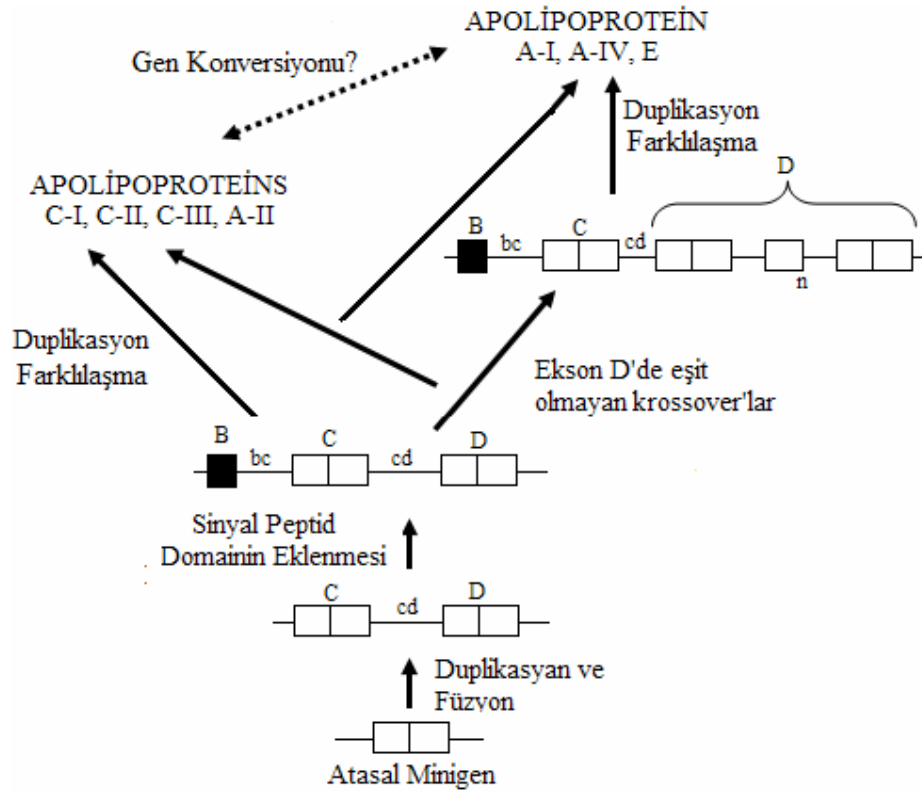
Parkinson hastalığının erken veya geç ortaya çıkması ile Apo E polimorfizmi yoğun olarak araştırılmış olmasına karşılık ikisi arasında halen tam olarak bir ilişki kurulamamıştır. Apo E4 formunun Parkinson hastalığının gelişiminde rolü olduğu ve bunun altında yatan mekanizmanın AH ile benzer olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada E4 formunun erken, E3/3 formunun orta yaşlarda, E2 formunun ise geç yaşlarda hastalığın ortaya çıkması ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Zarepars et al, 1997 ve 2002). Yapılan bir diğer çalışmada ise E4 formunun hastalığın oluşması veya erken ortaya çıkışı ile alakalı olmadığı fakat demanslı Parkinson hastaları ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Parsian et al, 2002).

### **1.13. APO E Geninin Evrimi ve Dünya Populasyonlarındaki Dağılımı**

Apoprotein gen ailesinin evrimine bakıldığında; apolipoprotein A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III ve E genleri arasında ki genomik yapısal ilişki dikkati çekmektedir. Boguski ve ark., apoproteinlerin evrimi ile ilgili yaptıkları çalışmada; belki iki ya da üç tekrar ünitesi içeren primordial minigenin duplikasyonlar ve birleşmelerle iki eksonlu tek bir transkripsiyonel ünite oluşturduğu yönünde hipotezlerini ileri sürmektedir. Daha sonra bu iki ekson farklı oran ve şekilde evrimleşirken, bu yapıya bir sinyal peptidi kodlayan dizinin eklenmesi bu aşamada olabilir. Genin bu hali yani üç eksonlu yapı küçük apolipoproteinlerin (örn; C-III ve A-II) atası olabilir. Ekson D'de eşit olmayan pek çok crossing-over'a maruz kalan bu genin diğer bir kopyası ise daha geniş olan A-I, A-IV ve E genlerinin öncülü olabilir (Boguski et al,1986). Li et al, ise bu genlerin ortak bir atadan evrimleştiğini ve bu ortak atanın günümüz Apo C-I'in yapı ve uzunluğuna çok benzediğini ileri sürmektedirler (Li et al, 1988). İnsan olmayan primatlarla yapılan çalışmalarda, baboon APO E genin, E 4 isoformunu kodladığı ortaya konulmuştur (Hixson et al,1988). Halen atasal formun hangisi olduğu üzerine tam bir anlaşma sağlanamamışken, Hanlon ve Rubisztein'nin yaptığı çalışmalarda 24 şempanze ve diğer primat türlerinden bireyler incelenmiş ve bunların benzer Apo E4 formuna sahip oldukları gözlenmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda Apo E4 atasal form olduğu, insan ve şempanze evrimsel hatlarının ayrılmasından sonra bu formdan Apo E2 ve E3'ün oluştuğu görüşü desteklenmiştir



(Hanlon and Rubinsztein, 1995). Yapılan bu çalışmadan sonra insan popülasyonlarında yaygın olan formun Apo E3 olmasına karşılık atasal formun Apo E4 olduğuna ilişkin görüşler artmıştır. Apo E4 atasal allel olmasına rağmen zaman içerisinde 112arg→cys mutasyonunu taşıyan allelin (Apo E3) yerine geçmesi ile popülasyonlardaki yaygınlığı azalmıştır. En yüksek Apo E3 sıklığı çok uzun süredir tarımsal ekonomiye geçmiş Akdeniz havzasındaki (%84,9–89,8) veya Doğu Asya'daki (%82–87) popülasyonlarda bulunmuştur. Besin toplayıcılığında besin üretimine geçen bu popülasyonlardaki geçiş Apo E3 formunun avantajlı duruma geçerek popülasyondaki sıklığının artmasına neden olmuştur.



**Şekil 1.10:** Apolipoprotein gen evrimi için model (Boguski et al, 1986).

Günümüzde Apo E4 formunun daha sık olarak görüldüğü Pigmeler, Khoi San, Malezya ve Avustralya Aborjinleri, Papua Yerlileri, Bazı Yerli Amerikalılar ve Lapp'lar gibi topluluklar mevcuttur bunlar halen tarımsal üretime geçememiş, zayıf beslenen ve toplayarak besin bulma kültürünün hakim olduğu popülasyonlardır. Bu çevresel koşullarda yaşayanlar için Apo E4 halen kullanışlı olabilir. Bu popülasyonların çoğunda yaşayan bireyler Batı ülkelerinde yaşayanlara göre düşük

plazma kolestrol seviyesine sahiptirler ve Apo E4'ün intestinal seviyede kolesterolün yüksek absorpsiyonu ve yüksek plazma kolesterol seviyesi ile ilişkili bulunması bu alleli taşıyan bireylere (kolesterolce zayıf diyetle beslenen) kolesterol seviyesinin dengelenmesinde avantaj sağlayabilir (Corbo and Scacchi, 1999; Scacchi R et al, 1997; Mahley and Rall, 1999).

**Çizelge 1.11:** Farklı populasyonlardaki Apo E allel frekansları (Molero et al, 2001(1), Souza et al, 2005 (2), Raygani et al, 2005 (3), Al-Khedhairi et al, 2004 (4), Al-Bustan et al, 2005 (5), Hong et al, 1997 (6), Kamboh et al, 1989 (7), Sklavounou et al, 1997 (8), Kowalska et al, 1998 (9), Schiele et al, 2000 (10), Seet et al, 2004 (11), Zekraoui et al, 1997 (12), Corbo and Scacchi, 1999 (13), Crews et al, 1993 (14), Kamboh MI, 1995 (15)).

Populasyon (Ref.)	n	Allel frekansı (%)			
		ε2	ε3	ε4	
Afrika Pigmeleri (12)	70	5.7	53.6	40.7	
Papua (13)	110	14.5	48.6	36.8	
Afrikanlı (Nijerya)(7)	176	2.8	66.2	31	
Polinezya (13)	111	11	63	26	
Avusturalya Aborjinleri (13)	64	0	74	26	
USA Blacks (7)	194	3.4	70.6	26.0	
Etiyopya (13)	164	3.1	81.1	14.3	
Sudi Arabistan (4)	165	0	84.5	15.5	
Malezya (11)	Malay	96	5.21	81.25	13.54
	Çinli Malezyalı	171	7.02	83.33	9.65
	Malezyalı İndian	28	0	85.71	14.29
Kuveyt (5)	-	5.1	88.4	6.5	
İran (3)	129	2.7	91.2	6.1	
Yunanistan (8)	216	5.3	88.2	6.5	
Almanya (13)	2031	7.7	77.8	14.5	
Fransa (10)	1953	8.1	80.2	11.7	
İspanyol (10)	660	4.1	85.5	10.4	
İsviçre (14)	173	7.2	82.1	10.7	
Polonya (9)	137	5.5	83.9	10.6	
Portekiz (10)	637	6.34	83.95	9.71	
İtalya (13)	2000	6	84.9	9.1	
Finlandiya (10)	2087	6.17	75.98	17.84	
Kuzey İrlanda (10)	674	5.19	79.22	15.58	
Norveç (13)	395	8.7	78.1	13.2	
Venezuela (1)	1665	5	84	11	
Brezilya (2)	58	4	84	12	
Güney Amerika (Maya) (15)	135	0	91.1	8.9	
Güney Amerika (Yanomami) (14)	96	0	84.4	15.6	
Japon (14)	1097	4.8	85.1	10.1	
Kore (Seul) (6)	145	2	87	11	

## 2. AMAÇ

Kolon kanseri dünyada kadın ve erkeklerde gözlenen en yaygın kanser tiplerinden biridir. Kolon kanser riski 40'lı yaşlardan itibaren artmaya başlar ve 50–55 yaşları arasında ise risk oranı keskin şekilde artış gösterir, bunu takip eden her on yılda risk iki katına çıkar ve eksponansiyel olarak artmaya devam eder. Kolorektal kanserler Sağlık Bakanlığının 1999 verilerine göre ülkemizde her iki cinsten en sık rastlanan ikinci kanser tipidir. Kolon kanserinin oluşum mekanizmasında rol oynayan genlerin tamamı kesin olarak belirlenmemiş olup, bu hastalıkta etkin rolü olduğu bilinen genler; RAS ve SRC onkogenleri ile özellikle ailesel kolon kanserlerinde gözlenen APC, p53 ve DCC tümör supressör genleridir. HNPCC'ler de ise özellikle hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6 genlerinde mutasyona büyük oranda rastlanmaktadır. Bu birincil genlere ek olarak, pek çok başka genin de kolon karsinogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Fakat bunların bu mekanizma içerisindeki kesin rolleri belirlenmemiştir. Modifiye edici genler (Modifier genes) olarak bilinen bu genler içerisinde kanser gelişim mekanizmasında rolü olduğu düşünülen Apolipoprotein E (APO E) genide bulunmaktadır.

