

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**176471**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA PROGRAMI**

**METABOLİK SENDROMDA ABCA1  
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Mihriban AYVAZ**

**TRABZON-2007**

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**METABOLİK SENDROMDA ABCA1**  
**POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**Mihriban AYVAZ**

**Tezin Veriliş Tarihi** : 15.06.2007

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi** : 04.07.2007

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Orhan DEĞER

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Ekin ÖNDER

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. E. Edip KEHA

**Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Abdülkerim BEDİR

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. S. Caner KARAHAN

**Enstitü Müdürü** : Prof. Dr. Orhan DEĞER

**TEMMUZ 2007**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Başta Tez Danışmanım Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, tüm anabilim dalı hocalarıma ve çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Uzman Dr. Ilgın HOŞVER ve Yunus Emre YANDI'ya, anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışan arkadaşlarıma ayrıca aileme ve eşime yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
KISALTAMALAR LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metabolik Sendrom	3
2.1.1. Metabolik Sendromun Tarihçesi	3
2.2. Metabolik Sendromun Tanımlanması ve Patofizyolojisi	3
2.2.1. İnsülin Direnci	5
2.2.2. Obezite	7
2.2.3. Aterosklerotik Dislipidemi	7
2.2.4. Hipertansiyon	8
2.2.5. Diğer Belirtiler: Proinflamatuvar Sitokinler	8
2.2.6. Adiponektin	9
2.2.7. Leptin Direnci	9
2.3. ABC Transporter Proteinleri	9
2.3.1. ABC Genleri	10
2.3.2. ABCA Alt Ailesi	12
2.3.2.1. ABCA1 Geni	12
2.3.2.2. ABCA1 Genindeki Mutasyonlar	12
2.3.3. ABCA1 Proteininin Yapısı	13
2.3.4. ABCA1 Proteininin Fonksiyonları	15
2.3.5. ABCA1 Polimorfizmi (SNPs)	18
2.3.6. ABCA1 Polimorfizmi ve Hastalıklar	21
3. MATERYAL VE METOD	22

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	22
3.2. Deneyin Planlanması ve Numünelerin Toplanması	22
3.3. Otoanalizörde Çalışılan Parametreler	23
3.4. ABCA1 Dizi Analizi Çalışma Protokolü	23
3.4.1. DNA İzolasyonu	24
3.4.2. ABCA1 Ekson 7, Ekson 15, Ekson 19, Ekson 36, Ekson 41 ve Ekson 49 Gen Bölgelerinin PCR'(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Çoğaltılması	26
3.4.3. PCR Ürünlerinin Elektroforezi	28
3.4.4. Saflaştırma	29
3.4.5. Saflaştırma Sonrası Elektroforez	30
3.4.6. Dizi Döngüsü	30
3.4.7. NaAc ile Saflaştırma	32
3.4.8. DNA Dizi Analizi	32
3.4.9. DNA Dizi Uyum Analizi	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. ÖZET	72
8. SUMMARY	73
9. KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. ABCA1 proteinindeki mutasyon bölgeleri	13
Şekil 2. ABCA1'in topolojik modeli.	14
Şekil 3. ABCA1 proteinin yapısı	14
Şekil 4. ABCA1-aracılıklı ters kolesterol taşınımı modeli.	15
Şekil 5. ABCA1 aracılıklı hücrel lipid trafiği ve sekresyonu modeli.	17
Şekil 6. ABCA1'in konformasyonel değişimi	18
Şekil 7. ABCA1 genindeki cSNP'lerin dağılımı	20
Şekil 8. Agaroz Jel elektroforez görünümü	28
Şekil 9. Elektroforez sonrası jel görüntüsü	28
Şekil 10. A) PCR sonrası elektroforez jel görüntüsü. B). Saflaştırma sonrası elektroforez jel görüntüsü	31
Şekil 11. A. Applied Biosystem Sequence analyser. B. Numune yerleştirme bölmesi C.çıktı örneği D. Dizi analizlerinin software ortamında işlenme	33
Şekil 12. ABCA1 Ekson 7referans diziye uyan kontrol grubu elektrofrogam örneği nükleotit dizisi kodon sırası	40
Şekil 13. ABCA1 Ekson -7 219. kodon heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi	41
Şekil 14. ABCA1 Ekson 7, 219. kodon heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi	41
Şekil 15. Sağlıklı kontroldeki normal dizi	42
Şekil 16. ABCA1 Ekson -7, 219. kodon homozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi	42
Şekil 17. ABCA1 Ekson 7 219. kodon heterozigot g→a, R (AGG –AAG) polimorfizmi	43
Şekil 18. ABCA1 Ekson 7, 190.kodon g insersiyonu (üçlü kodon değişmiyor –CAG)	43
Şekil 19. ABCA1 Ekson 7,190.,192. kodonları içeren sağlıklı kontrol dizisi.	44
Şekil 20. ABCA1 Ekson 7 192. kodon heterozigot a→g (CAT-CGT) polimorfizmi	44
Şekil 21. ABCA1 EX-7 229. kodon sağlıklı kontrol dizisi	45

Şekil 22. ABCA1 Ex-7 229.kodon ins.A (CTT-CAT) polimorfizmi	45
Şekil 23. ABCA1 Ekson 7 231. kodon heterozigot c→t (TCC-TTC) polimorfizmi	46
Şekil 24. ABCA1 Ekson 7 231. kodon sağlıklı kontrol dizisi	46
Şekil 25. ABCA1 Ekson 7 kodon 233 T insersiyonu	47
Şekil 26. ABCA1 Ekson 7 kodon 233 sağlıklı kontrol dizisi	47
Şekil 27. ABCA1 Ekson 7 kodon 235 T insersiyonu	48
Şekil 28. ABCA1 Ekson 7 kodon 235 sağlıklı kontrol dizisi	48
Şekil 29. ABCA1 Ekson 15 kodon 680 ATC-ATA polimorfizmi	49
Şekil 30. ABCA1 Ekson 15 kodon 680 sağlıklı kontrol dizisi	49
Şekil 31. ABCA1 Ekson 19 kodon 901 heterozigot a→t (ATT-TTT) polimorfizmi	50
Şekil 32. ABCA1 Ekson 19 kodon 901 sağlıklı kontrol dizisi	50
Şekil 33. ABCA1 Ekson 19 kodon 904 heterozigot c→t (CTG-TTG) polimorfizmi	51
Şekil 34. ABCA1 Ekson 19 kodon 904 sağlıklı kontrol dizisi	51
Şekil 35. ABCA1 Ekson 19 kodon 918 C insersiyonu	52
Şekil 36. ABCA1 Ekson 19 kodon 918 sağlıklı kontrol dizisi	52
Şekil 37. ABCA1 Ekson 19 kodon 919 heterozigot c→t (CTG-TTG) polimorfizmi	53
Şekil 38. ABCA1 Ekson 19 kodon 919 sağlıklı kontrol dizisi	53
Şekil 39. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 heterozigot a→t (GCA-GCT) polimorfizmi	54
Şekil 40. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 sağlıklı kontrol dizisi	54
Şekil 41. ABCA1 Ekson 19 kodon 935 heterozigot t→g (AAT-AAG) polimorfizmi	55
Şekil 42. ABCA1 Ekson 19 kodon 935 sağlıklı kontrol dizisi	55
Şekil 43. ABCA1 Ekson 7 kodon 1590 heterozigot g→a (CAG-CAA) polimorfizmi	56
Şekil 44. ABCA1 Ekson 7 kodon 1590 sağlıklı kontrol dizisi	56
Şekil 45. ABCA1 Ekson 41 kodon 1855 heterozigot g→t (GCC-TCC) polimorfizmi	57
Şekil 46. ABCA1 Ekson 41 kodon 1855 sağlıklı kontrol dizisi	57
Şekil 47. ABCA1 Ekson 41 kodon 1858 heterozigot t→a (GTG-GAG) polimorfizmi	58
Şekil 48. ABCA1 Ekson 41 kodon 1858 sağlıklı kontrol dizisi	58
Şekil 49. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 heterozigot g→a (GGG-AGG) polimorfizmi	59
Şekil 50. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 sağlıklı kontrol dizisi	59
Şekil 51. ABCA1 Ekson 41 kodon 1861 heterozigot t→a (GTG-GAG) polimorfizmi	60
Şekil 52. ABCA1 Ekson 41 sağlıklı kontrol dizisi	60
Şekil 53. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi	61
Şekil 54. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 sağlıklı kontrol dizisi	61

Şekil 55. ABCA1 Ekson 49 kodon 2161 heterozigot c→ a (GAC-GAA) polimorfizmi	62
Şekil 56. ABCA1 Ekson 49 kodon 2161 sağlıklı kontrol dizisi	62
Şekil 57. ABCA1 Ekson 49 kodon 2189 A insersiyonu	63
Şekil 58. ABCA1 Ekson 49 kodon 2189 sağlıklı kontrol dizisi	63



## TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Metabolik Sendromun tanımlanması	4
Tablo 2. Bel Çevresinin Etnik Dağılımı	5
Tablo 3. ABC Taşıyıcı Ailesi	11
Tablo 4. ABCA1 Genindeki Single Nucleotide Polymorfizmler (cSNPs)	19
Tablo 5. İnsandaki polimorfik amino asitlerin korunması	20
Tablo 6. Metabolik Sendromlu hasta ve kontrol grubunda parametreler	35
Tablo 7. Metabolik sendromlu (hasta) ve sağlıklı bireylerde (kontrol) parametrelerin cinsiyete göre dağılımı	36
Tablo 8. ABCA1 Ekson 7,Ekson 15,Ekson 19,Ekson 36, Ekson 41 ve Ekson 49 için Tespit edilen polimorfizmlerin lokasyon,kodon,nükleotid ve amino asit değişimleri	37
Tablo 9. ABCA1 Ekson 7 kodon 219 AGG → AAG polimorfizminin genotip ve allel frekansları	37
Tablo 10. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 (W) GCA→GCT polimorfizminin genotip ve allel frekansları	38
Tablo 11. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 GGG→AGG polimorfizminin genotip ve allel frekansları	38
Tablo 12. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 AGG→AAG polimorfizminin genotip ve allel frekansları	38
Tablo 13. ABCA1 Ekson 7,Ekson 19 ve Ekson 49 'daki insersiyonların lokasyon, kodon, nükleotid ve amino asit değişimi	39
Tablo 14. ABCA1 genini ekson 7219.kodonda G/G ve G/A allellerine göre çalışma parametrelerinin oralamaları	64
Tablo 15. ABCA1 geninin ekson 7 219.kodonda G/G ve A/A allellerine göre çalışma	

parametrelerinin ortalaması	64
Tablo 16.ABCA1 Ekson 19 920.kodonda A/A ve A/T allellere göre çalışma parametrelerinin ortalaması	65
Tablo 17.ABCA1 Ekson 41 1860. kodonda G/G ve G/A allellere göre çalışma parametrelerinin ortalaması	65
Tablo 18.ABCA1 Ekson 41 1877.kodonda G/G ve G/A allellere göre çalışma arametrelerinin ortalaması	65
Tablo 19.ABCA1 Ekson 7, 15, 19, 41, 49 için tespit edilen SNP'lerin TD ve KAH ile ilişkisi	69

**KISALTMALAR**

MS	: Metabolik Sendrom
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LPL	: Lipoprotein Lipaz
SYA	: Serbest Yağ Asiti
BMI	: Vücut Kütle İndeksi
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktör $\alpha$
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
CRP	: C Reaktif Protein
SREBP 1c	: Sterol Response Element Bağlayıcı Protein 1c
ABC	: ATP bağlayıcı kaset protein
NBF	: Nükleotid Bağlayıcı Domain
TM	: Transmembran
PDZ	: Postsinaptik Density Protein, Disk Large, Zonula Occludens
TD	: Tangier Hastalığı
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
FHA	: Ailesel Hiper Alfa Lipoproteinemi
LCAT	: Lesitin : Kolesterol Açıl Transferaz Enzimi
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Protein
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDLR	: LDL Reseptör
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
cSNP	: Kodlanan SNP
PS	: Fosfatidil Serin
Apo A-I	: Apolipoprotein A-I

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metabolik sendrom koroner kalp hastalığı risk faktörlerinin pek çoğunun bir arada bulunduğu kompleks bir hastalıktır. Günümüzde tüm dünyada sedanter yaşam ve değişen beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak gittikçe yayılmaktadır. Ülkemizde kentsel alanlarda yaşayanların %33.3'ü metabolik sendromludur. Başlama yaşı hızla düşmekte olup, çocuklar da risk altındadır. Trabzon'da yapılan bir çalışmada 4809 kişide metabolik sendrom prevalansı erkekler için % 21,7, kadınlar için %31,3, toplam %26,9 olarak bulunmuştur (1).

Türkiye 'de yapılan bir çalışma sonucu koroner kalp hastaları içinde metabolik sendromun payı kadınlarda %64 iken erkeklerde %43 olarak bulunmuştur (2).

Metabolik sendrom risk faktörleri, aterojenik dislipidemi, yüksek arteriyel kan basıncı, insülin direnci ve /veya bozulmuş açlık kan şekeri, proinflamatuvar ve protrombik durum olarak belirtilmiştir (3). Bu bilgilerin ışığında metabolik sendromun KKH için çok önemli bir risk faktörü olduğu ortaya çıkmaktadır.

ABCA alt ailesi ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı süperaillesinin 7 alt ailesinden biridir. ABC taşıyıcılar metabolik ürünleri, sterolleri ve ilaçları taşırlar. İnsan ABCA alt ailesi, filogenetik analizler ve intron yapılarına bağlı olarak 2 alt gruba ayrılan 12 tam transporterden ibarettir (4). ABCA1 geni insanda 9q 31'de bulunur (5). ABCA1 genindeki mutasyonlar daha sonra karaciğer ile dokular arasında HDL'ye bağlanan kolesterolün taşınma bozukluğu olan Tangier Hastalığı 'nın etkeni olarak bulunmuştur (6,7). Tangier hastalığının klasik semptomlarını göstermeyen HDL seviyesi düşük hastalarda da ABCA1 mutasyonları gözlenmiştir (8).

ABCA1'in kolesterol taşınmasındaki önemli rolünden dolayı pek çok grup ABCA1 gen polimorfizminin plazma lipid seviyeleri ve kardiovasküler hastalıklarla ilişkisini incelemiştir. Farelerde yapılan bir araştırmada ABCA1 genindeki bozulma ya da ABCA1 geninin çıkarılmasının düşük HDL seviyeleri ile dokularda kolesterol birikimine yol açtığı görülmüştür (9). Bu bilgiler ışığında ABCA1 proteini karbonhidrat ve lipid

metabolizmasıyla ilişkilidir. Bu çalışmada ana amaç Trabzon bölgesinde bu genin polimorfizm profilini ortaya çıkarmaktır. Metabolik sendrom ve onunla ilişkili diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler problemlerin izlenmesi ve erken safhada tespiti için ABCA1 proteininin polimorfizminin ortaya çıkarılması önemli ip uçları sağlayacaktır. Ayrıca ilaç tedavisi programlarında yarar sağlayacağına inanılmaktadır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Metabolik Sendrom**

#### **2.1.1. Metabolik Sendromun Tarihçesi**

Metabolik sendrom (MS), kısaca koroner kalp hastalığı risk faktörlerinin bir arada bulunduğu kompleks bir hastalıktır. Metabolik sendrom ifadesi ilk olarak yaklaşık 80 yıl önce belirmiştir. 1923'te İsveçli bir hekim olan Kylin hipertansiyon, hiperglisemi ve gut'un oluşturduğu bir grubu tanımladı (9). 1947'de Vague, bir dönüm noktası belgesi, özel bir obezite fenotipi olan üst vücut, android ya da erkek tipi obezitenin tip II diyabet ve kardiyovasküler kalp hastalıklarıyla seyreden metabolik anormalliklerle ilişkili olduğunu rapor etti (10). Metabolik sendromun klinik önemi bundan yaklaşık 40 yıl sonra patofizyolojisinde başlıca insülin direncinin rol oynadığı metabolik anormallikler grubunun varlığını tanımlayan Reaven tarafından vurgulanmıştır ve Sendrom X diye adlandırılmıştır. Sürpriz olarak Reaven sonraki bütün raporlarına metabolik sendromla ilgili bir faktör olan obeziteyi dahil etmemiştir (11). Ayrıca metabolik sendrom'a İnsülin Direnci Sendromu ve Öldüren Dörtlü' de denmektedir (12).

#### **2.2. Metabolik Sendromun Tanımlanması ve Patofizyolojisi**

Metabolik sendromun tanımlanması üç farklı grup tarafından yapılmıştır. Bu üç grubun tanımlama kriterleri Tablo 1 'de verilmiştir.

Tablo 1. Metabolik Sendromun tanımlanması (8)

WHO 1999	EGIR 1999	ATP III 2001
Diabet ya da bozulmuş glukoz toleransı ya da insülin direnci	İnsülin direnci ya da hiperinsülinemi (diabet olmayan kişilerde)	Aşağıdakilerden üç ya da daha fazlası:
İlaveten aşağıdakilerden iki ya da daha fazlası:	Bunun yanında aşağıdakilerden iki ya da daha fazlası	1. Sentral obezite: Bel çevresi >102 cm (Erkek); >88cm (Kadın)
1. Obezite : BMI>30 kg/m <sup>2</sup> ya da WHR>0,9 (Erkek), 0,85 (Kadın)	1. Sentral obezite : Bel çevresi ≥ 94 (Erkek); ≥ 80 (Kadın)	2. Hipertrigliseridemi: Trigliserit ≥150mg/dl
2. Dislipidemi : Trigliserit ≥ 150mg/dl ya da HDL-K 35 mg/dl (Erkek); 39 mg/dl (Kadın)	2. Dislipidemi : Trigliserit >177mg / dl ya da HDL-K < 39 mg / dl	3. Düşük HDL-K : <40mg/dl (Erkek) <50mg/dl (Kadın)
3. Hipertansiyon : Kan basıncı ≥ 140/90 mmHg ya da ilaç kullanımı	3. Hipertansiyon : Kan basıncı ≥ 140/90 mmHg ya da ilaç kullanımı	4. Hipertansiyon : Kan basıncı ≥ 130/85mmHg ya da ilaç kullanımı
4. Mikroalbuminüri : Albumin salgısı ≥ 20µg/dak ya da Albumin / kreatinin oranı ≥ 30mg /gün	4. Açlık glukozu ≥110mg/dl	5. Açlık plazma glukozu ≥ 110mg/dl

WHO : Dünya Sağlık Örgütü, EGIR : Avrupa İnsülin Direnci Çalışma Grubu, ATP III : Erişkin Tedavi Paneli III

Uluslararası Diabet Federasyonu (IDF) 'nin dünya genelinde metabolik sendrom tanımlaması ise şöyledir:

1. Abdominal obezite
2. Bel Çevresi – Etnik dağılım (Tablo-2).  
Ek olarak aşağıdakilerden iki ya da daha fazlası
  - 1- Artmış trigliserid seviyesi  
≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/l)  
Ya da ilaç kullanımı
  - 2- Azalmış HDL-K seviyesi  
< 40 mg/dl (1.03 mmol/l) erkeklerde  
< 50 mg/dl (1.29 mmol/l) kadınlarda  
Ya da ilaç kullanımı
  - 3- Artmış kan basıncı  
Sistolik : ≥ 130 mmHg  
Diastolik : ≥85 mmHg

### Ya da ilaç kullanımı

#### 4- Artmış AÇLIK Plazma Glukoz Seviyesi

≥ Açlık plazma glukozu : 100 mg/dl

Ya da daha önce konmuş tip II diabet tanısı

Eğer 5.6mmol/l ya da 100 mg/dl'nin altında ise OGTT mutlaka gereklidir; ancak sendrom tanısı konmuşsa buna gerek yoktur.