İnsan Apo E geni polimorfik bir gendir ve üç yaygın Apo E isoformunu kodlamaktadır (112. ve 158. aa.). Apo E geninin allelik ve genotipik dağılımı pek çok ülkede ayrıntılı olarak çalışılarak bilimsel literatüre kazandırılmıştır. Özellikle kalp damar ve nörodejeneratif (ailesel dysbetalipoproteinemia, aterosklerozis, kardiyovasküler hastalıklar ve Alzheimer gibi) ilişkisi ortaya konulan bu polimorfik genin, çeşitli kanser tipleri ile olan ilişkisi halen araştırılmaktadır. Apo E lipidlerin hücrel transport ve metabolizmasında önemli rol oynamasının yanında neoplastik gelişim için potansiyel önemi olan; hücre çoğalması, immüno-regülasyon ve anjiogenesis gibi mekanizmalarda farklı fonksiyonlara sahiptir. Apo E'nin antiproliferatif etkisinin mekanizması tam olarak ortaya konulmamasına rağmen; yüksek afinite ile preteoglikan ve heparine bağlanma özelliği vasıtasıyla lenfosit, düz kas, endoteliyal ve tümör hücrelerini içeren pek çok hücre tipinin proliferasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca yapılan son çalışmalarda apoptotik hücre ölümünü arttırdığı ileri sürülmektedir. Tüm bu çalışmalara rağmen

Apo E'nin kanserleşme mekanizmasındaki tam rolü veya hangi kanser tiplerinde etkin rol oynadığı bilinmemektedir.

Kolon kanseri gelişimi için düşünülen risk faktörlerine bakıldığında; aşırı yağlı besinlerin tüketiminin ve yağların kalın barsakta olan emilimlerinin hastalığın gelişiminde etkili bir mekanizma olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar APO E polimorfizminin tek başına plazma kolesterol seviyesinde %2-11'lik bir varyasyona yol açtığını göstermiştir. Ayrıca Batı tarzı diyetle birlikte artan yağ tüketimi bu ülkelerdeki kolon kanseri oranlarını diğer gelişmekte olan veya halen ilkel toplayıcı hayat tarzı süren toplumlara oranla daha da artırmış olduğu yapılan istatistiksel çalışmalar ile ortaya konmuştur. Tüm bu veriler ve APO E gen polimorfizminin lipid metabolizması üzerine olan etkisi göz önüne alındığında, bu polimorfizmin kolon kanseri gelişim mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca Ülkemizde ilgili gen polimorfizmi ve kolon kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak bir çalışmanın henüz yapılmamış olmasından dolayı bu konuyu aydınlatmaya yönelik bir çalışma planlanmıştır. Planladığımız bu çalışma ile kolon kanserli hastalarda, APO E gen polimorfizminin bu hastalığın gelişiminde genetik bir risk oluşturup oluşturmadığı sorusuna cevap verilmesi amaçlanmaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Enzimler

Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas)

Proteinaz K (Sigma)

*Hin6I* restriksiyon enzimi (MBI Fermtas) (Enzim tanıma bölgesi: G<sup>^</sup>CGC)

##### 3.1.2. Primerler

Apo E primer dizileri

Exon	Primer ismi	Primer dizisi	Baz uzunluğu (bp)
4	Apo E (F)	atg gac gag acc atg aag gag ttg aag	27
4	Apo E (R)	tgt acc agg ccg ggg ccc gcg a	22

##### 3.1.3. Kimyasallar

Kimyasalın adı	Markası	Katolog Numarası
Agaroz	Sigma	
Akrilamid	Sigma	A 9099
Amonyum asetat	Merck	A174189
Amonyum persülfat	Sigma	A 9164
Asetik asit	Sigma	A6283
Bisakrilamid	Sigma	M 7279
Borik asit	Sigma	B 6768
Brom fenol mavisi	Sigma	B5525
Etanol	Sigma	E7023
Etidium bromid	Sigma	E8751
EDTA	Sigma	E 5134
Formaldehit	Sigma	F 8775

Formamid	Sigma	F 9037
Gümüş nitrat	Sigma	S8157
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Merck	B1900662
Sodyum klorid	Merck	K26744400
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
TEMED	Sigma	T 7024
Tris baz	Sigma	T 8524

### **3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler**

#### **3.1.4.1. DNA İzolasyon Çözeltileri**

##### **RBCL ( Red blood cell lysis, eritrosit parçalama solüsyonu) pH 7.4**

0.15 M NH<sub>4</sub>Cl

0.01 M KHCO<sub>3</sub>

0.01 M EDTA (pH 8.0)

##### **WBL ( White blood lysis, beyaz hücre parçalama solüsyonu)**

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA (pH 8.0)

##### **Amonyum Asetat Solüsyonu**

9.5 M NH<sub>4</sub>Ac ( sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir)

##### **TE Tamponu (pH 8.0)**

10mM Tris HCl

1mM EDTA pH 8.0 (+20oC)

##### **SDS Stok Solüsyonu**

10% (w/v)

0.2–0.45 µm membran ile filtre edilmiş

### 3.1.4.2. Elektroforez Solüsyonları

#### Yükleme tamponu

6 X agaroz jel yükleme tamponu: %0.25 bromfenol mavisi, %30 gliserol

#### Etidyum bromid stok solüsyonu

10 mg/ml

#### 50X TAE

2 M Tris-asetat

0.05 M EDTA (pH 8.0)

#### 5X TBE

0.45 M Tris borat

0.01 M EDTA (pH 8.0)

#### % 10'lik non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)

% 10 Akrilamid-Bisakrilamid

1X TBE

Polimerizasyon için 0.001 M amonyumpersülfat ve %0.1 TEMED ilave edilir.

### 3.1.4.3. Gümüş Boyama Solüsyonları

**10 X A solüsyonu:** %5 asetik asit % 95 absolüt etil alkol

**10 X B solüsyonu:** %1 gümüş nitrat

**C solüsyonu** : 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0.2 formaldehit

**10 X D solüsyonu** : 22.5 g Sodyum bikarbonat

### 3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)

Dikey elektroforez

Yatay elektroforez

Güç kaynağı (Biorad power pac 3000)

UV transmilatör (Biorad)  
Spektrofotometre (Shimadzu)  
CanoScan N67U (Canon)  
Bilgisayar

### **3.1.6. Hasta Grubu**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Gastroentoloji Anabilim Dallarına başvuran kolorektal kanserli hastalardan çalışmamıza katılmaya gönüllü olarak karar verenlere yapılacak çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgi verilip aydınlatılmış onam formu imzalatıldı ve uygulanacak testler için EDTA'lı tüplere 10 ml kanları alındı. Hasta grubunu oluşturacak gönüllülerde daha önce kemoterapi ve/veya radyoterapi görmemeleri koşulu arandı.

### **3.1.7. Kontrol Grubu**

Kontrol grubunu oluşturacak gönüllü kişilerde, öncelikle herhangi bir kanser olgusunun, metabolik ve nörodejeneratif bir hastalığın olmaması şartı arandı. Gönüllülere çalışma hakkında bilgi verildikten sonra çalışmaya katılmak isteyenlere aydınlatılmış onam formu imzalatılarak testler için EDTA'lı tüplere 10 ml kanları alındı.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu**

İnsan haploid genomik DNA'sı  $3.2 \times 10^9$  nukleotid uzunluğundadır. Genomik DNA bütün nükleusu bulunan hücrelerde bulunur ve bu hücreler genomik DNA analizleri için kullanılabilir. Örneğin; prenatal tanı için amniyotik sıvıdaki fetal hücrelerden veya koryonik hücrelerden genomik DNA elde edilebilir. Erişkinlerde periferik kandaki lökositler en kolay ulaşılabilen DNA kaynağıdır. EDTA'lı tüplere alınan 10 ml kan yaklaşık olarak  $10^8$  beyaz kan hücresi içerir ve bu miktar hücreden elde edilecek genomik DNA pek çok genetik test için yeterlidir. DNA izolasyonu



için pek çok farklı metod vardır. Geleneksel izolasyon yöntemlerinin yanında pek çok firma tarafından üretilen DNA izolasyon kitleri DNA izolasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca mRNA kullanarak sentezlenen cDNA'da bir diğer DNA kaynağıdır. DNA degradasyona karşı dayanıklı bir polimerdir ve uygun saklama şartlarında uzun yıllar korunup tekrar tekrar analizlerde kullanılabilir. Tezde kullanılan genomik DNA izolasyon yöntemi aşağıda açıklanmıştır.

1. EDTA'lı tüpte bulunan 10 ml periferik kan özenle 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspanse edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pelet tamamen süspanse edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de su banyosunda gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 3.7ml Amonyum asetat (9.5 M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika +4 °C ve 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üst kısımda kalan pellet olmayan temiz sıvı kısım aktarılarak yeni bir falkon tüpe alındı, altta kalan pellet kısmı atıldı. Aynı tüpe aktarılan supernatanın üzerine -20 °C'de beklemekte olan %99'luk etanol'den 20 ml eklendi ve DNA'nın yüzeyde toplanması beklendi.
6. Toplanan DNA pipet yardımıyla alınarak içersine 400µl %70 etanol olan bir eppendorf tüpe aktarıldı.
7. Maksimum hızda (13.000 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı.
8. Isıtıcı blokta kurutularak DNA üzerinde kalan alkol uzaklaştırıldı.
9. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA) tamponu eklendi.
10. 56°C'de 1 saat bekletilerek DNA'nın TE tampon içersinde iyice çözülmesi sağlandı.

11. Ağızları iyice kapatılmış olan eppendorf tüpteki stok DNA'lar +4°C'de deneylerde kullanılmak üzere isimlendirilerek muhafaza edildi.

### 3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

- Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Üzerine 99µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
- Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu.
- DNA miktarı formüle göre hesaplandı:
- Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
- OD 260/280 > 1.8 RNA, < 1.8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

### 3.2.3. PCR Protokolü

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bir in vitro DNA çoğaltma metodudur, reaksiyonlar farklı sıcaklıklardaki üç olayın döngüler halinde tekrarına dayanmaktadır. PCR ile DNA parçaları çoğaltılabilir ve çok küçük örneklerden analizler için yeterli miktarlar elde edilebilir. Gerekli olan reaktifler 1) sentezde kalıp olarak kullanılacak DNA (örn; genomik DNA); 2) iki tane tek iplikli sentetik DNA oligonükleotidi (forward ve reverse primer), çoğaltılmak istenen diziyi belirler; 3) dört tip deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPs); 4) yüksek ısıda sentez yapabilecek bir DNA polimeraz. PCR üç ana döngünün tekrarlarından meydana gelir: 1) **denatürasyon** 94°C'de çift iplikçikli DNA'nın iki tek iplikçiğe ayrılması; 2) **annealing** 60°C'de primerlerin tek iplikçik halindeki kalıp DNA'ya spesifik olarak bağlanmaları; 3) **extension** 72°C'de primerlerden başlayarak kalıp DNA üzerinden sentez yapılarak primerlerle sınırlandırılmış olan bölgenin çoğaltılması. Sikluslar yaklaşık 30 defa tekrar edilir. Yeni sentezlenen diziler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler böylelikle her döngüde çoğaltılmak istenen dizinin logaritmik olarak artışı söz konusudur.

primerler	1mM
dNTP's	2mM

10 X Buffer (MBI)	1x
MgCl	1.25mM
<i>Taq</i> (MBI)	1U
DNA	100ng

### 3.2.3.1. PCR Koşulları

İlk tam denatürasyon	96 °C	2'
PCR Döngüsü		
Denaturasyon	96°C	1'
Annealing ısısı	67 °C	2'
Sentez ısısı	72°C	2'
Son uzatma sentez ısısı	72°C	4'
Döngü sayısı (cycle)	35	

### 3.2.3.2. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP analizi restriksiyon endonükleazların çift iplikli DNA'yı spesifik tanıma bölgelerinden kesmesi temeline dayanmaktadır. Bakteriler için bir savunma mekanizması olan endonükleazlar bakteriler tarafından bakteriyofaj infeksiyonuna karşı direnç amacıyla üretilirler. Bu enzimler bakteriyofaj DNA'sını parçalarken bakteri DNA'sına zarar vermezler. Moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılan Tip II restriksiyon endonükleazlar spesifik palondromik kısa DNA dizilerini tanır ve tanıma bölgelerinden keserler. RFLP'de PCR ile çoğaltılan DNA bölgesi restriksiyon enziminin kesimine tabi tutulur. Oluşan DNA fragmentleri jel elektroforezi ile fragment büyüklüklerine göre ayrılırlar. DNA mutasyonları enzimin kesme noktasını ortadan kaldırır veya yeni bir enzim kesme noktası oluşturabilir, böylelikle kesim sonucu oluşan fragment sayısını değiştirirler. Restriksiyon bölgeleri arasındaki insersiyon veya delesyon mutasyonları fragment büyüklüklerini değiştirirler. Genomda kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde restriksiyon enzim tanıma bölgelerinin dağılımı insanlar arasında çok çeşitli ve fazladır. Bu farklılıklar doğal genomik çeşitliliği yansıtır ve genellikle fenotipik bir sonucu olmayan RFLP'leri oluşturur. Bunun yanında RFLP analizleri genetik hastalıkların ilişki ve bağlantı çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Hastalıkla ilişkilendirilen aday gendeki

RFLP'ler, etkilenmiş bireyler ve kontroller arasındaki allel frekansları dikkate alınarak ilgili mutasyon ve genin hastalıkla ilişkisini ortaya koymada oldukça kullanışlı bilgi vermektedir.