Tablo 2. Bel Çevresinin Etnik Dağılımı

Etnik Grup	Bel Çevresi (Abdominal obezite olarak ölçülen)
Avrupalılar	Erkek ≥ 94 cm Kadın ≥ 80 cm
Güney Asyalılar	Erkek ≥ 90 cm Kadın ≥ 80 cm
Çinliler	Erkek ≥ 90 cm Kadın ≥ 80 cm
Japonlar	Erkek ≥ 85 cm Kadın ≥ 90 cm
Etnik güney ve Orta Amerika	Daha spesifik veriler elde edilene kadar Güney Asyalılarla aynı ölçüler kullanılacaktır.
Alt Sahra Afrikalıları	Daha spesifik bilgiler elde edilinceye kadar Avrupalılarla aynı ölçüler kullanılacaktır.
Doğu Akdeniz ve Orta Doğu (Arap)	Daha spesifik veriler elde edilinceye kadar Avrupalılarla aynı ölçüler kullanılacaktır.

Metabolik sendromun altında yatan sebepler tam olarak bilinmemekle beraber ; başlıca sebep insülin direncidir..

### 2.2.1. İnsülin Direnci

İnsülin Direnci, insüline cevabın olmaması durumudur. Bu durum kas, yağ ve karaciğer dokularına glukozun girememesine yol açar. Karaciğer daha fazla glukoz üretir



ve hiperglisemi ortaya çıkar. Pankreas da daha fazla insülin üretir ve hiperinsülinemi oluşur.

İnsülin direncinin sebepleri arasında başlıca metabolik sendrom, obezite, hamilelik, çeşitli hastalıklara bağlı enfeksiyonlar, stres ve steroid kullanımı sayılabilir.

İnsülin direncinin gelişiminin altında yatan başlıca neden dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin aşırı birikmesidir. Plazmadaki albümine bağlı serbest yağ asitleri, c-AMP bağımlı enzim olan hormona duyarlı lipazın etkisi sonucu adipoz dokudaki trigliserit depolarından salınırlar (13). Ayrıca serbest yağ asitleri lipoprotein lipaz enziminin etkisi sonucu trigliseridce zengin dokulardan lipoliz sonucu açığa çıkarlar (14). Kas dokusunda serbest yağ asitleri, protein kinaz C- $\lambda$  ve protein kinaz C- $\zeta$  'nın aktivasyonunu bozabilir (15). İnsülin direnci kötü kardiyovasküler prognozla koroledir. Hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisi, kardiyovasküler otonomik bozukluklar ve endotel fonksiyon bozukluğu gibi çeşitli hemodinamik değişiklikler insülin direnciyle ilişkilidir (16). Glukoz metabolizmasında insülinin etkisinde bozulma olması, hormonun böbrek ve karaciğer dokuları tarafından glukoz üretme yeteneğinde azalmasına neden olur.

İnsülin direnci ve yağ dokusunda artış, tip II diyabet patogenezinde işbirliği içinde görülürler. İnsülin direncinde bir yandan plazma lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesi azalıp plazma trigliserit seviyesi artarken, bir yandan da karaciğerde LPL aktivitesinin artması nedeniyle HDL 'nin yıkımı hızlanır (17).

İnsülin direncinde serbest yağ asiti (SYA) seviyesi artmıştır ve SYA'lar karaciğerde trgliserid birikmesini uyarır. Normal insülin etkisi, insülinin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanıp, reseptörün intrensek tirozin kinaz aktivitesini başlatmasıyla gerçekleşir. SYA'lar hem kas dokusunda glukoz alımını azaltmak hem de karaciğerden glukoz çıkışını artırmak yönünde insülin karşıtı etkiler göstermektedir. Her iki dokuda da SYA'ların hücrede açıl koenzim A(CoA) türevlerinin miktarını artırdıkları ve artan açıl CoA 'nın da normal tirozin fosforilasyon kaskadına karşı çalışan serin kinaz moleküllerinin etkisini artırdığı anlaşılmıştır (18). Obez bireylerde ektopik adipoz doku açıl CoA moleküllerinin önemli kaynağıdır (19).

### 2.2.2. Obezite

Metabolik sendromun en önemli bileşeni obezitedir. Fakat normal kilolu insanlarda da insülin direnci olabilir (20).Metabolik sendromlu bireylerin yaklaşık % 60'ı obezdir. Metabolik sendromluların pek çoğunda bel çevresi artmıştır (21).

Abdominal obezite, metabolik ve kardiyovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir. Obezitenin klinik olarak tanısı Vücut Kütle İndeksi (BMI) 'nin 30 'dan daha büyük olmasıyla tanımlanır. Obezite kardiyovasküler, endokrin, renal, pulmonar, gastrointestinal ve iskelet kas sistemini içeren pek çok organ sistemini etkiler ve tip II diyabet, hipertansiyon, obstrüktif uyku apnesi, inme, kalp hastalığı, böbrek hastalığı, dejeneratif eklem hastalığı, venöz hastalıklar ve pek çok kanser türü ile ilişkilidir.

Viseral yağ dokusu metabolik aktif bir organdır.Viseral yağ dokusundaki adipositler, deri altı yağ dokusundaki adipositlerden farklıdır; viseral yağ ve makrofajların pre-adipositleri arasında pek çok fenotipik benzerlikler vardır. Viseral yağdaki makrofajların aslında pre-adipositlerden kaynaklandığına inananlar vardır. Bazıları da pre-adipositler ya da adipositlerin makrofajları viseral yağda toplayan kemoatraktan proteinleri saldığına inanır. Viseral yağlar sitokinleri üreten inflamatuvar hücreler tarafından yoğun bir şekilde infiltre edilirler. Viseral yağ kaynaklı sitokinlerden tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), yerel glukoz alımını etkiler, yerel insülin direncini kısıktırır ve vasodilatasyon kapasiteyi bloke eder ve böylece yerel endotel fonksiyon bozukluğu olan bir alan yaratılır (22).

### 2.2.3. Aterosklerotik Dislipidemi

Genelde SYA'ların karaciğere akışındaki artışla beraber apo B içeren trigliseridce zengin VLDL 'de artış olur (23). Metabolik sendromda bir diğer karışıklık ise HDL-K'daki azalmadır. Hipertrigliseridemi olması halinde HDL'nin kolesterol bileşimindeki bir azalma, kolesterol ester transferaz proteininin fonksiyonuyla trigliseriddeki artışlarla beraber lipoprotein çekirdeğin kolesterol ester bileşiminin azalmasıyla sonuçlanır (24). Lipoprotein kompozisyonundaki bu değişim HDL'nin dolaşımdan temizlenmesinde artışla sonuçlanır (13).

LDL seviyelerindeki ve trigliserid miktarındaki artışlarda kardiyovasküler hastalık riskini artırır.

#### 2.2.4. Hipertansiyon

İnsülin direnci ve hipertansiyon arasındaki ilişki iyi bir şekilde tanımlanmıştır, (25) ve pek çok farklı mekanizmaya bağlıdır. İlk olarak insülin normal kilolu kişilere intravenöz olarak verildiğinde vazodilatör etki yapar (26); ikincisi böbreklerde sodyumun geri emilimi üzerinedir (27) Metabolik sendromlu beyaz bireylerde sodyumun böbreklerden geri emilimi artmıştır (28). Obezitede değişen leptin seviyesi de kan basıncını artırır.

Kemirgenlerde yağ asitlerinin portal ven'e infüzyonu sempatik sinir sistemini aktifleştirerek kan basıncını yükseltmiştir (29)

#### 2.2.5. Diğer Belirtiler : Proinflamatuvar Sitokinler

Metabolik sendrom ile kronik inflamasyon arasındaki ilişki belirlenmiştir. Diğerlerinin arasında hs-RP, TNF- $\alpha$ , fibrinojen ve IL-6 metabolik sendrom ile ilişkili inflamatuvar belirteçlerdir. İnflamasyon ve metabolik sendrom arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammıştır. Varsayılan bir mekanizma hepatik CRP'nin uyarılması sonucu bu sitokinlerin yağ dokusundan dolaşıma salındığıdır. Protrombik molekül plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) seviyesi de metabolik sendromda artmıştır (30). İnterlökin 6 (IL 6), tümör nekroz faktör - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve C-reaktif protein (CRP) 'i içeren proinflamatuvar sitokinlerindeki artış, genişlemiş yağ dokusundaki aşırı üretimi yansıtır (31). Deliller göstermiştir ki, monosit kaynaklı makrofajlar ve yerel olarak ya da sistemik dolaşımda üretilen proinflamatuvar sitokinlerin önemli bir kısmı, yağ dokusundan gelmektedir (32). Karaciğer, yağ ve kas dokusundaki insülin direncinin sadece proinflamatuvar sitokinlerin bolluğuyla ilişkili değil aynı zamanda bu yükün bir sonucu olduğunu dair deliller artmaktadır (33). Yağ dokusu kütlesi arttıkça CRP seviyeleri de artmaktadır (34).