### 3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Boyutları 30,5 cm x 8,5 cm şeklinde hazırlanan poliakrilamid jelin elektroforezi için dikey elektroferez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0.5 mm olarak ayarlandı. Yüzde sekizlik doğal PAGE stok solüsyonuna sırası ile % 10'luk APS stoğundan %1 hacim ve TEMED'den %0.1 hacim ilave edilip 0.5 mm'lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektroferez cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyaalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım aşağıdaki çizelgelerde verildiği gibi ayarlandı. Çizelgelerde verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Apo E polimorfizmi için poliakrilamid jel elektroforezi koşulları

Akım		W	PAGE (%)	Yürüme zamanı (dakika)
mA	V			
~115	~175	20	10	30

### 3.2.3.2.2. Gümüş Boyama

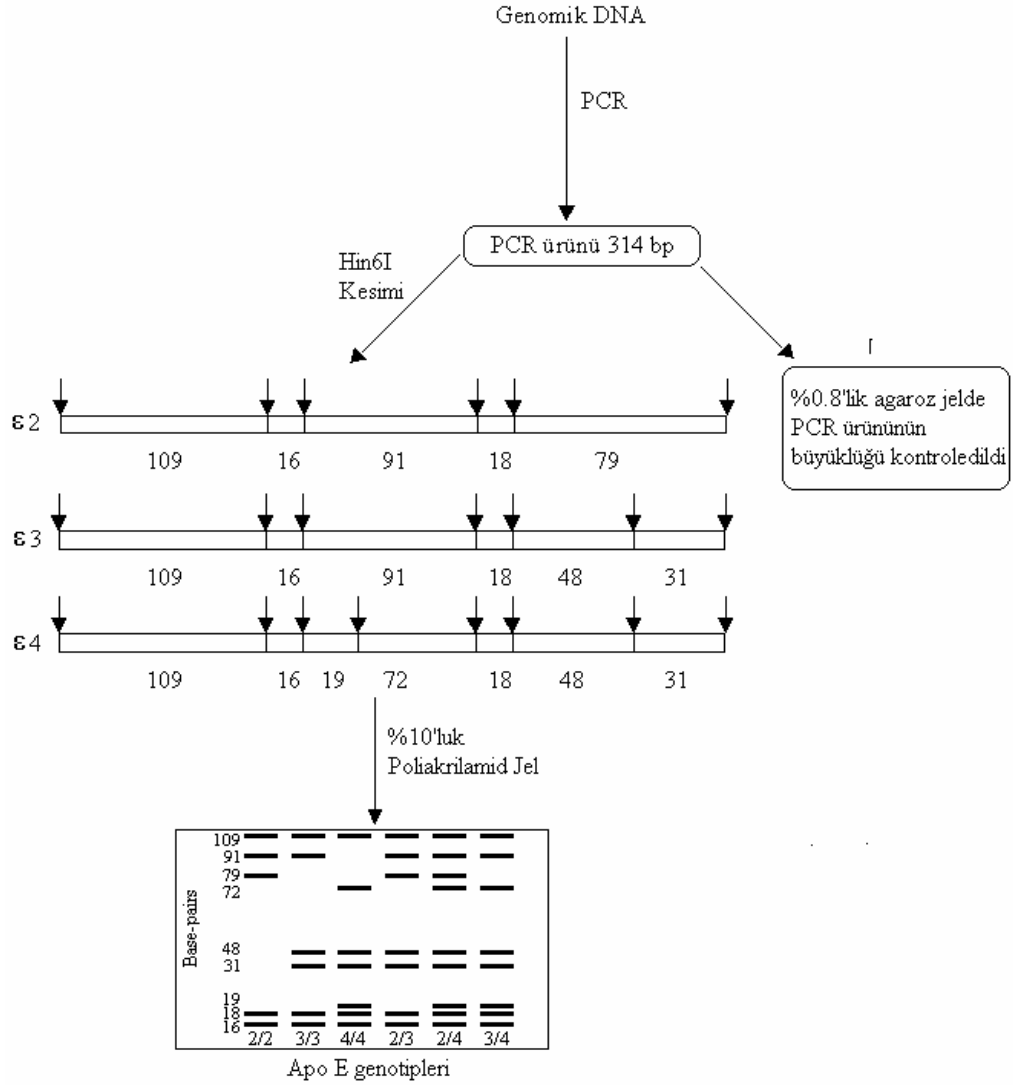
Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile verilen sürelerde bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Solüsyonlar arası geçişlerde jel distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

A solüsyonunda (Asetik asit-etanol)	5 dakika
B solüsyonunda (Gümüş nitrat)	10 dakika
C solüsyonunda ( NaOH-Boraks-Formaldehit)	10–15 dakika
D solüsyonunda (NaHCO <sub>3</sub> )	5 dakika

Son olarak distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı. Tarayıcı vasıtası ile görüntüsü bilgisayara aktarılan jel görüntüsü istenilen zamanda tekrar kullanılmak üzere bilgisayar elektronik ortamında depolandı.

#### **3.2.4. İstatistiksel Analiz**

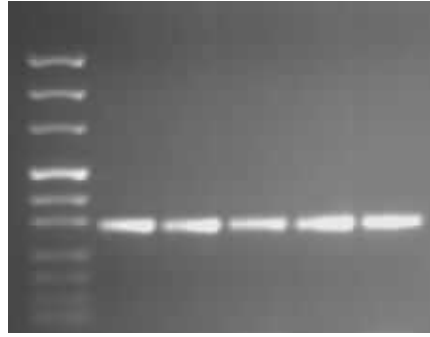
SPSS bilgisayar istatistik programına aktarılan sonuçlar, odds ratio, %95 güven aralığı ve  $\chi^2$  analizi, conditional logistic regression analizi kullanılarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler PC için SPSS 12,0 versiyonu kullanılarak yapıldı.



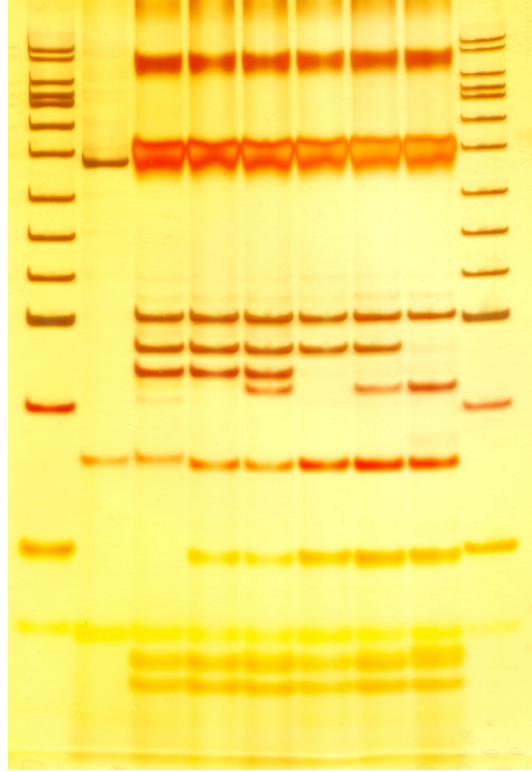
Şekil 3.1: Apo E allellerinin Hin6I restriksiyon kesimi sonucu oluşan fragmentler.

#### 4. BULGULAR

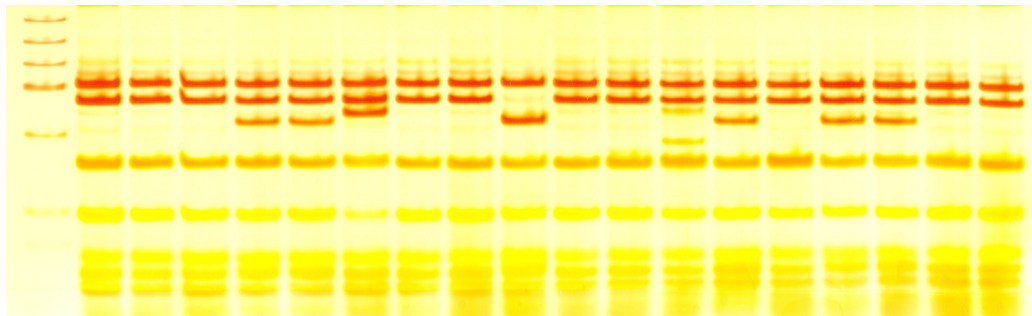
Kolon kanserli hastalarda APO E gen polimorfizminin araştırıldığı çalışmamızda PCR-RFLP yöntemi ile Anabilim Dalımız laboratuvarında hasta ve kontrol DNA'ları analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada 222 hasta ve 300 kontrol karşılaştırılmış, kolorektal kanserli hastalarla genotipler arasında herhangi bir bağlantı gözlenmemiştir (OR=1.011; %95CI=0.713–1.434; P=0.94). APO E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 ve E4/4 genotiplerinin gruplara göre dağılımları sırasıyla şöyledir kontrol grubunda % 0.3, % 12, %5.3, %65, %16.7 ve % 0.7 iken hasta grubunda %0.0, %13.5, %1.8, %68.5, %15.3 ve %0.9 olarak bulunmuştur.  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4'ün allelik frekanslara bakıldığında ise kontrol grubunda sırasıyla %9, %79.33 ve %11.67 iken hasta grubunda %7.65, %82.88 ve %9.45 olarak allelik frekanslar gözlenmiştir. Beklenen ve gözlenen dağılımların Hardy Weinberg dengesinden sapma göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre APOE gen polimorfizmi tek başına bağımsız bir faktör olarak kolon kanserleri için bir risk oluşturmamaktadır.



**Şekil 4.1:** PCR ürünlerinin %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüleri.



**Şekil 4.2:** Apo E'nin PCR ürünü ve HindIII enzimi kesimi sonucu oluşan tüm genotipleri.



**Şekil 4.3:** Analizde kullanılan HindIII enzimi ile kesilmiş bir Apo E jel görüntüsü.



**Çizelge 4.1:** PCR ile çoğaltılan Apo E 112. ve 158. pozisyonlardaki SNP'leri içeren gen dizisi.

Uzunluk (bç)	Dizi
314	5' ATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCG GAACTGGAGGAACAACACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGG GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTG GGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACC GCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCCGAGGAGC TGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCG GCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTG TACCAGGCCGGGG CCCGCGA 3'

**Çizelge 4.2:** Apo E3/3 (112. tgc [cys] – 158. cgc [arg]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.

Uzunluk (bç)	5' Baz	3'Baz	Dizi
109	1	109	ATGGACGAGA CCATGAAGGA GTTGAAGGCC TACAAATCGG AACTGGAGGA ACAACTGACC CCGGTGGCGG AGGAGACGCG GGCACGGCTG TCCAAGGAGC TGCAGGCGG
91	126	216	CGCGGACATG GAGGACGTGT GCGGCCGCCT GGTGCAGTAC CGCGGCGAGGTGCAGGCCAT GCTCGGCCAG AGCACCGAGG AGCTGCGGGT G
48	235	282	CGCAAGCTGC GTAAGCGGCT CCTCCGCGAT GCCGATGACC TGCAGAAG
31	283	314	CGCCTGGCAG TGTACCAGGC CGGGGCCCGC GA
18	217	234	CGCCTCGCCT CCCACCTG
16	110	125	CGCAGGCCCG GCTGGG

**Çizelge 4.3:** Apo E2/2 (112. tgc [cys] – 158. tgc [cys]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Baz	3'Baz	Dizi
109	1	109	ATGGACGAGA CCATGAAGGA GTTGAAGGCC TACAAATCGG AACTGGAGGA ACAACTGACC CCGGTGGCGG AGGAGACGCG GGCACGGCTG TCCAAGGAGC TGCAGGCGG
91	126	216	CGCGGACATG GAGGACGTGT GCGGCCGCT GGTGCAGTAC CGCGGCGAGGTGCAGGCCAT GCTCGGCCAG AGCACCGAGG AGCTGCGGGT G
79	235	314	CGCAAGCTGC GTAAGCGGCT CCTCCGCGAT GCCGATGACC TGCAGAAGTG CCTGGCAGTG TACCAGGCCG GGGCCCCGCA
18	217	234	CGCCTCGCCT CCCACCTG
16	110	125	CGCAGGCCCG GCTGGG

**Çizelge 4.4:** Apo E4/4 ( 112. cgc [arg] – 158. cgc [arg]) formunun Hin6I enzimi kesimi sonucu oluşan fragmentler ve baz uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Baz	3'Baz	Dizi
109	1	109	ATGGACGAGA CCATGAAGGA GTTGAAGGCC TACAAATCGG AACTGGAGGA ACAACTGACC CCGGTGGCGG AGGAGACGCG GGCACGGCTG TCCAAGGAGC TGCAGGCGG
72	145	216	CGCGGCCGCC TGGTGCAGTA CCGCGGCGAG GTGCAGGCCA TGCTCGGCCA GAGCACCGAG GAGCTGCGGG TG
48	235	282	CGCAAGCTGC GTAAGCGGCT CCTCCGCGAT GCCGATGACC TGCAGAAG
31	283	314	CGCCTGGCAG TGTACCAGGC CGGGGCCCGC GA
19	126	144	CGCGGACATG GAGGACGTG
18	217	234	CGCCTCGCCT CCCACCTG
16	110	125	CGCAGGCCCG GCTGGG

**Çizelge 4.5:** Apo E genotiplerinin gruplara göre dağılımı.

APOE GENOTİPLERİ									
Gruplar	Kontrol	Genotipler	E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	Toplam
		Gözlenen	1	36	16	195	50	2	300
		Beklenen	0,6	37,9	11,5	199,4	48,3	2,3	300
		%	0,3	12,0	5,3	65,0	16,7	0,7	100
	Hasta	Gözlenen	0	30	4	152	34	2	222
		Beklenen	0,4	28,1	8,5	147,6	37,7	1,7	222
		%	0,0	13,5	1,8	68,5	15,3	0,9	100

**Çizelge 4.6:** Gruplara göre allelik frekanslar.

APOE ALLELİK FREKANSLARI					
Gruplar	Kontrol	Allel	ε2	ε3	ε4
		Gözlenen	9	79,33	11,67
		Beklenen	8,43	80,83	10,74
	Hasta	Gözlenen	7,65	82,8	9,45
		Beklenen	8,42	81,3	11,17

**Çizelge 4.7:** Gruplara göre cinsiyet dağılımları.

CİNSİYET					
			Erkek	Kadın	Toplam
Gruplar	Kontrol	n	169	131	300
		%	56,3	43,7	100
	Hasta	n	133	89	222
		%	59,9	40,1	100
Toplam		n	302	220	522
		%	57,9	42,1	100

**Çizelge 4.8:** Hasta grubunun lipid profilleri (TC: Total Kolesterol, HDL-c: High density lipoprotein kolesterol, LDL-c: Low density lipoprotein kolesterol, VLDL-c: Very low density lipoprotein, TG: Trigliserid. \*Bilgisine ulaşılan hasta sayısı).

<b>PLAZMA LİPİD PROFİLLERİ</b>					
	<b>N</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Std. Deviation</b>
<b>HDL-c (mg/dL)</b>	155*	14	94	36,28	11,266
<b>IDL-c (mg/dL)</b>	156*	25	253	112,57	37,460
<b>VLDL-c (mg/dL)</b>	136*	7	76	25,86	11,627
<b>TC (mg/dL)</b>	161*	52	326	173,80	46,088
<b>TG (mg/dL)</b>	161*	20	330	114,11	51,145
<b>BMI ve YAŞLARI</b>					
<b>Yaş (Yıl)</b>	177*	19	86	59,67	13,341
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	194*	16	36	24,53	3,285

**Çizelge 4.9:** Hastalara ait sigara ve alkol kullanımı. (\* Toplam hasta sayısı)

<b>ALKOL KULLANIMI</b>				
<b>Hasta</b>		<b>Kullanıyor</b>	<b>Kullanmıyor</b>	<b>Toplam</b>
	<b>n</b>	18	128	146 (222*)
	<b>%</b>	12,3	87,7	100,0
<b>SİGARA KULLANIMI</b>				
<b>Hasta</b>		<b>Kullanıyor</b>	<b>Kullanmıyor</b>	<b>Toplam</b>
	<b>n</b>	61	101	162 (222*)
	<b>%</b>	37,7	62,3	100,0

**Çizelge 4.10:** Hasta grubunda gözlenen genotiplerin tümör lokalizasyonlarına göre dağılımları (\*222 (%100) vakanın 181 (%85,5) tanesinin tümör lokalizasyonu ile ilgili bilgisine ulaşılmış, 41 (%18,5) tanesinin bilgisine ulaşılamamıştır).

TÜMÖR LOKALİZASYONU								
		Çekum	Çıkan Kolon	Transvers Kolon	İnen Kolon	Sigmoid Kolon	Rektum	Toplam*
E2/3	n	1	5	0	0	6	11	23
	%	4,3	21,7	0,0	0,0	26,1	47,8	100
E2/4	n	0	1	0	1	1	1	4
	%	0,0	25,0	0,0	25,0	25,0	25,0	100
E3/3	n	8	14	5	13	35	50	125
	%	6,4	11,2	4,0	10,4	28,0	40,0	100
E3/4	n	2	2	3	2	6	12	27
	%	7,4	7,4	11,1	7,4	22,2	44,4	100
E4/4	n	0	0	0	2	0	0	2
	%	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100
Top.*	n	11	22	8	18	48	74	181
	%	6,1	12,2	4,4	9,9	26,5	40,9	100

**Çizelge 4.11:** Hasta grubundaki tümörlerin lokalizasyonu (\*Toplam hasta sayısı).

TÜMÖR LOKALİZASYONU								
Hasta		Çekum	Çıkan Kolon	Transvers Kolon	İnen Kolon	Sigmoid Kolon	Rektum	Toplam
	n	11	22	8	18	48	74	181 (222*)
	%	5	9,9	3,6	8,1	21,6	33,3	81,5 (100*)

**Çizelge 4.12:** Deney gruplarının klinik özellikleri.

<b>Parametreler</b>	<b>Toplam</b>	<b>Erkek</b>	<b>Kadın</b>
<b>Kontrol</b>			
<b>N</b>	300	169 (%56,3)	131 (%43,7)
<b>Yaş (yıl)</b>	53,98 ± 8,8	53,18 ± 9,8	55,02 ± 7,3
<b>Kolon Kanseri</b>			
<b>N</b>	160	100 (%62,5)	60 (%37,5)
<b>Yaş (yıl)</b>	58,99 ± 13,4	59,20 ± 14,6	58,63 ± 11,3
<b>BMI</b>	24,58 ± 3,3	24,52 ± 3,2	24,69 ± 3,6
<b>Sigara içiyor</b>	58 <sup>1</sup> (%36,3)	55 <sup>2</sup> (%55,0)	3 <sup>3</sup> (%5,0)
<b>Sigara içmiyor</b>	88 <sup>1</sup> (%55,0)	37 <sup>2</sup> (%37,0)	51 <sup>3</sup> (%85,0)
<b>Çekum</b>	8 (%5,0)	5 (%5,0)	3 (%5,0)
<b>Ascending Kolon</b>	20 (%12,5)	13 (%13,0)	7 (%11,7)
<b>Transvers colon</b>	7 (%4,4)	5 (%5,0)	2 (%3,3)
<b>Proximal Toplam</b>	35 (%21,9)	23 (%23,0)	12 (%20,0)
<b>Descending Kolon</b>	15 (%9,4)	11 (%11,0)	4 (%6,7)
<b>Sigmoid Kolon</b>	44 (%27,5)	25 (%25,0)	19 (%31,7)
<b>Rektum</b>	66 (%41,3)	41 (%41,0)	25 (%41,7)
<b>Distal Toplam</b>	125 (%78,1)	77 (%77,0)	48 (%80,0)

**Çizelge 4.13: Proksimal, distal kolon kanseri ve kontrollerdeki Apo E genotip dağılımları.**

		APOE						Toplam
		E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	
<b>Kontrol</b>	<b>Gözlenen</b>	1	36	16	195	50	2	300
	<b>Beklenen</b>	1,0	36,0	16,0	195,0	50,0	2,0	300,0
	<b>%</b>	%0,3	%12	%5,3	%65	%16,7	%0,7	%100
<b>Proximal kolon kanser</b>	<b>Gözlenen</b>	0	5	1	24	5	0	35
	<b>Beklenen</b>	0	4,6	0,9	23,8	5,5	0,2	35,0
	<b>%</b>	%0	%14,3	%2,9	%68,6	%14,3	%0	%100
<b>Distal kolon kanser</b>	<b>Gözlenen</b>	0	16	3	85	20	1	125
	<b>Beklenen</b>	0	16,4	3,1	85,2	19,5	0,8	125,0
	<b>%</b>	%0	%12,8	%2,4	%68	%16	%0,8	%100
<b>Toplam Kanser</b>	<b>Gözlenen</b>	0	21	4	109	25	1	160
	<b>Beklenen</b>	0	21,0	4,0	109,0	25,0	1,0	160,0
	<b>%</b>	%0	%13,1	%2,5	%68,1	%15,6	%0,6	%100

**Çizelge 4.14: Apo E genotiplerinin 65 yaş altı ve üstü dağılımları (Hasta n=160)**

		APO E							Toplam
		Genotipler	E2/2	E2/3	E2/4	E3/3	E3/4	E4/4	
<b>Kontrol</b>	<b>65&lt;</b>	Gozlenen (%)	1 (0,4)	35 (12,4)	16 (5,7)	184 (65,2)	44 (15,6)	2 (0,7)	282 (100)
		Beklenen	0,9	33,8	15,0	183,3	47,0	1,9	282,0
	<b>65&gt;</b>	Gozlenen (%)	0 (5,6)	1 (5,6)	0	11 (61,1)	6 (33,3)	0	18 (100)
		Beklenen	0,1	2,2	1,0	11,7	3,0	0,1	18,0
<b>Toplam</b>		Gozlenen (%)	1 (0,3)	36 (12,0)	16 (5,3)	195 (65,0)	50 (16,7)	2 (0,7)	300 (100)
<b>Hasta</b>	<b>65&lt;</b>	Gozlenen (%)	0	11 (10,7)	2 (1,9)	72 (69,9)	17 (16,5)	1 (1,0)	103 (100)
		Beklenen	0	13,5	2,6	70,2	16,1	0,6	103,0
	<b>65&gt;</b>	Gozlenen (%)	0	10 (17,5)	2 (3,5)	37 (64,9)	8 (14,0)	0	57 (100)
		Beklenen	0	7,5	1,4	38,8	8,9	0,4	57,0
<b>Toplam</b>		Gozlenen (%)	0	21 (13,1)	4 (2,5)	109 (68,1)	25 (15,6)	1 (0,6)	160 (100)