Bunların yanında Metabolik Sendromun altında yatan metabolizmalar tam olarak bilinmemektedir, bununla beraber insülin direnci metabolik risk faktörlerine biyokimyasal cevapları düzenlemek için glukoz alımını uyarır. (9,35). Son zamanlarda metabolik sendromla akut faz cevabın çeşitli yönleri örneğin ; fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 seviyeleri, tüm kan viskozitesi, beyaz kan hücresi sayısı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (36). Ayrıca CRP seviyeleri de BMI ile dolayısıyla da metabolik sendromla ilişkili bulunmuştur.

### 2.2.6. Adiponektin

Adiponektin özellikle yağ dokusunda üretilen bir plazma proteindir. Anti-inflamatuar bir plazma proteindir. Adiponektin hem insülin duyarlılığını artırır, hem de inflammatuar sürecin pek çok basamağını inhibe eder (37). Karaciğerde endojen glukoneojenik enzimleri inhibe etmenin yanında endojen glukoz üretim oranını da azaltır. (16,38). Kasta, glukoz transportunu artırır ve yağ asiti oksidasyonunu ve AMP-kinaz aktivasyonuna bağlı etkileri yükseltir. Plazmadan serbest yağ asitlerinin, glukozun ve trigliseritlerin temizlenmesini kolaylaştırır (39). Ayrıca hasarlı damarların duvarında birikerek aterogenez sürecinde önemli olan inflamatuvar mediatörlerin olumsuz etkilerini engeller. Adiponektin düzeyi obez bireylerde azalmıştır ve adiponektin seviyesinin regülasyonu deri altı yağ dokusundan çok omental yağ dokusundan yapılmaktadır (40).

### 2.2.7. Leptin Direnci

Metabolik sendromu açıklamak için bir başka kavram da leptin direncidir. Leptin hormonu, beyaz yağ dokusundan salgılanır ve serum leptin seviyesi yağ dokusu kitlesiyle koreledir. Genel olarak leptin eksikliği ya da direnci olduğu durumlarda non-adipöz organlarda trigliserit birikmesi olur (41). Bu patofizyoloji, leptin tarafından sterol response element binding protein 1c (SREBP 1c) 'nin down regülasyonunun olmaması ve /veya kasta aktif AMP-kinaz üzerinde etkili olmamasıyla bağlantılı olabilir (42). Leptin insülin sekresyonunu azaltır ancak; leptin direnci diabetin gelişmesine yol açan insülin salınımındaki defekten önce metabolik sendromun oluşumunda gelişen hiperinsülinemi ile ilişkilidir (43).

## 2.3. ABC Transporter Proteinleri

ATP bağlayıcı kaset (ABC) transporter süperailisi, metabolik ürünler, lipidler, steroller ve ilaçlar gibi pek çok substratı hücre içi ve hücre dışı membranlar arasında taşıyan membran proteinlerini içerir. Kanser hücre hatlarında ve tümörlerde bazı ABC taşıyıcıların aşırı üretilmesi multidrug direncine (MDR) sebep olur (44). Amino asitleri, iyonları, peptidleri, şekerleri, vitaminleri ve steroid hormonları membranda taşınır (45). Bu proteinler ATP'ye bağlanırlar ve enerji kullanırlar (46). Proteinler ATP bağlayıcı

domainlerinin (Nükleotid bağlayıcı katlanmalar = NBF's), dizilişine ve organizasyonuna bağlı olarak sınıflandırılırlar. NBF'ler bütün ATP bağlayıcı proteinlerde olduğu gibi 90-120 amino asit tarafından birbirinden ayrılan karakteristik bir motif (Walker A ve Walker B dizilişi) içerirler. ABC genleri ayrıca Walker B motifinin hemen üzerinde yerleşmiş bir 'imza' motifi (C) de içerirler (47). Fonksiyonel protein iki NBF ve iki transmembran (TM) domaini içerir. TM domainleri, membranı boydan boya geçen ve substratlar için spesiflik sağlayan 6-11 adet  $\alpha$ -heliks dizilişi içerirler. NBF'ler sitoplazmada yerleşiktirler ve substratı membran boyunca taşımak için enerjiyi transfer ederler. ABC pompaları çoğunlukla tek yönlüdürler. Bakterilerde difüzyonla alınamayan şeker, vitaminler, metal iyonları gibi hayati bileşenlerin hücre içine alınmasında önemli rol oynarlar (44).

### 2.3.1. ABC Genleri

Ökaryotlarda, pek çok ABC geni bileşenleri sitoplazmadan hücre dışına ya da hücre içi kompartmanlara (endoplazmik retikulum, mitokondri peroksizom) hareket ettirirler. ABC genleri iki TM domaini ve iki NBF içeren tam transporterler ya da yarı transporterler olarak organize olurlar. ABC genleri türler arasında oldukça korunmuştur. İnsan ABC genleri 7 alt gruba ayrılırlar ve bilinen 48 proteini kodlarlar (Tablo 3).

Tablo 3. ABC Taşıyıcı Ailesi (44)

Sembol	Diğer Adı	Yerleşimi	Fonksiyonu
ABCA1	ABC1	9q31.1	HDL üzerine kolesterol taşınımı
ABCA2	ABC2	9q34.3	İlaç direnci
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	surfaktant salınımı?
ABCA4	ABCR	1p21.3	N-Retinylidien-PE-taşınımı
ABCA5		17q24.3	
ABCA6		17q24.3	
ABCA7		19p.13.3	
ABCA8		17q24.3	
ABCA9		17q24.3	
ABCA10		17q24.3	
ABCA12		2q34	
ABCA13		7p12.3	
ABCB1	PGY1, MDR	7q21.12	Multidrug rezistansı
ABCB2	TAP1	6p21.3	peptide taşıma
ABCB3	TAP2	6p21.3	peptide taşıma
ABCB4	PGY3	7q21.12	PC taşıma
ABCB5		7p21.1	
ABCB6	MTABC3	2q35	demir taşıma
ABCB7	ABC7	Xq21-q22	Fe/S cluster taşınması
ABCB8	MABC1	7q36.1	
ABCB9		12q24.31	
ABCB10	MTABC2	1q42.13	
ABCB11	SPGP	2q24.3	Bile tuz taşınımı
ABCC1	MRP1	16p13.12	İlaç direnci
ABCC2	MRP2	10q24.2	Organik anyon salınımı
ABCC3	MRP3	17q21.33	İlaç rezistansı
ABCC4	MRP4	13q32.1	Nükleosit taşınımı
ABCC5	MRP5	3q27.1	Nükleosit taşınımı
ABCC6	MRP6	16p13.12	
ABCC7	CFTR	7q31.31	Klorür iyon kanalı
ABCC8	SUR	11p15.1	Sülfonil üre reseptörü
ABCC9	SUR2	12p12.1	K(ATP) kanal düzenlenmesi
ABCC10	MRP7	6p21.1	
ABCC11		16q12.1	
ABCC12		16q12.1	
ABCD1	ALD	Xq28	VLCFA taşınımı düzenlenmesi
ABCD2	ALDL1, ALDLR	12q11	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22.1	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	
ABCE1	OABP, RNS4	4q31.31	oligoadenilat bağlayan protein
ABCF1	ABC50	6p21.1	
ABCF2		7q36.1	
ABCF3		3q27.1	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	kolesterol taşınımı
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Toksin salınımı, ilaç direnci
ABCG4	White2	11q23	
ABCG5	White3	2p21	sterol taşınımı
ABCG8		2p21	sterol taşınımı

### 2.3.2. ABCA Alt Ailesi

ABCA Alt ailesi, 12 full transporterden oluşur ve filogenetik analizler ve intron yapısına göre iki ana alt gruba ayrılır. Birinci grup altı farklı kromozoma dağılan yedi geni içerirken (ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCA12, ABCA13) ; ikinci grup 17q24 kromozomunda bir kümesinde bulunan beş geni içerir (ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9, ABCA10). ABCA alt ailesi ABC genlerinin çoğunu içerir, bunların pek çoğu 2100 amino asit uzunluğundadır. Bu alt ailenin iki üyesi ABCA1 ve ABCA4 yoğun olarak çalışılmıştır (44).

#### 2.3.2.1. ABCA1 Geni

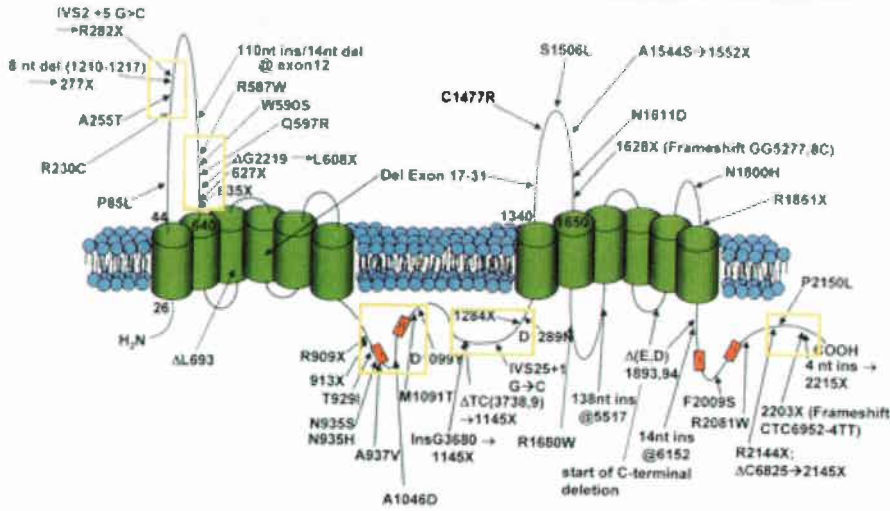
ABCA1 geni 9. kromozomda (9q31) yer alır (44). 6783 baz çiftinden oluşur ve 2261 amino asitten oluşan 220 kDa 'luk bir protein ürünü vardır (45). Translasyon bölgesi 2. exonda bulunur. ABCA1 geni genomik dizinin 149 kb 'ını kapsayan 50 exondan oluşur (44). Promotor bölgesi, lipid metabolizmasında rol oynayan transkripsiyon faktörleri için multiple bağlanma bölgeleri içerir (48,49).

ABC genlerinin pek çoğu çeşitli türlerde (insan, fare, rat ve sığır) klonlanır, ABCA1'e en yakın homoloğu tavuklarda bulunmuştur (50). Yakın geçmişte ABCA1'in genomdaki yerine ait fare ve insan çalışması, ABCA1'in upstream bölgesindeki (farede 87 kb, insanda 34kb) genleri tanımlamayı başaramadı; ancak insanda tanımlanan bir gen ve farede tanımlanan iki gen ABCA1 'in karşı yerleşiminde kodlanırlar ve ABCA1 'in poliadenilat bölgesine oldukça yakındırlar. Bunlar hSNAP, mSNAP1 ve mSNAP2 'dir. hSNAP ve mSNAP1 nispeten ABCA1'in 9kb ve 8 kb downstreamında yer alır (51).

#### 2.3.2.2. ABCA1 Genindeki Mutasyonlar

ABCA1 geninde en azından 50 mutasyon saptanmıştır (52,53,54). Bunların 23'ü missense, 6'sı nonsense ve 21 tanesi de insertion ya da delesyon şeklindedir. Exonlarda bildirilen 50 mutasyon mevcuttur (Şekil 1). İntron 2 'deki bir mutasyon, exon 2 ya da exon 4 ya da her ikisinin birden eksikliğinde anormal spliced transkriptlere yol açar (55).





Şekil 1. ABCA1 proteinindeki mutasyon bölgeleri (58)

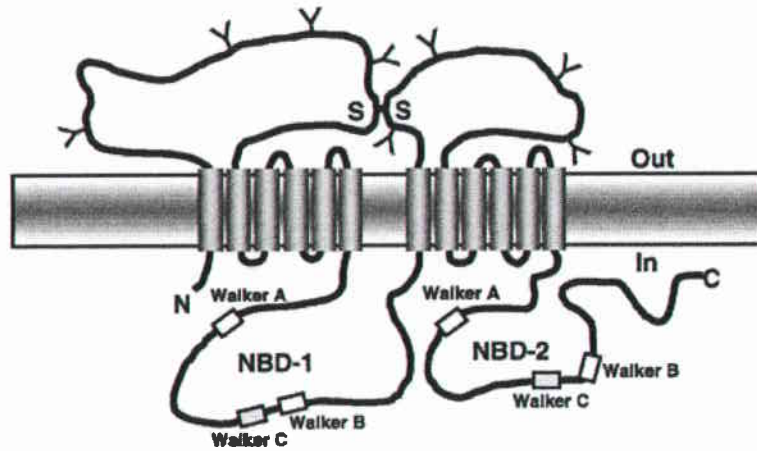
Mutasyonlar gen boyunca meydana gelmesine rağmen, ABCA1 'deki mutasyonlar rastgele dağılmamıştır. Dört mutasyon grubu 230 ve 280. aa'ler arasında, altısı 587-635. rezidüler arasında sekiz tanesi 909 ile 1099. aa'ler arasında, 5 'i 1145 ve 1289, 5'i de 2144 ve 2215. rezidüler arasında bulunur. Bunun aksine olarak büyük bir delesyonun dışında transmembran bölgede 636 ile 908. rezidüler arasında sadece bir mutasyon olur ve transmembran domainin ikinci bölümünde mutasyon yoktur. ABCA1 genindeki missense mutasyonların neredeyse yarısı iki ektesellüler loop'a düşer. Birinci ve ikinci ekstrasellüler loop'daki mutasyonların, ABCA1'in apolipoprotein A-I ile bozulmuş etkileşiminden kaynaklanan lipid eflüksünde azalmayla sonuçlanır çünkü lipidce fakir pre-β HDL lipid transferi için ABCA1 ile direkt etkileşime gereksinim duyarlar. ABCA1 'in 1477. pozisyonunda bulunan sisteinin arginine dönüşmesi (52) lipid eflüksü için gerekli 3-boyutlu yapı için katlanmasını bozar. İki çalışma göstermiştir ki ABCA1 'in hücre dışı loop'unda meydana gelen Q597R nokta mutasyonu proteinin plazma membranına yerleşmesini bozar (56,57).

### 2.3.3. ABCA1 Proteininin Yapısı

İnsan ABCA1 'başlıca plasenta, karaciğer, akciğer, adrenal glandlar, dalak ve fetal dokularda üretilir (59). 2261 amino asitten oluşan bir proteini vardır. Bu orijinal olarak tanımlanandan 60 aa daha fazladır (60). +1 ve +61 metiyoninlerinin her ikisi de bir protein üretirler ancak; yalnız birinci metiyoninden translasyon aktif bir protein üretir (61,62). Daha kısa olan ürün, muhtemelen daha önemli bir katlanma için ER'de tutunur.

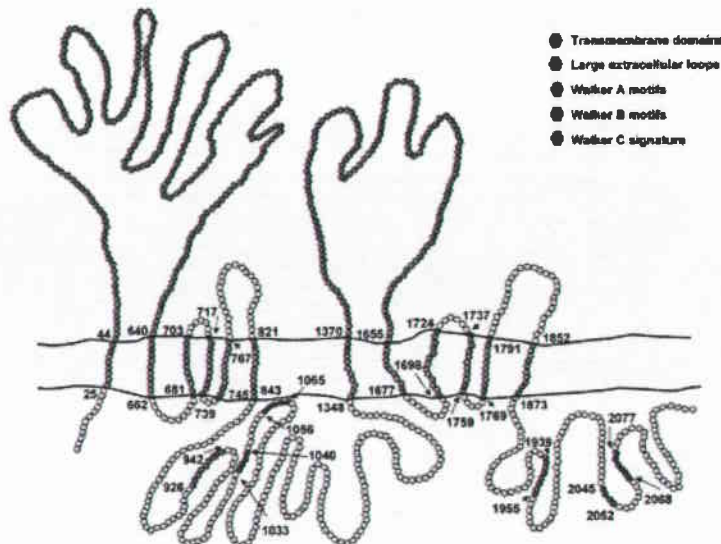


ABCA 1 proteini iki tane, nükleotid bağlayıcı katlanmalar olarak da bilinen (NBFs), ATP bağlayıcı domaine sahiptir ve bu domainler 3 adet karakteristik olarak korunmuş, birbirinden yaklaşık olarak 90 -110 aa uzaklıkta bulunan WalkerA ve WalkerB motifleriyle WalkerB bölgesinin hemen ilerisinde bulunan bir imza (signature) C motif içerirler (63,64). ABCA1 iki büyük ekstrasellular loop içerir Bunlardan ilki, ikinci transmembran domain ve diğer takip eden hücre içi NBF1 domaini arasında bulunur (61,65), (Şekil 2).



Şekil 2. ABCA1'in topolojik modeli. Bu modelde S-S tek tayin edilen disülfid bağı; Y ise muhtemel glikozilasyon bölgelerini gösterir. (64)

ABC transporterler ayrıca her biri genellikle 6  $\alpha$ -heliks 'den oluşan ve substrat özgüllüğü sağlayan bir ya da iki transmembran domain içerir (66). (Şekil-3)



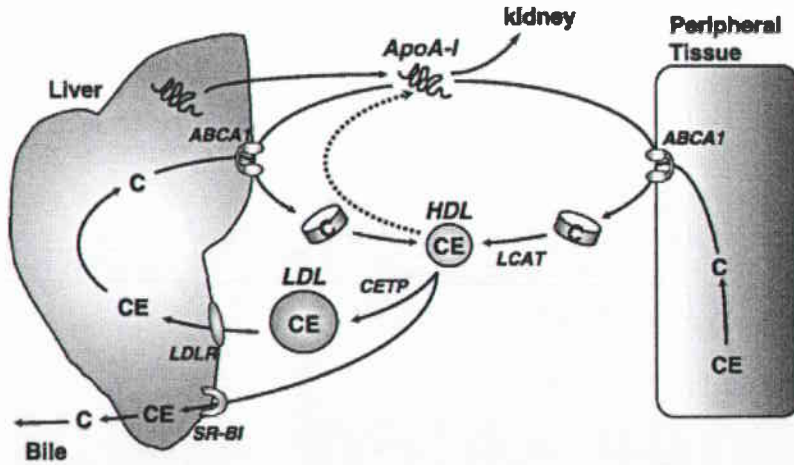
Şekil 3. ABCA1 proteininin yapısı (58)

ABCA1 proteini C- terminal PDZ (Postsinaptik density protein, disk large, zonula occludens) bağlayıcı domain de içerir ki bu bölge mutasyona uğrarsa protein membrana yanlış yerleşir.

ABCA1 genindeki mutasyonlar Tangier Hastalığı (TD) ve ailesel hiperalfalipoproteinemi (FHA) yol açar.

### 2.3.4. ABCA1 Proteininin Fonksiyonları

ABCA1 membran fosfolipidleri ve kolesterolün özel alıcılara geçmesini kontrol eder; ancak bu süreçteki rolü tam olarak bilinmemektedir (67,68). ABCA1, HDL partiküllerine bağlı kolesterolün karaciğer ile dokular arasında taşınmasının bozukluğu olan Tangier Hastalığına sebep olan genidir (69). Ayrıca ailesel hipoalfalipoproteinemili (FHA) hastalarda ABCA1 geni mutasyona uğramıştır (7). ABCA1 başlıca posfotidilkolin (PC) olan membran fosfolipidlerini lipidce fakir, yeni sentezlenen kolesterolü alabilen apolipoprotein partiküllerine taşır (66). ABCA1 HDL'nin başlıca apolipoproteini olan apo A1'e hücre içi kolesterol geçişini kontrol eder (70), (Şekil 4).