**Çizelge 4.15: Gruplara ve cinsiyetlere göre E3 allelinin dağılımları (Hasta N=160).**

			E3 Alleli			Toplam
			E3 +/+	E3 +/-	E3 -/-	
Toplam Gruplar	Kontrol	Gözlenen	195	86	19	300
		Beklenen	198,3	86,1	15,7	300,0
		%	%65,0	%28,7	%6,3	%100,0
	Hasta	Gözlenen	109	46	5	160
		Beklenen	105,7	45,9	8,3	160,0
		%	%68,1	%28,8	%3,1	%100,0
Erkekler Göre E3 Alleli Dağılımları	Kontrol	Gözlenen	115	45	9	169
		Beklenen	114,3	46,5	8,2	169,0
		%	%68,0	%26,6	%5,3	%100,0
	Hasta	Gözlenen	67	29	4	100
		Beklenen	67,7	27,5	4,8	100,0
		%	%67,0	%29,0	%4,0	%100,0
Kadınlara Göre E3 Alleli Dağılımları	Kontrol	Gözlenen	80	41	10	131
		Beklenen	83,7	39,8	7,5	131,0
		%	%61,1	%31,3	%7,6	%100,0
	Hasta	Gözlenen	42	17	1	60
		Beklenen	38,3	18,2	3,5	60,0
		%	%70,0	%28,3	%1,7	%100,0



## 5. TARTIŞMA

Kolon kanseri; erkek ve kadında gastrointestinal sistemde yaygın olarak görülen bir hastalıktır ve Sağlık Bakanlığı 1999 verilerine göre ülkemizde her iki cinsten en sık rastlanan kanser tipleri arasında ikinci sırayı almaktadır. Kolon kanseri gelişiminde kesin rol oynadığı düşünülen genlerin yanında hastalığın gelişimini arttırıcı veya azaltıcı şekilde değiştiren ikincil gen ve gen gruplarının (modifier genes) hastalıkla olan ilişkisinin araştırılması son yıllarda oldukça fazla çalışma ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu ikincil genlere ait özellikle polimorfik yapıların hastalık gelişimlerine olan katkıları araştırılmakta, hastalıkla ilişki gösteren fenotip-genotip ilişkileri kurulmaya çalışılmaktadır. Kanserle ilişkili olduğu düşünülen polimorfik çalışmalar çoğunlukla, kanserin başlangıç safhasında rolü olduğu düşünülen kimyasal karsinogenlerin detoksifikasyonun da rolü olan metabolik yolları kontrol eden enzimler üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte son yıllarda neoplastik gelişimin farklı aşamalarını etkileyen özellikle düzenleyici ve taşıma sistemini içeren biyolojik sistemlerin düzenleyicisi olan genlerin polimorfizmleri de dikkati üzerinde toplamaya başlamıştır (Watson et al, 2003).

Genel kabul edilen görüş kolon kanseri gelişimi riskinin bireysel gen varyantlarının çevresel faktörlerle özellikle diyetle ile etkileşimin önemli olduğu yönündedir. Diyetteki hayvansal yağlar kolorektal kanserler için bir risk faktörüdür ve özellikle karsinogenzisin başlangıç safhası sonrasında etkileri fazla miktarda görülmektedir (Woutersen et al,1999; Sugimura et al, 2000). Lipid iletimi ve metabolizmasını düzenleyen moleküler mekanizmalar özellikle bu tip neoplazmaların oluşumu için potansiyel risk olarak görülmektedirler. Pek çok genetik polimorfizmin bulunduğu çok sayıdaki gen lipid metabolizmasının düzenlenmesine katılmaktadır bunun yanında bunlardan pek azının kolorektal kanserlerdeki muhtemel rolleri bilinmektedir (Dammerman et al, 1995).

Apolipoprotein E (Apo E), trigliserid metabolizmasında önemli yere sahiptir. Burada ki görevi şilomikronların ve VLDL'nin plazmadan temizlenmesinde ligand rolü oynaması ile olur. Apo E kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıkların risk faktörü olarak bu bahsedilen rolü dolayısıyla oldukça fazla araştırılmıştır. Apo E ayrıca platelet agregasyonu, antioksidant, immün aktivite ve hücre çoğalmasına etkileri gibi lipid metabolizması haricinde pek çok hücre

mekanizmaya katıldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ( Vogel et al, 1994; Sacre et al, 2003; Stannard et al, 2001; Mahley R.W., 1988). Apo E'nin kolesterol metabolizması haricindeki diğer rollerinin kanserleşme mekanizmasında; tümör gelişimi, anjiyogenezis ve metastazis gibi olayları etkileyebileceği yaygın bir görüştür (Stannard et al, 2001).

Apo E gen polimorfizminin genel olarak kanser patojenezisindeki rolü hakkındaki bilgilerimiz halen tam olarak ortaya konulmuş değildir. Yapılan pek çok çalışma farklı tip neoplazmalar ve Apo E polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalışmaktadır, buna rağmen bu çalışmalara ait bulgular halen kesin etki mekanizmasını göstermemişlerdir. Yapılan çalışmalarda Apo E genotipleri ve prostat kanseri arasında bir ilişki ortaya konulmamıştır (Haapala et al, 2000; Wessel et al, 2001). Apo E ε4 alleli kanser geliştiren AİDS hastaları arasında fazla miktarda olduğu yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada kanser vakalarında kanser görülmeyen vakalara göre Apo E ε4 alleli anlamlı derecede yüksek bulunurken ( sırasıyla %24.6 ve %13.5) , Apo E ε2 allelinin frekansının ise kanser vakalarında düştüğü (sırasıyla %3.5 ve %8.7) gözlenmiştir (Liestol et al, 2000). Meme kanseri ile ilgili yapılan iki çalışma ise ε4 alleli ile ilgili olarak meme kanseri gelişiminde yatkınlık yapabileceği yönünde sonuçlar önerselerde; Apo E polimorfizmi ile ilgili sağlam sonuçlar ortaya koyamamışlardır (Moysich et al, 2000; Zunarelli et al, 2000). Apo E ε4 alleli ile artmış yüksek triaçilgliserol seviyesinin meme kanseri için risk faktörü olabileceği düşünülmüştür (Moysich et al, 2000).

Apo E, kolon kanseri gelişimini üç yol ile etki edebilir: kolesterol ve safra metabolizması, trigliserid ve insülin regülasyonu ve inflamasyon. Apo E lipid metabolizmasına katılır ve ayrıca safra asidi metabolizması ile kolesterolün luminal emilimini etkileyebilir. Farklı Apo E varyantları kolesterol ve safra asitlerinin enterohepatik metabolizmasını etkilerler. Ayrıca Apo E insan fecesinde bulunan ikincil safra asitlerinin sekresyonu ve oluşumu ile sıkı ilişkili bulunmuştur. Bu ikincil safra asitlerinin kolorektal kanserin başlamasında önemli rolü olduğuna inanılmaktadır (Katan,1986; Juvonen et al, 1993; Van Erpecum et al, 1998). Apo E alleleri; lipid, trigiserid seviyeleri ve insülin duyarlılığı ile ilişkili bulunmuştur. Trigliseridler ve insülin kolon kanser etiyolojisi için önemli bir yere sahip olduğu öne sürülmüştür (Orchard et al, 1994; Giovannucci, 1995). Üçüncü olarak Apo E kolorektal kanser

riskini inflamasyon ile etkileyebilir bunun da peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptörü  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) ve düşük C-reaktif protein seviyesinde Apo E  $\epsilon$ 4 alleli ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Peng et al, 2003; Erlinger et al, 2004).

Apo E gen polimorfizmi ve kolon kanseri arasındaki ilişkiyi açıklamak için yapılan ilk çalışma Finlandiya’da gerçekleştirildi. Kervinen ve ark, 1996 yılında 122 kolon karsinoma, 135 kolon adenoma hastası ile 199 kontrolün değerlendirildiği bu çalışmada; genin  $\epsilon$ 4 allelinin proksimal kolonda adenoma ve/veya karsinoma (allel frekansları 0.075 ve 0.073, kontrollerde 0.181;  $p<0.05$ ) gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Kolorektal tümörler ile Apo E arasındaki bu anlamlı ilişkiyi, özellikle proksimal kolon tümörlerinde fekal safra asitlerin kolonik mukoza ile olan sıkı ilişkisiyle açıklamaya çalışmışlardır. Fazla miktardaki litokolik ve deoksikolik asit salgılanması kolonun karsinomalarında ve adenomatöz poliplerde gözlenmiştir. Kolorektal adenomalı hastalarda yüksek seviyede serum deoksikolik asit seviyesi tespit edilmiştir. Apo E  $\epsilon$ 4 allelli hastalarda ise safra deoksikolik asit seviyesi düşüktür, belki bu düşüş bu alleli taşıyan hastalardaki kolon adenoma ve karsinomalarının yaygınlığının az olmasını açıklayabilir (Kervinen et al, 1996). Bu çalışma gruplardaki toplam kişi sayısının az olması ayrıca Finliler arasında  $\epsilon$ 2 allelinin genel olarak popülasyondaki azlığı sonuçlar değerlendirilirken dikkate alınması gereken konulardır. Bunun yanında Apo E allellerinin belirlenmesinde genotipleme yerine isoelektrik focusing yöntemiyle fenotiplerin belirlenmiş olması ve bu yöntemin translasyon sonrası Apo E’nin sialasyonundan dolayı bazen yanlış sonuçlar verebilecek olması deney sonuçlarını açısından dikkate alınması gereken bir diğer noktadır.

Shinomiya ve ark., (2001) Japon erkeklerinde Apo E genotipi, serum lipidleri ve kolorektal kanser ilişkisini araştırdıkları bir diğer çalışmada toplam 425 vaka ve kontrol incelenmiştir. Allel frekansları  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 ve  $\epsilon$ 4 için sırasıyla kontrollerde 0.056, 0.866 ve 0.08 iken proksimal adenomalarda 0.065, 0.884 ve 0.051, distal adenomalarda ise 0.041, 0.873 ve 0.086’dır. Serum total ve LDL kolesterol ile proksimal ve distal adenomalardaki genotipler arasında herhangi bir ilişki gözlenmezken (total kolesterol için  $p=0.74$ ; LDL kolesterol için  $p=0.71$ ) serum trigliseridlerinin distal adenomalarla pozitif ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Bir Apo E  $\epsilon$ 4 alleli taşıyanların serum trigliserid konsantrasyonlarının Apo E  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3

genotiplilerden anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır ( $p=0.02$  crude mean,  $p= 0.04$  adjusted mean) (Shinomiya et al, 2001).

Butler ve ark., (2001) yapmış olduğu çalışmada ise N-asetiltransferaz 1(NAT1, NAT2), sitokrom P450 1A1 (CYP1A1), CYP 2D6, CYP 2E1, glutasyon S-transferaz M1 (GST M1), GST T1 ve Apo E gen polimorfizmleri 219 beyaz sporadik kolon kanseri hastasıyla 200 beyaz erkek kontrolde karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda metabolik bir genotiple kolorektal kanser arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır fakat Apo E  $\epsilon 4$  alleli taşıyan proksimal kanserlerde riskin düşmekte olduğu gözlenmiştir (OR 0.64; %95 CI 0.31–1.33) (Butler et al, 2001).