Şekil 4. ABCA1-aracılıklı ters kolesterol taşınımı modeli. Lipid içermeyen apoA-1 karaciğer tarafından üretilir ve karaciğer ve periferel hücrelerden yeni sentezlenen HDL'yi oluşturmak üzere serbest kolesterol ve fosfolipid alır. Lipidsiz apoA-1 böbrek tarafından temizlenir. Yeni sentezlenen HDL kolesterol esterleştirici enzim lizolesitin : kolesterol açil transferaz (LCAT), ve kolesterol esterleri SR-B1 tarafından karaciğere ve kolesterol ester transfer protein (CETP) tarafından diğer lipoproteinlere transfer edilir.LDL partiküllerinin LDL reseptörü (LDLR) tarafından hücre içine alınmasından sonra LDL kolesterol esterleri hepatositlere dağılır. Lipoprotein kaynaklı kolesterol esteri, karaciğerde kolesterole hidrolizlenir, bu kolesterol ya ABCA1 yoluna geri döner ya da kolesterol ya da safra asiti olarak safraya sekrete edilir; ya da dolaşımdaki lipoproteinlere gitmek üzere yeniden bir araya toplanırlar. CETP, hepatik lipaz ve fosfolipid transfer protein tarafından olgun HDL 'nin yeniden düzenlenmesi lipidi tükenmiş apoA-1'i yeniden oluşturur. (64)

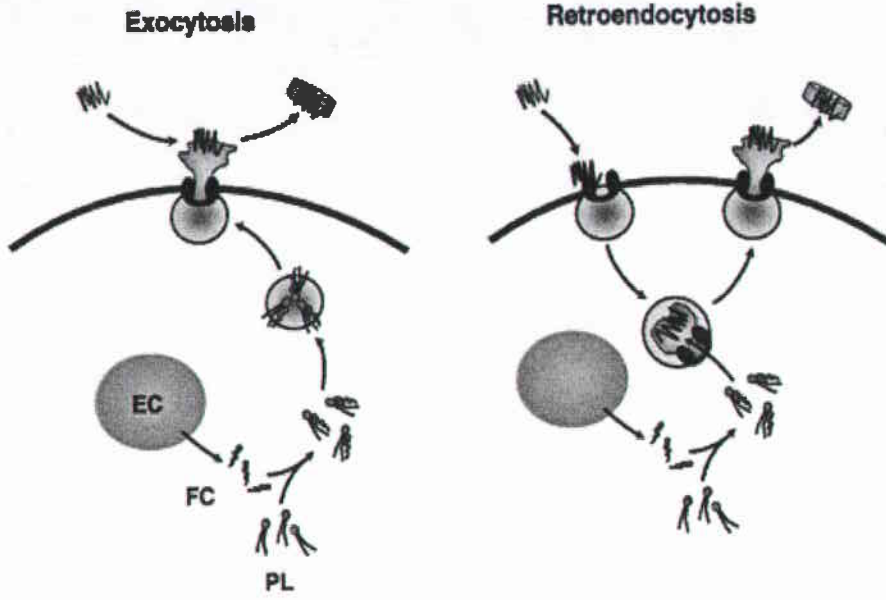
ABCA1 apoptotik yapıların makrofajlar tarafından yutulmasında da rol oynar (71). ABCA1'in ekspresyonu sadece steroller tarafından değil; retinoid X reseptörüyle heterodimerleşen safra asit reseptörü ve oksisterol reseptörü gibi nükleer hormon reseptörleri tarafından da indüklenir (72).

Kolesterol transportundaki önemli rolünden dolayı pek çok grup plazma lipid seviyeleri ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği için ABCA1 polimorfizmini incelemiştir. ABCA1 fonksiyonundaki artış ya da azalma, plazma membranında fosfatidil kolin (PS) 'in membranın dış yaprağından iç yaprağına fırlatılmasında azalma ya da artışla korreledir. ABCA1 serbest kolesterol ve fosfolipidleri efluks için hücre yüzeyine taşımada gerekli moleküler bir pompadır (52,69). HDL'nin biyogenezinde görev yapar. Hücre sel fosfolipid ve kolesterolün apolipoproteinlere efluksunu kolaylaştırarak HDL'nin olgunlaşmasına aracılık ettiği için pek çok organda sentezlenir. HDL-K'ün plazma seviyesinin %50'si genetik faktörler tarafından tayin edilir (70,73).

Steroller, özellikle de kolesterol merkezi sinir sisteminin önemli bileşenidir. Vücuttaki total kolesterolün %25'i beyinde bulunur (74). Beyin kapiller endotel hücreleri de ABCA1 sentezler ve hücrelerden kolesterol salınmasında rol oynar (75). Kan beyin bariyeri, beyinde sterol dengesinde önemli rol oynar. Sterol dengesindeki anormalliklerin Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

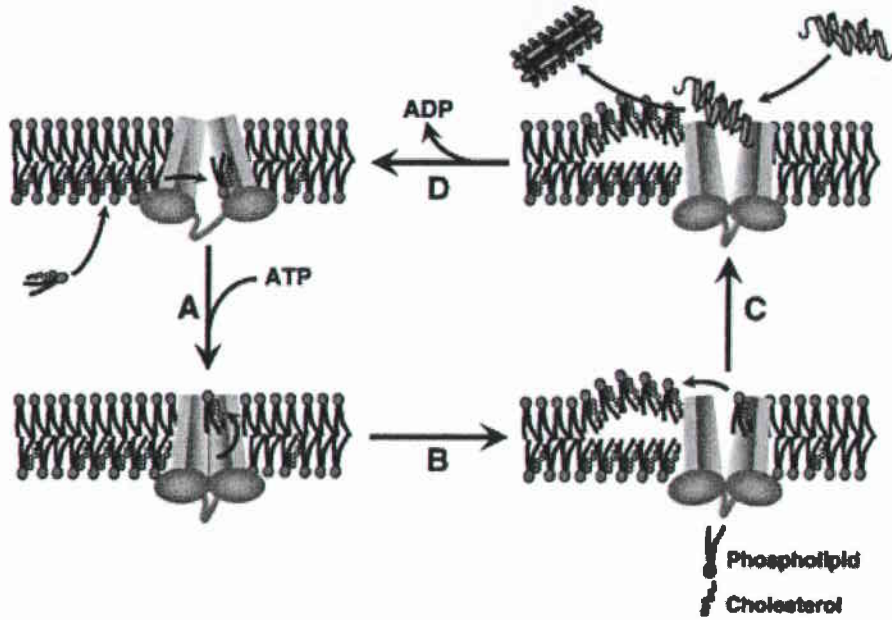
ABCA1'in aynı zamanda basal apoE sekresyonunda da rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (76).

Spesifik lipid domainlerine hedeflenen ABCA1'in nasıl çalıştığına dair iki model ileri sürülmüştür (Şekil-5). Ekzositoz modeli, aşırı hücre sel kolesterol, muhtemelen Golgi'de ABCA1 içeren plazma membranındaki domainlere geçen (translocate) taşıyıcı vezikül ya da raftlarda paketlenir. Bu model göstermiştir ki apolipoproteinlerin yokluğunda ABCA1'in indüksiyonu, hücre yüzeyinde kolesterolün görülmesini artırır. Retroendositoz modeli, göstermiştir ki ABCA1 ve apolipoprotein içeren veziküller, ABCA1'in lipidleri hücre dışına salınması için vezikül lümenine pompaladığı yer olan hücre içi lipid depolarına alınır (64)



Şekil 5. ABCA1 aracılıklı hücresel lipid trafiği ve sekresyonu modeli. Ekzositoz: lipid damlacıklarındaki esterleşmiş kolesterolün (EC) hidrolizinden açığa çıkan serbest kolesterol (FC), fosfolipidlerle (PL) bir araya gelirler ve muhtemelen golgi aparatında ABCA1 içeren domainleri (U-şeklindeki yapılar) plazma membranına taşıyan vezikülleri oluştururlar. Lipidler apolipoproteinlerle (karalama şeklindekiler) etkileştikleri plazma membranına taşınırlar ve yeni sentezlenen HDL 'yi (diskler) oluşturmak üzere hücreden uzaklaştırılırlar. Tersendositoz: apolipoproteinler ABCA1 ya da eşlik eden proteinlerle etkileşirler ve kolesterol ve fosfolipidlerin hücre içi depolarına ABCA1 ile beraber alınırlar. Lipidler, apolipoproteinlerle etkileşecekleri vesikül lümenine taşınırlar ve lipid-apolipoprotein kompleksi vezikülün plazma membranına geçişinden sonra hücreden salınır (64).

ABCA1'in konformasyonel değişimi NDB'lere bağlıdır (şekil 6).



şekil 6. Fosfolipidlerle beraber aşırı hücresel kolesterol membranın sitozolik yapraklarının içinde birikir ve açık nükleotid bağlayıcı domain'e lateral olarak taşınır (sol üst)., ATP'nin bağlanması, nükleotid bağlayıcı domainleri (NBDs) dimerleştirir, ardından lipidler yakalanarak membranın dış yaprağına fırlatılır (A basamağı) ATP'nin NBD'ler tarafından hidrolizi sonucu transmembran domainlerin konformasyonunu değiştiren bir ADP bağlı ara bileşik oluşur ve membranın dış yaprağındaki NDB açılır (B basamağı) .Lipidler hücre yüzeyindeki kolesterolce zengin domainlere geğerler ve orada yeni sentezlenen HDL'yi oluşturmak üzere apolipoproteinler tarafından alınırlar (C basamağı). ADP NBD'lerden ayrıldıktan sonra ABCA1'nin NDB'lerinin yapısı substrat alma konformasyonuna geri döner (D basamağı), (64).

### 2.3.5. ABCA1 Polimorfizmi (SNPs)

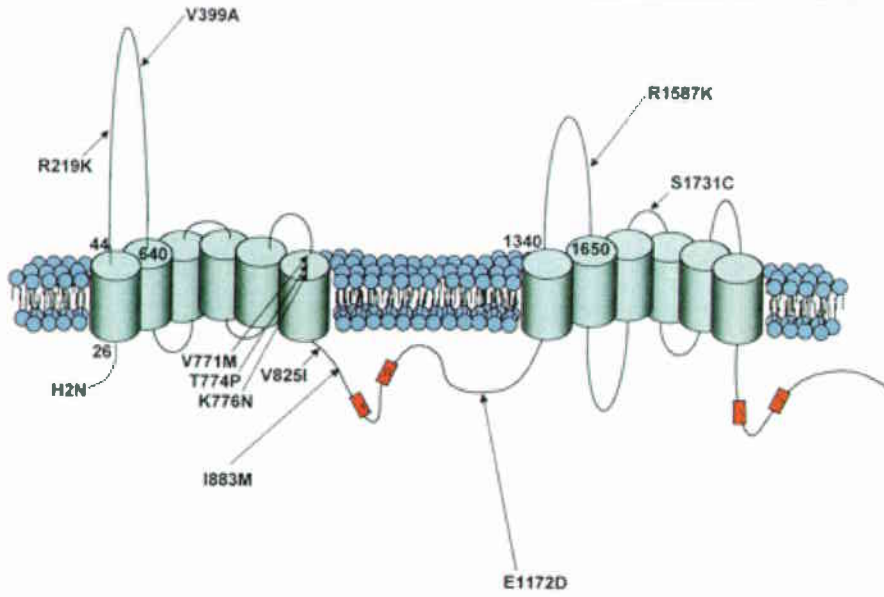
ABCA1 geninde yüzlerce kodlanmayan tek nükleotid polimorfizminin (SNP) arasında kodlanan 10 tek nükleotid polimorfizmi (cSNP) tanımlanmıştır (77,78,79), (Tablo 4).

Tablo 4. ABCA1 Genindeki Single Nucleotide Polymorfizmler (cSNPs). (58)

Nükleotit	Amino Asit	Ekson
-1095A/G	Promotör	...
-477C/T	Promotör	...
-419A/C	Promotör	...
-320G/C	Promotör	...
-191G/C	Promotör	...
C69T	5'UTR	1
C117G	5'UTR	1
InsG319	5'UTR	2
G378C	5'UTR	2
G1051A	R219K	7
T1591C	V399A	11
G2706A	V771M	16
A2715C	T774P	16
G2723C	K776N	16
G2826A	V825I	17
A3044G	I883M	18
G3911C	E1172D	24
G5255A	R1587K	35
C5587G	S1731C	38

Kodlanmayanlar arasında fonksiyonel önemi açısından analiz edilenler 9 promoter ve 5' UTR 'dir (79,80,81,82). cSNP 'lerin çoğu tanımlanan fonksiyonel bölgeye uzak bulunmuştur (Şekil 7). Bununla birlikte cSNP 'lerden zarar gören amino asitler, mutasyonlardan zarar görenlerle karşılaştırıldığında daha az korunmuştur (% 50, > % 95 ile karşılaştırıldığında (Tablo 5).





Şekil 7. ABCA1 genindeki cSNP 'lerin dağılımı (58)

Tablo 5. İnsandaki polimorfik amino asitlerin korunması (58)

cSNP	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
R219K	R	R	K	...	L
V399A	V	V	V	A	I
V771M	V	V	V	L	Y
T774P	T	S	S	S	G
K776N	K	K	K	K	R
V825I	V	V	A	M	L
I883M	I	V	P	R	A
E1172D	E	E	E	...	...
R1587K	R	K	K	E	V
S1731C	S	S	S	T	H

ABCA1'deki mutasyonların TD ve FHA'ya neden olduğu bulunmuştur ve genel populasyonda ABCA1'deki genel varyasyonların HDL-K ve aterosklerozdaki varyasyonlarda payı olabilir (77,78,83). Tanımlanan cSNP'lerin 6'sı, aterosklerozun ölçüsünü ya da lipid seviyelerinin değişimini içeren potansiyel fonksiyonel etkilerle ilişkilidir (Tablo 4).

R219K, V771M Vve I883M varyantları putatif antiaterojenik polimorfizmler olarak göze çarparlar çünkü, artmış HDL-K ve azalmış trigliserit seviyeleri (K219 ve M883) ve artmış HDL-K ve Apo AI (M771) ile koreledirler (77,78,84). E1172D, R1587K cSNP'lerinin HDL-K seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (78).

-191C/-320C/-477T haplotipleri ve G-191C ve A-1096G SNP'leri içeren beş promotör SNP aterosklerozun artmış şiddetiyle ilişkilidir. Aksine C-17G varyantı aterosklerozla daha az ilişkilidir (81). İlginç olanı SNP'ler lipid seviyelerindeki değişimlerle ilişkili değildir, ABCA1 aktivitesindeki değişim plazmadaki değişmeyen lipid seviyelerine etki etmez. V825I, I883M ve E1172D SNP'leri klinik olaylardaki ve aterosklerozun şiddetindeki artışla da ilişkilidir (78,83).

### 2.3.6. ABCA1 Polimorfizmi ve Hastalıklar

ABCA1 genindeki mutasyon Tangier Hastalığı'na neden olur, makrofajlarda ve periferik dokularda kolesterol birikmesi ve HDL eksikliği vardır. ABCA1 geni kolesterol taşınması bozukluğuna yol açar (77).

ABCA1 gen mutasyonları kalıtsal akciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli olabilir çünkü; oksisiterol tarafından aktive edilen surfaktanın bazolateral taşınmasında görev yapar (85).

ABCA1'deki mutasyonlar hiperalfalipoproteinemiye (FHA) yol açar (7).

Kan beyin bariyeri, beyinde sterol dengesinde önemli rol oynar. Sterol dengesindeki anormalliklerin Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (74).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Buzdolabı (Arçelik)

Buz Makinesi (Scotsman AF-10)

Cam Malzemeler

Deiyonize Su Cihazı (Barnstead)

Derin Dondurucu (-85 0C Ultra/sw Freezer,Nuaire)

Etüv (Gallenkamp)

Genetik Analizör (Perkin Elmer, ABI Prism Model 310 Version 3.4.1)

Güç Kaynağı (Thermo Electron Corporation EC 250-90)

Hassas Terazı (Oertling NA164)

Karıştırıcı (Autovortex Mixer SA2)

Mikrodalga Fırın (BEKO)

Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 18)

pH metre (HANNA Instrument 8416)

Santrifüj (Heraeus)

Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700 Aplıed Biosystem)

Thermomixer (eppendorf)

Transillüminatör (Wilber Lourmat)

#### 3.2. Deneyin Planlanması ve Numünelerin Toplanması

Metabolik Sendrom teşhisi alan hastalarda ABCA1 polimorfizmi belirlenmek üzere planlanmış bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Biyokimya AB.D ve İç Hastalıkları AB.D Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı tarafından yürütüldü. Çalışmaya alınan Metabolik Sendrom teşhisi almış bireyler KTÜ Tıp

Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Tarafından yürütülen “Trabzon İlinde Metabolik Sendrom Prevelansı ve Prevelansı etkileyen Risk Faktörleri” adlı Epidemiyolojik çalışmada taranan 2601 kadın, 2208 erkek toplam 4809 20 yaş ve üzeri birey arasından Ulusal kolesterol eğitim programı (NECP) 2001, erişkin tedavi paneli (ATP) III raporuna göre (10) metabolik sendrom tanı kriterleri olarak verilen, Abdominal obezite (Bel çevresi) (kadınlarda 88 cm’ den, erkeklerde 102 cm’ den fazla), yüksek trigliserit seviyesi (150 mg/dL den fazla), düşmüş HDL-K(kadınlarda 50 mg/dL’ nin altında erkeklerde 40 mg/dL’ nin altında), açlık kan şekeri (110 mg/dL ve üstünde), hipertansiyon (130/85 mmHg ve üstünde) beş kriterden beşinin de mevcut olduğu bireyler hasta grubu olarak (n=53), bu beş tanı kriterinin hiçbirini taşımayan bireyler kontrol grubu (n=48) olarak kabul edildi.

### **3.3. Otoanalizörde Çalışılan Parametreler**

Total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K, glukoz tayinleri Roche Modular otoanalizöründe, orijinal Roche kitleri kullanılarak yapıldı. Total kolesterol; kolesterol oksidaz metodu ile, trigliserid; gliserol fosfat oksidaz metodu ile ve glukoz; glukoz oksidaz metodu ile enzimatik kolorimetrik yöntemler kullanılarak ölçüldü. HDL-K tayini polianyon ve divalan katyonların kullanımı ile serumdaki apolipoprotein B içeren lipoproteinlerin suda çözünen kompleks oluşturmaları sağlanarak nispeten HDL kolesterole spesifik polietilen glikol ile modifiye edilmiş kolesterol oksidaz ve esteraz kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntemle yapıldı. LDL-K tayini ise LDL kolesterol haricindeki kolesterolün noniyonik deterjan ve şeker bileşenlerinin etkisi ile enzimatik reaksiyonu azaltılıp, LDL-kolesterolün kolesterol oksidaz ve esteraz ile reaksiyona girmesi sağlanarak, enzimatik kolorimetrik yöntemle yapıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

### **3.4. ABCA1 Dizi Analizi Çalışma Protokolü**

ABCA1 Dizi analizi çalışması, Applied Biosystems BigDye Cycle Sequencing Kiti kullanılarak yapıldı.