Apo E polimorfizmi ve kolorektal kanser ilişkisini inceleyen bir diğer araştırma 2003 yılında Watson ve ark., (2003) gerçekleştirdiği çalışmadır. Bu çalışmada 206 hasta ve 353 kişilik kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda allelik frekanslar  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  için sırasıyla 0.074, 0.779 ve 0.147 bulunurken hasta grubu için 0.095, 0.735 ve 0.170 bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında hasta grubunda  $\epsilon 3$ 'ün allelik frekansında hafif bir düşme gözlenirden diğer iki allelin frekansının arttığı gözlenmiştir. En yaygın olan  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipi ile karşılaştırıldığında;  $\epsilon 2/\epsilon 3$  genotipinin kolon kanseri için riski artırdığı gözlenmiştir (OR=1.91 ; %95 CI: 1.30–3.45). Bununla birlikte bu bağlantının güçlü derecede cinsiyetten etkilendiği ortaya konulmuştur. Cinsiyetler ayrılıp analiz yapıldığında erkek cinsiyetle güçlü ilişki gözlenirken (OR=2.71 ; %95 CI: 1.30–5.65) kadınlarda bu bağlantı gözlenmemiştir (OR=1.01; %95 CI: 0.37–2.77). Ayrıca  $\epsilon 4$  allelinin bulunmasının kolorektal kanser riski üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı, bunun yanında proksimal kolon kanseri hastaları arasında  $\epsilon 4/\epsilon 4$  homozigot bulunmadığı gözlenmiştir. En düşük risk olarak Apo E  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipini taşıyanlar olduğu ve Apo E polimorfizminin kolorektal kanser gelişim riskini cinsiyete bağlı olarak etkileyebileceği bu çalışmayla ileri sürülmüştür (Watson et al, 2003).

Kolon kanseri ve Apo E polimorfizmi hakkında PubMed'de yapılan tarama sonunda bulunan en son kaynak Slattery ve ark., (2005) yapmış olduğu çalışmadır. Bu geniş çalışmada 1556 kolon kanseri vakasına 1948 kontrol ve 777 rektal kanser vakasına karşılık ise 988 kontrol incelenmiştir.  $\epsilon 3$  alleli en yaygın allel olarak gözlenirken kontrollere ait allelik dağılımlar  $\epsilon 2$  alleli için %8,  $\epsilon 3$  alleli için %78 ve  $\epsilon 4$  alleli için %14 bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada Apo E genotipleri ile distal ve

proksimal tümör riski açısından herhangi bir fark gözlenmemiştir.  $\epsilon 3/\epsilon 3$  genotipli kişilerle ,  $\epsilon 3$  ve diğer herhangi bir allel için heterozigot olanlar karşılaştırıldığında kolon kanser riskinin benzer olduğu gözlenirken, hiç  $\epsilon 3$  alleli bulunmayan bireylerde kolon kanser riskinin arttığı gözlenmiştir. Cinsiyete bağlı kolon ve rektal kanser geliştirme riskleri arasında herhangi bir ilişki gözlenmezken, Apo E genotipi ve kolon kanser arasındaki ilişkinin yaşla birlikte anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (OR=1.88; %95 CI:1.17–3.04) (Slattery et al, 2005). Yapılan çalışmalarda sonuçların bu kadar çok farklılık göstermesindeki en önemli etkenlerin biride ülkelere ait popülasyonlardaki APO E allelik dağılımlarının farklı oluşudur. Bu farklılıklar sonuçların farklı ülkelerde yapılan çalışmalarla karşılaştırılmalarında bazı yanılgılara yol açmaktadır.

Apo E gen polimorfizminin bağımsız bir faktör olarak kolon kanserli hastalarla olan ilişkisinin PCR-RFLP yöntemi ile araştırıldığı çalışmamızda vaka ve kontrol grupları arasındaki sonuçlarda anlamlı bir ilişki gözlenmemiş (OR=1.011; %95CI=0.713–1.434; P=0.94); Apo E polimorfizminin kolon kanseri için tek başına bir risk faktörü olmadığı gözlenmiştir ( Vaka n=222; Kontrol n= 300) (Çizelge 4.5 - 4.6). Elimizde bulunan vakaların tümör yerleşimi ile ilgili bilgisine ulaştıklarımızı ayrı bir grup olarak ele aldığımızda (Vaka n=160; Kontrol n=300) kontrol grubunda  $\epsilon 4$  kolon kanserine veya kolorektal kansere karşı herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir; bu sonuçlar Krevinen ve ark., (1996) ileri sürdükleri  $\epsilon 4$  allelini proksimal kolondaki koruyucu etkisi ile çalışmaktadır, bunun yanında proksimal kolon kanserlerinde hiç homozigot  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotipli hastanın bulunmayışı Watson ve ark., (2003) bulguları ile uyumludur. Ayrıca Butler ve ark., (2001) çalışma sonuçlarına göre  $\epsilon 4$  allelinin proksimal kanserlerde riski azattığına ilişkin görüşleri çalışmamızda gözlenmemiştir. Bulduğumuz bu sonuçlar proksimal ve distal yerleşimi olan kanserlerin vaka sayısının düşük olması nedeniyle istatistiki olarak anlam vermemektedirler (Çizelge 4.13). Watson ve ark., (2003) Apo E 2/3 genotipinin kolorektal kanserler için risk oluşturduğunu öne süren sonuçlarına benzer bir bulguya bizim çalışmamızda ulaşılmazken, en düşük risk faktörü olarak  $E3/3$  genotipinin olduğu Watson ve ark., yapmış olduğu çalışma ile uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.5). Slattery ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada  $\epsilon 3$  allelini

hiç taşımayan hastalarda kanser riskinin arttığını gösteren bulgularına yine bizim çalışmamızda rastlanmamıştır (Çizelge 4.15).

APO E allelik dağılımlarının incelendiği Çizelge 1.11’de genel olarak  $\epsilon 4$  allelinin daha çok koyu derili insan popülasyonlarında oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Evrimsel açıdan bakıldığında yerleşik hayata tam olarak geçmemiş toplayıcı popülasyonlarda besin bulmadaki zorluk ve bulunan besinin azlığı,  $\epsilon 4$  allelini taşıyan bireyleri bu topluluklarda doğal seçimde daha avantajlı bir konuma getirmektedir. Çizelge incelendiğinde ve genel kabul edilen görüşe göre ise yerleşik tarım toplumuna geçen topluluklarda ise diğer allelerin frekanslarının arttığı görülmektedir.  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ve  $\epsilon 4$  allel dağılımlarının sırası ile %9, %79.33 ve %11.67 olarak bulunduğu bizim bulgularımıza göre ise Türkiye allelik dağılımlar göz önüne alındığında daha çok Avrupa ülkelerine yakın, Ortadoğu ve Avrupa arasında bir geçiş popülasyonu olarak yerini almaktadır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmamız da 222 kolon kanserli hasta ve 300 sağlıklı kontrole ait APO E polimorfizmine dayalı sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve kolorektal kanserli hastalarla kontrollere ait genotipler arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (OR=1.011; %95CI=0.713–1.434; P=0.94). APO E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 ve E4/4 genotiplerinin gruplara göre dağılımları sırasıyla şöyledir; kontrol grubunda % 0.3, % 12, %5.3, %65, %16.7 ve % 0.7 iken hasta grubunda %0.0, %13.5, %1.8, %68.5, %15.3 ve %0.9 olarak bulunmuştur. ε2, ε3 ve ε4'ün gruplara ait allelik frekanslara bakıldığında ise kontrol grubunda %9, %79.33 ve %11.67 hesaplanırken hasta grubunda ise %7.65, %82.88 ve %9.45 olarak allelik frekanslar gözlenmiştir. Gözlenen allelik dağılımların Hardy Weinberg dengesinden sapma göstermediği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada Apo E 3/3 genotipi kontrol grubunda en fazla gözlenen genotip olarak kolon kanserine karşı koruyucu olduğu diğer allellerin ise hastalıkla anlamlı bir ilişkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu bulguların çok daha açıklık kazanabilmesi için tam biyokimyasal ve demografik bilgilerine sahip daha geniş hasta ve kontrol gruplarının olduğu bir çalışmaya gerek vardır. Ayrıca Apo E gen polimorfizmi ile birlikte APC, p53, PTEN, NAT 1, NAT 2, CYP 1A1, CYP 2D6, CYP 2E1, GSTM1 ve GSTM2 gen polimorfizmlerinin kolon kanserindeki ilişkilerini araştıran bir çalışma planı bu hastalıkla ilgili metabolik genotipin belirlenmesi ve genotipler arası etkileşimin ortaya çıkarılması açısından da önemli olacaktır. Bunun yanında Türkiye popülasyonunu daha iyi ifade edebilecek, etnik varyasyona göre sapmalarıda hesaba katacak Türkiye popülasyonuna ait Apo E polimorfizmi dağılımlarını gösteren çalışmaların ülkemizde yapılması daha ileri çalışmalar için çok daha aydınlatıcı bir bilgiyi Türk bilim insanlarının kullanımına sunacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed, F.E., (2004). Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 22(2):91–147.
- Al-Bustan, S.A., Alnaqeeb, M.A., Annice, B.G., Ibrhim, G., Al-Rubaian, J., Ahmed, A.H., Refai, T.M., (2005). Apolipoprotein E genotyping among the healthy Kuwaiti population. *Hum Biol.* 77(4):487–98.
- Al-Khedhairi, A.A., (2004). Apolipoprotein E polymorphism in Saudis. *Mol Biol Rep.* 31(4):257–60.
- Artiga, M.J., Bullido, M.J., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M.A., Aldudo, J., Vazquez, J., Valdivieso, F., (1998). Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.* 421(2):105–8.
- Attila, G., Acarturk, E., Eskandari, G., Akpınar, O., Tuli, A., Kanadas, I.M., Kayrin, L., (2001). Effects of apolipoprotein E genotypes and other risk factors on the development of coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim Acta.* 312(1–2):191–6.
- Bales, K.R., Dodart, J.C., DeMattos, R.B., Holtzman, D.M., Paul, S.M., (2002). Apolipoprotein E, amyloid, and Alzheimer disease. *Mol Interv.* 2(6):363–75, 339.
- Behrens, J., (2005). The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans.* 4:672–5.
- Boguski, M.S., Birkenmeier, E.H., Elshourbagy, N.A., Taylor, J.M., Gordon, J.I., (1986). Evolution of the apolipoproteins. Structure of the rat apo-A-IV gene and its relationship to the human genes for apo-A-I, C-III, and E. *J Biol Chem.* 261(14):6398–407.
- Borek, C., (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integr Cancer Ther.* 3(4):333–41.
- Bostick, R.M., Potter, J.D., McKenzie, D.R., Sellers, T.A., Kushi, L.H., Steinmetz, K.A., Folsom, A.R., (1993). Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Res.* 53(18):4230–7.
- Breslow, J.L., McPherson, J., Nussbaum, A.L., Williams, H.W., Lofquist-Kahl, F., Karathanasis, S.K., Zannis, V.I., (1982). Identification and DNA sequence of a human apolipoprotein E cDNA clone. *J Biol Chem.* 257(24):14639–41.
- Buğra, D., (2003). Kolonun anatomisi. *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. Ed.: Alemdaroğlu, K., Akçal, T., Buğra, D. İstanbul : Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği. s.1–17
- Bullido, M.J., Valdivieso, F., (2000). Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech.* 50(4):261–7.



- Butler, L.M., Sinha, R., Millikan, R.C., Martin, C.F., Newman, B., Gammon, M.D., Ammerman, A.S., Sandler, R.S., (2003). Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol.* 157(5):434–45.
- Butler, W.J., Ryan, P., Roberts-Thomson, I.C., (2001). Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 16(6):631–5.
- Calvert, P.M., Frucht, H., (2002). The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 137(7):603–12.
- Chan, T.A., (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol.* 3: 166–74.
- Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Holmberg, L., Kim, D.H., Malila, N., Miller, A.B., Pietinen, P., Rohan, T.E., Sellers, T.A., Speizer, F.E., Willett, W.C., Wolk, A., Hunter, D.J., (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med.* 140(8):603–13.
- Corbo, R.M., Scacchi, R., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., De Stefano, G.F., (1999). An investigation of human apolipoproteins B and E polymorphisms in two African populations from Ethiopia and Benin. *Am J Hum Biol.* 11(3):297–304.
- Corbo, R.M., Scacchi, R., (1999). Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE\*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 63 ( Pt 4):301–10.
- Crews, D.E., Kamboh, M.I., Mancilha-Carvalho, J.J., Kottke, B., (1993). Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum Biol.* 65(2):211–24.
- Dammerman, M., Breslow, J.L., (1995). Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation.* 91(2):505–12.
- Das, H.K., McPherson, J., Bruns, G.A., Karathanasis, S.K., Breslow, J.L., (1985). Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 260(10):6240–7.
- de Knijff, P., van den Maagdenberg, A.M., Frants, R.R., Havekes, L.M., (1994). Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat.* 4(3):178–94.
- Dolara, P., Caderni, G., Salvadori, M., Morozzi, G., Fabiani, R., Cresci, A., Orpianesi, C., Trallori, G., Russo, A., Palli, D., Fecal Levels of Short-Chain Fatty Acids and Bile Acids as Determinants of Colonic Mucosal Cell Proliferation in Humans. *Nutrition and Cancer.* Vol. 42, No. 2, Pages 186–190
- Dominiczak, M.H., (1997). Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma. In: *Handbook of Lipoprotein Testing.* Ed.: Rifai N., Warnick GR., Dominczak MH. Washington: AACC Pres. p.:1–25.

- Dong, L.M., Wilson, C., Wardell, M.R., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Agard, D.A., (1994). Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem.* 269(35):22358–65.
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., DuBois, R.N., (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 107(4):1183–8.
- Eichner, J.E., Dunn, S.T., Perveen, G., Thompson, D.M., Stewart, K.E., Stroehla, B.C., (2002). Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 155(6):487–95.
- Epstein, R.J., (2003). Nutrition and Energy. Chapter 6. In: *Human Molecular Biology. An introduction to the molecular basis of health and disease.* Cambridge: Cambridge University Pres. p.: 167–172.
- Erlinger, T.P., Platz, E.A., Rifai, N., Helzlsouer, K.J., (2004). C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA.* 291: 585–590.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P., Bodmer, W.F., (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 10(7):721–33.
- Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., (1987). Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238: 193–197.
- Frikke-Schmidt, R., Tybjaerg-Hansen, A., Steffensen, R., Jensen, G., Nordestgaard, B.G., (2000). Apolipoprotein E genotype: epsilon32 women are protected while epsilon43 and epsilon44 men are susceptible to ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 35(5):1192–9.
- Fullerton, S.M., Clark, A.G., Weiss, K.M., Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Stengard, J.H., Salomaa, V., Vartiainen, E., Perola, M., Boerwinkle, E., Sing, C.F., (2000). Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet.* 67(4):881–900.
- Gerhardsson de Verdier, M., Hagman, U., Peters, R.K., Steineck, G., Overvik, E., (1991). Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer.* 49(4):520–5
- Giovannucci, E., (1995). Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control.* 6: 164–179.
- Greenwald, P., (1997). Cancer prevention: Diet and Risk Reduction. In: *Cancer Principles & Practice of Oncology.* 5<sup>th</sup> ed. Ed.: Vincent T. DeVita Jr., Samuel Hellman., Steven A. Rasenberg. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, New York. p.: 576-573
- Grodstein, F., Newcomb, P.A., Stampfer, M.J., (1999). Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med.* 106 (5): 574–82.

- Haapala, K., Lehtimäki, T., Ilvekoski, E., Koivisto, P.A.,(2000). Apolipoprotein E genotype is not linked to locally recurrent hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3: 107–109
- Hanlon, C.S., Rubinsztein, D.C., (1995). Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis.* 112(1):85–90.
- Hergenc, G., Taga, Y., Emerk, K., Cirakoglu, B., (1995). Apolipoprotein E Genotyping in Turkish Myocardial Infarction Survivors and Healthy Controls. *J Biomed Sci.* 2(1):46–49.
- Higgins, G.A., Large, C.H., Rupniak, H.T., Barnes, J.C., (1997). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: a review of recent studies. *Pharmacol Biochem Behav.* 56(4):675–85.
- Hixson, J.E., Cox, L.A., Borenstein, S., (1988). The baboon apolipoprotein E gene: structure, expression, and linkage with the gene for apolipoprotein C-1. *Genomics.* 2(4):315–23.
- Hixson, J.E., Vernier, D.T., (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* 31(3):545–8.
- Holt, P.R.,( 1999). Dairy foods and prevention of colon cancer: human studies. *J Am Coll Nutr.* 18:379–391.
- Hong, S.H., Kang, B.Y., Oh, J.H., Kim, J.Q., Lee, C.C., (1997). Genetic variations of the apo E-Cl-CII cluster gene in Koreans. *Clin Biochem.* 30(3):215–9.
- Houlston, R.S., Tomlinson, I.P., (2001) Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology.* 121(2):282–301
- <http://telescan.nki.nl/iarc.html>
- <http://www.saglik.gov.tr> (2006)
- Jalving, M., Koornstra, J.J., De Jong, S., De Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., (2005). the potential of combinational regimen with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 21(4):321–39.
- Juvonen, T., Kervinen, K., Kairaluoma, M.I., Lajunen, L.H., Kesaniemi, Y.A., (1993). Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology.* 104:1806–1813
- Kambara, T., Whitehall, V.L., Spring, K.J., Barker, M.A., Arnold, S., Wynter, C.V., Matsubara, N., Tanaka, N., Young, J.P., Leggett, B.A., Jass, J.R., (2004). Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 40(1):1–9.
- Kamboh, M.I., Sepehrnia, B., Ferrell, R.E., (1989). Genetic studies of human apolipoproteins. VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Dis Markers.* 7(1):49–55.

- Kamboh, M.I., (1995). Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum Biol.* 67(2):195–215.
- Katan, M.B., (2004). Apolipoprotein E isoforms, serum cholesterol, and cancer. 1986. *Int J Epidemiol.* 33(1):9.
- Kervinen, K., Sodervik, H., Makela, J., Lehtola, J., Niemi, M., Kairaluoma, M.I., Kesaniemi, Y.A., (1996). Is the development of adenoma and carcinoma in proximal colon related to apolipoprotein E phenotype? *Gastroenterology.* 110(6):1785–90.
- Kohlmeier, M., Saupe, J., Schaefer, K., Asmus, G., (1998). Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif Tissue Int* 62:278–281.
- Kowalska, A., Wender, M., (1998). Mutation of presenilin ++ genes and their role in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol.* 32(5):1207–17.
- Lahoz, C., Schaefer, E.J., Cupples, L.A., Wilson, P.W., Levy, D., Osgood, D., Parpos, S., Pedro-Botet, J., Daly, J.A., Ordovas, J.M., (2001). Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis.* 154(3):529–37.
- Lambert, J.C., Berr, C., Cattel, D., Amouyel, P., Helbecque, N., (2004). APOE promoter polymorphisms and dementia in the elderly. *Neurosci Lett.* 365(2):116–9.
- Lambert, J.C., Pasquier, F., Cattel, D., Frigard, B., Amouyel, P., Chartier-Harlin, M.C., (1998). A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 7(3):533–40.
- Laws, S.M., Hone, E., Gandy, S., Martins, R.N., (2003). Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem.* 84(6):1215–36.
- Li, W.H., Tanimura, M., Luo, C.C., Data, S., Chan, L., (1988). The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res.* 29(3):245–71.
- Liestol, K., Kvittingen, E.A., Rootwelt, H., Dunlop, O., Goplen, A.K., Pedersen, J.C., Brorson, S.H., Borresen-Dale, A.L., Myrvang, B., Maehlen, J., (2000). Association between apolipoprotein E genotypes and cancer risk in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Cancer Detect. Prev.* 24(5):496–9.
- Liu, Y., Bodmer, W.F., (2006). From the Cover: Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(4):976-81.
- Mahley, R.W., Rall, S.C.Jr., (1999). Is epsilon4 the ancestral human apoE allele? *Neurobiol Aging.* 20(4):429–30.
- Mahley, R.W., Rall, S.C. Jr., (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:507–37.

- Mahley, R.W., (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 240(4852):622–30.
- Main, B.F., Jones, P.J., MacGillivray, R.T., Banfield, D.K., (1991). Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide primers. *J Lipid Res*. 32(1):183–7.
- Mayeux, R., Saunders, A.M., Shea, S., Mira, S., Evans, D., Roses, A.D., Hyman, B.T., Crain, B., Tang, M.X., Phelps, C.H., (1998). Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. Feb 19;338(8):506–11.
- Mehlen, P., Fearon, E.R., (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*. 22(16): 3420–8.
- Menteş, B., İrikörücü, O., (2003). Kolonun anatomisi. *Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. Ed.: Alemdaroğlu K., Akçal T., Buğra D. İstanbul : Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği. s.17 – 31
- Midgley, R., Kerr, D., (1999). Colorectal cancer. *Lancet*. 353(9150):391–9.
- Miettinen, T.A., (1991). Impact of apo E phenotype on the regulation of cholesterol metabolism. *Ann Med*. 23(2):181–6
- Miyaki, M., Iijima, T., Yamaguchi, T., Hishima, T., Tamura, K., Utsunomiya, J., Mori, T., (2005). Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat Res*. 578(1–2):430–3.
- Molatore, S., Ranzani, G.N., (2004). Genetics of colorectal polyps. *Tech Coloproctol. Suppl* 2:240–242.
- Molero, A.E., Ramirez, G.P., Mastre, G.E., (2001). Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E-ε4 allele in Latin Americans: finding from the Maracaibo Aging study, *Neurosci. Lett*. 30 (7): 5–8.
- Moysich, K.B., Freudenheim, J.L., Baker, J.A., Ambrosone, C.B., Bowman, E.D., Schisterman, E.F., Vena, J.E., Shields, P.G., (2000). Apolipoprotein E genetic polymorphism, serum lipoproteins, and breast cancer risk. *Mol. Carcinogenesis*. 27: 2–9
- Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R., (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 14(1):133–40
- Narayan, S., Roy, D., (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*. 2:41–56
- Narayanaswami, V., Ryan, R.O., (2000). Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim Biophys Acta*. 1483(1):15–36.

- Newcomb, P.A., Storer, B.E., Marcus, P.M., (1995). Cigarette smoking in relation to risk of large bowel cancer in women. *Cancer Res.* 55(21):4906–9.
- Newcomb, P.A., Storer, B.E.,(1995). Postmenopausal hormone use and risk of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 87(14):1067–71.
- Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengard, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E., Sing, C.F., (2000). Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* 10(10):1532–45.
- Niemi, M., Hakinen, T., Karttunen, T.J., Eskelinen, S., Kervinen, K., Savolainen, M.J., Lehtola, J., Makela, J., Yla-Herttuala, S., Kesaniemi, Y.A., (2002). Apolipoprotein E and colon cancer. Expression in normal and malignant human intestine and effect on cultured human colonic adenocarcinoma cells. *Eur J Intern Med.* 13(1):37–43.
- Niemi, M., Kervinen, K., Kiviniemi, H., Lukkarinen, O., Kyllonen, A.P., Apaja-Sarkkinen, M., Savolainen, M.J., Kairaluoma, M.I., Kesaniemi, Y.A., (2000). Apolipoprotein E phenotype, cholesterol and breast and prostate cancer. *J Epidemiol Community Health.* 54(12):938–9.
- Nolte, R.T, and Atkinson, D., (1992). Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophys J.* 63(5): 1221–1239.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., (2001). Genetic variation in individuals: Mutation and polymorphism. Chapter 6. In: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Sixth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p.: 79-94.
- Okamoto, M., Sasaki, M., Sugio, K., Sato, C., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Sasazuki, T., Miyaki, M., (1988). Loss of constitutional heterozygosity in colon carcinoma from patients with familial polyposis coli. *Nature* 331: 273–277.
- Okulczyk, B., Piotrowski, Z., Kovalchuk, O., Niklinski, J., Chyczewski, L., (2003). Evaluation of K-RAS gene in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 41(2):97–100.
- Orchard, T.J., Eichner, J., Kuller, L.H., Becker, D.J., McCallum, L.M., Grandits, G.A., (1994). Insulin as a predictor of coronary heart disease: interaction with apolipoprotein E phenotype. A report from the multiple risk factor intervention trial. *Ann. Epidemiol.* 4: 40–45.
- Paik, Y.K., Chang, D.J., Reardon, C.A., Davies, G.E., Mahley, R.W., Taylor, J.M., (1985). Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(10):3445–9.
- Paik, Y.K., Chang, D.J., Reardon, C.A., Walker, M.D., Taxman, E., Taylor, J.M., (1988). Identification and characterization of transcriptional regulatory regions associated with expression of the human apolipoprotein E gene *J Biol Chem.* 263(26):13340–9.

- Parsian, A., Racette, B., Goldsmith, L.J., Perlmutter, J.S., (2002). Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset. *Genomics*. 79(3):458–61.
- Pathak, S., Goodacre, A., (1986). Specific chromosome anomalies and predisposition to human breast, renal cell, and colorectal carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 19: 29–36.
- Peng, D.-Q., Zhao, S.-P., Nie, S., Li, J., (2003). Gene–gene interaction of *PPAR [gamma]* and *apoE* affects coronary heart disease risk. *Int. J. Cardiol.*, 92: 257–263.
- Prihartono, N., Palmer, J.R., Louik, C., Shapiro, S., Rosenberg, L., (2000). A case-control study of use of postmenopausal female hormone supplements in relation to the risk of large bowel cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(4):443–7.
- Raber, J., Huang, Y., Ashford, J.W., (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*. 25(5):641–50.
- Rall, S.C. Jr., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., (1982). Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 257(8):4171–8.
- Raygani, A.V., Zahrai, M., Raygani, A.V., Doosti, M., Javadi, E., Rezaei, M., Pourmotabbed, T., (2005). Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neurosci Lett*. 375(1):1–6.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., Murri, L., (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull*. 61(1):1–24.
- Sacre, S.M., Stannard, A.K., Owen, J.S., (2003). Apolipoprotein E (apoE) isoforms differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS Lett*. 540(1–3):181–7.
- Salamone, L.M., Cauley, J.A., Zmuda, J., Pasagian-Macaulay, A., Epstein, R.S., Ferrell, R.E., Black, D.M., Kuller, L.H., (2000). Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J Bone Miner Res*. 15(2):308–14
- Sayek, İ., (1991). Kolorektal Karsinomlar. *Temel Cerrahi Cilt I*. Ed.: Sayek İ. Ankara: Güneş Kitapevi Ltd. Şti. s. 829–839.
- Sazcı, A., Ergül, E., Cantürk, Z., Utkan, Z., (2003). Apolipoprotein E gene polymorphism in patients with breast cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 73(5):248.
- Scacchi, R., Corbo, R.M., Rickards, O., Mantuano, E., Guevara, A., De Stefano, G.F., (1997). Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum Biol*. 69(3):375–82.
- Schiele, F., De Bacquer, D., Vincent-Viry, M., Beisiegel, U., Ehnholm, C., Evans, A., Kafatos, A., Martins, M.C., Sans, S., Sass, C., Visvikis, S., De Backer, G., Siest, G., (2000). Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*. 152(2):475–88.

- Seet, W.T., Mary Anne, T.J., Yen, T.S., (2004). Apolipoprotein E genotyping in the Malay, Chinese and Indian ethnic groups in Malaysia-a study on the distribution of the different apoE alleles and genotypes. *Clin Chim Acta.* 340(1-2):201-5.
- Senda, T., Shimomura, A., Iizuka-Kogo, A., (2005). Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int.* 80(3):121-31.
- Shinomiya, S., Sasaki, J., Kiyohara, C., Tsuji, E., Inoue, H., Marugame, T., Handa, K., Hayabuchi, H., Hamada, H., Eguchi, H., Fukushima, Y., Kono, S., (2001). Apolipoprotein E genotype, serum lipids, and colorectal adenomas in Japanese men. *Cancer Lett.* 164(1):33-40.
- Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K., Bisgaard, M.L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V., Thomas, H.J., Tomlinson, I.P., (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 348(9):791-9.
- Siest, G., Zaiou, M., Vizvikis, S., (2002). Human Apolipoprotein E Concentration in Response to Disease and Therapeutic Treatments. *Drug Dev. Res.* 56:95-110
- Sklavounou, E., Economou-Petersen, E., Karadima, G., Panas, M., Avramopoulos, D., Varsou, A., Vassilopoulos, D., Petersen, M.B., (1997). Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin Genet.* 52(4):216-8.
- Slattery, M.L., Sweeney, C., Murtaugh, M., Ma, K.N., Potter, J.D., Levin, T.R., Samowitz, W., Wolff, R., (2005). Associations between Apo E genotype and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis.* 26(8):1422-9.
- Slooter, A.J., Bots, M.L., Havekes, L.M., del Sol, A.I., Cruts, M., Grobbee, D.E., Hofman, A., Van Broeckhoven, C., Witteman, J.C., van Duijn, C.M., (2001). Apolipoprotein E and carotid artery atherosclerosis: the Rotterdam study. *Stroke.* 32(9):1947-52.
- Song, Y., Stampfer, M.J., Liu, S., (2004). Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 141(2):137-47.
- Soufi, M., Sattler, A.M., Maisch, B., Schaefer, J.R., (2002). Molecular mechanisms involved in atherosclerosis. *Herz.* 27(7):637-48.
- Souza, D.R.S., Godog, M.R., Hotta, J., Tajara, E.H., Brandao, A.C., Pinheiro Junior, S., Tognola, W.A., Dos Santos, J.E., (2003). Association of E polymorphism in age-onset Alzheimer's disease and vascular, dementia in Brazilians, *Braz. J. Med. Biol.* 36 (7):919-923.
- Stannard, A.K., Riddell, D.R., Sacre, S.M., Tagalakis, A.D., Langer, C., von Eckardstein, A., Cullen, P., Athanasopoulos, T., Dickson, G., Owen, J.S., (2001). Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 276(49):46011-6.
- Stengard, J.H., Weiss, K.M., Sing, C.F., (1998). An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet.* 103(2):234-41.



- Stengard, J.H., Clark, A.G., Weiss, K.M., Kardia, S., Nickerson, D.A., Salomaa, V., Ehnholm, C., Boerwinkle, E., Sing, C.F., (2002). Contributions of 18 Additional DNA Sequence Variations in the Gene Encoding Apolipoprotein E to Explaining Variation in Quantitative Measures of Lipid Metabolism *Am. J. Hum. Genet.* 71:501–517.
- Sturmer, T., Glynn, R.J., Lee, I.M., Manson, J.E., Buring, J.E., Hennekens, C.H., (1998). Aspirin use and colorectal cancer: post-trial follow-up data from the Physicians' Health Study. *Ann Intern Med* 128 (9): 713–20.
- Sugimura, T., (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis.* 21(3):387–95.
- Topping, D.L., and Clifton, P.M., (2001). Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews.* 3:1031–1064
- Van Erpecum, K.J., Van Berge-henegouwen, G.P., Eckhardt, E.R., Portincasa, P., Van De Heijning, B.J., Dallinga-Thie, G.M. Groen, A.K., (1998). Cholesterol crystallization in human gallbladder bile: relation to gallstone number, bile composition, and apolipoprotein E4 isoform. *Hepatology.* 27: 15
- Viale, P.H., Fung, A., Zitella, L., (2005). Advanced colorectal cancer: current treatment and nursing management with economic considerations. *Clin J Oncol Nurs.* 9(5):541–52.
- Vogel, T., Guo, N.H., Guy, R., Drezlich, N., Krutzsch, H.C., Blake, D.A., Panet, A., Roberts, D.D., (1994). Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J Cell Biochem.* 54(3):299–308.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M.M., Bos, J. L., ( 1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Eng. J. Med.* 319: 525–532.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., White, R., (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244: 207–211.
- Watson, M.A., Gay, L., Stebbings, W.S., Speakman, C.T., Bingham, S.A., Loktionov, A., (2003). Apolipoprotein E gene polymorphism and colorectal cancer: gender-specific modulation of risk and prognosis. *Clin Sci.* 104(5):537–45.
- Wei, J.T., Connelly, A.E., Satia, J.A., Martin, C.F., Sandler, R.S., (2004). Eating Frequency and Colon Cancer Risk. *Nutrition and Cancer* 50(1): 16–22.
- Weisgraber, K.H., Rall, S.C. Jr., Mahley, R.W., (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem.* 256(17):9077–83
- Weisgraber, K.H., (1990). Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res.* 31(8):1503–11.

- Wessel, N., Liestol, K., Maehlen, J. and Brorson, S. H., (2001). The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not risk factor for prostate cancer in the Norwegian population. *Br. J. Cancer.* 85: 1418
- Willett, W.C., ( 2000). Diet and cancer. *Oncologist.* 5(5):393-404.
- Woutersen, R.A., Apel, M.J., van Garderen-Hoetmer, A., Wijnands, M.V., (1999). Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res.* 443(1-2):111-27.
- Yaylim, I., Bozkurt, N., Yilmaz, H., Isbir, T., Isik, N., Arikan, S., (2003). The apolipoprotein E epsilon 4 allele is not a risk factor for Turkish breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 146(1):86-7.
- Ye, Y.N., Wu, W.K., Shin, V.Y., Cho, C.H., (2005). A mechanistic study of colon cancer growth promoted by cigarette smoke extract. *Eur J Pharmacol.* 519(1-2):52-7.
- Yılmazlar, T., Öztürk, E., (2004). Kolon Kanseri. *Kolon & Rektal Cerrahinin El Kitabı.* Ed.: Corman ML., Allison SI., Kuehne JP. Çev.Ed.: Alabaz Ö. Adana: Nobel Tıp Kitapevleri. s.423-474.
- Zannis, V.I., McPherson, J., Goldberger, G., Karathanasis, S.K., Breslow, J.L., ( 1984). Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 259(9):5495-9.
- Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R., Blum C., (1982). Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J Lipid Res.* 3(6):911-4.
- Zarepari, S., Camicioli, R., Sexton, G., Bird, T., Swanson, P., Kaye, J., Nutt, J., Payami, H., (2002). Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes. *Am J Med Genet.* 107(2):156-61.
- Zarepari, S., Kaye, J., Camicioli, R., Grimslid, H., Oken, B., Litt, M., Nutt, J., Bird, T., Schellenberg, G., Payami, H., (1997). Modulation of the age at onset of Parkinson's disease by apolipoprotein E genotypes. *Ann Neurol.* 42(4):655-8.
- Zekraoui, L., Lagarde, J.P., Raisonnier, A., Gerard, N., Aouizerate, A., Lucotte, G., (1997). High frequency of the apolipoprotein E \*4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum Biol.* 69(4):575-81.
- Zoran, D.L., Turner, N.D., Taddeo, S.S., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., (1997). Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effects on distal luminal butyrate concentrations. *J Nutr.* 127(11):2217-25.
- Zunarelli, E., Nicoll, J.A., Migaldi, M., Trentini, G.P., (2000a). Apolipoprotein E polymorphism and breast carcinoma: correlation with cell proliferation indices and clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 63(3):193-8.
- Zunarelli, E., Nicoll, J.A., Trentini, G.P., (2000b). Apolipoprotein E polymorphism and central nervous system tumors: correlation with cell proliferation indices and clinical outcome. *Clin Neuropathol.* 19(1):1-6.

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Ünye'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ünye'de tamamladıktan sonra 1991 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 1997 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına kayıt oldum. Yüksek Lisans eğitimimi 2002 yılında tamamlayarak aynı Anabilimdalı'nda Doktora Programına katıldım. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.