### 3.4.1. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tam kandan, Invitek, Invisorb DNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği:

- Patlatma tamponu A (25 ml)
- Bağlama tamponu A (15 ml)
- Elüsyon tamponu D (15 ml)
- Tampon EL (50 ml)
- Proteinaz K (1 ml)
- Yıkama tamponu I (30 ml)
- Yıkama tamponu II (18 ml)
- 2,0 ml. Toplama ependorfu (50 adet)
- 1,5 ml. Toplama ependorfu (50 adet)
- Ependorf filtresi (50 adet)

Çözeltilerin hazırlanması:

Proteinaz K: 1 ml distile su proteinaz K şisesine eklenir ve liyofilize haldeki enzim çözüldü. Çözülmüş haldeki proteinaz K +4°C'de 3 aya kadar saklanabilir. Daha uzun süreler için küçük aligotlara bölünerek -20°C'de saklandı.

Yıkama tamponu I: 30 ml % 99'luk etanol, yıkama tamponu çözeltisine eklendi.

Yıkama tamponu II: 42 ml %99'luk etanol, yıkama tamponu çözeltisine eklendi.

Deneyin yapılışı:

1. Hasta örneği sayısı kadar 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü işaretlendi.
2. 200 µl hasta serumu tüplere eklenir 350 µl Lysis Buffer A ve 25 µl Proteinase K eklendi, vortekslendi.
3. Tüpler 70 °C de 10-15 dakika bekletildi.



200 µl EDTA'lı Kan

+ 25 µl Proteinaz K

+ 350 µl Patlatma tamponu A

Vortekslendi, ve 70 °C de 10-15 dakika bekletildi.

4. Tüpler su banyosundan çıkarıldıktan sonra üzerlerine 200  $\mu$ l bağlama tamponu A eklendi ve tekrardan vortekslendi.



+ 200  $\mu$ l Bağlama Tamponu A,  
vortekslendi.

5. Tüplerin tüm içeriği ependorf filtresine aktarıldı, 1 dakika inkübasyona bırakıldı ve 12,000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi.



2 dakika 12.000 rpm

6. Kolonlar yeni toplama tüplerin yerleştirildi e ve üzerlerine 550  $\mu$ l yıkama tamponu çözeltisi (Wash Buffer 1) konulup 12,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.



+ 550  $\mu$ l Wash Buffer 1  
1 dakika 12,000 rpm

7. Santrifüj sonrası kolonlar tekrardan yeni toplama tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 550  $\mu$ l yıkama tamponu çözeltisi (Wash Buffer II) eklenip 12,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.



+ 550  $\mu$ l Wash Buffer  
1 dakika 12,000 rpm

8. Kolonlar son kez temiz toplama tüplerine konuldu ve 12,000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi.



2 dakika  
12,000 rpm

9. En son olarak kolonlar steril 1,5 ml 'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve üzerlerine 70 °C 'de ısıtılmış Elution Buffer D çözeltisinden 100 µl eklendi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 10,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.



+ 100 µl Elution Buffer (70°C)  
Oda sıcaklığında 3 dakika  
1 dakika 10,000 rpm

1. İzole edilen DNA örnekleri -20 veya -80°C' de saklandı.
2. Hazır olan DNA örnekleri çalışması yapılacak test öncesi eritildi ve PCR için hazırlandı.

#### 3.4.2. ABCA1 Ekson 7, Ekson 15, Ekson 19, Ekson 36, Ekson 41 ve Ekson 49 Gen Bölgelerinin PCR'(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Çoğaltılması

Taq polimeraz varlığında PCR'ı yapılacak DNA hedef bölgesinin laboratuvar ortamında hazırlanmış primerleri ile amplifikasyon, denatürasyon, primer bağlanma (annealing), sentez ve son sentez sıcaklığı döngüleri kullanılarak çoğaltılması prensibine dayanır.

**ABCA1 Eksonlarının primer dizileri**

Ekson 7 F: 5'- AAGGACCCAGCTTCCAATCTTC -3'

R: 5'- GCCTCACATTCCGAAAGCAT - 3'

Ekson 15 F: 5'- GGTC AATGCC CCTCTTCATG - 3'

R: 5'- GCTATTTTCGGAGTTTCCTGGC - 3'

Ekson 19 F : 5'- CTCCTGCCTGCCTGAGAAAC -3'

R : 5'- CCCTCCTGTGGCTGATTCTG - 3'

Ekson 36 F: 5'- TTTCTGAGGTTTATGGGCATGG – 3'

R : 5' – GAGCTGCTGCTTGGTGAGATT – 3'

Ekson 41 F : 5' - TTTTCCTTGTCATGGGTGATAGC – 3'

R: 5' – CAGGTGCTCCACGGGTTCTA – 3'

Ekson 49 F: 5' – GGGCCGCCCTTTTTCAT – 3'

R: 5' – TCGCTTTTTGCTCTGGGAGA – 3'

Çözeltilerin hazırlanması:

10x Taq DNA tamponu: 100 mM Tris (pH 9), 500 mM KCl, % 1 Triton X-100

Deneyin Yapılışı:

PCR için karışım içeriği;

Madde	Hacim (µl)
Taq DNA Tamponu (10x)	5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP	2
Forward primer (Ekson 16 veya 18)	2
Reverse primer (Ekson 16 veya 18)	2
Taq DNA polimeraz	0,5
ddH <sub>2</sub> O	26,5
DMSO	5
Kalıp DNA	10

PCR sıcaklık ve süreleri

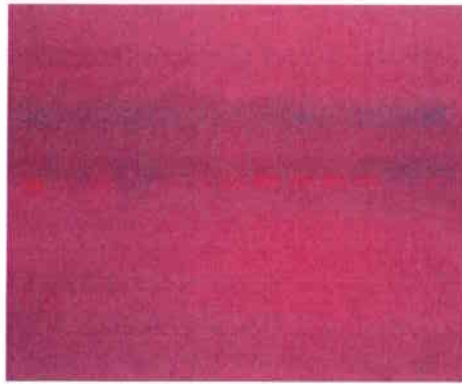
İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Ön denatürasyon	95	5
Denatürasyon	95	1
Yapışma (Annealing)	61	1
Uzama (extention)	72	1
Denatürasyon uzama arası 35 tekrar		
Tamamlanma	72	7
Saklama	4	∞

### 3.4.3. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Çözeltilerin hazırlanması:

TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Tamponu (pH 8): 27 g Tris, 13,75 g borik asit ve 10 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>.EDTA, 200 ml deiyonize suda çözülür. pH 8'e ayarlanır ve deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlanır. 10xTBE hazırlanmış olur. Deney esnasında 1xTBE olacak şekilde seyreltilerek kullanılır.



Şekil 8. Agaroz Jel elektroforez görünümü

Yükleme Tamponu (Denatüre Edici Olmayan) (pH 8) : % 50 sukroz, % 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen siyanol, 50 mM Na<sub>2</sub>.EDTA.

Etidyum Bromür: 10 mg/ml olacak şekilde ana çözelti olarak hazırlanır. %3'lük agaroz içindeki konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde seyreltilir.

Deneyin Yapılışı:

2 g agaroz, 100ml 1xTBE ile karıştırılıp iyice kaynatılır. Üzerine 3 µl etidyum bromür eklenir ve soğutulur. 5 µl PCR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak hazırlanan jele yüklenir. 200 wt'ta 15 dakika yürütülür ve transdülatörde bakılır. Bant görünen ürünler ile çalışmaya devam edilir. Görünmeyen ürünler yeniden PCR yapılır.



Şekil 9. Elektroforez sonrası jel görüntüsü

### 3.4.4. Saflaştırma

Elde bulunan hazır pürifikasyon kitleri ile PCR ürünü pürifiye edildi. (Invisorb Spin PCRapid Kiti) -Invitak kullanıldı;

1- PCR ürünü üzerine 130 uL tampon P eklenerek tüp içeriği ependorf filtresi tüpüne aktarılır ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir.

2- 10 000 rpm.de 30 saniye santrifüj edildi.



30 saniye 10 000 rpm

3-Kolonlar temiz alt tüplere aktarılır. Üzerine 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 10 000 rpm.de 30 saniye santrifüj edildi.



30 saniye 10 000 rpm

4- Filtrat atıldı kolonlar temiz alt tüplere aktarıldı , yıkama tamponundaki kolon etanolü gidermek için 3 dakika maksimum hızda (12 000-14 000 rpm.) santrifüj edildi.



30 saniye 12 000-14 000 rpm

5- En son olarak kolonlar steril 1,5 ml 'lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve tüplerine Elüsyon tamponu çözeltisinden 30 µl eklendi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.



1 dakika 10 000 rpm

NOT: Pürifiye edilen ürünlerin aynı gün içinde Cycle Sequencing'e konulması için gayret edildi. Ürünler bekletilecek ise en fazla 24 saat -20°C de saklandı.



### 3.4.5. Saflaştırma Sonrası Elektroforez

Saflaştırma sonrası ürünleri kontrol etmek amacıyla saflaştırılmış ürünlere % 2 lik agaroz jel hazırlanarak görüntü alınır.

Çözeltilerin hazırlanması ve deneyin yapılışı: 3.4.3.'deki belirtildiği üzere aynı çözeltiler hazırlanır ve aynı şekilde deney yapılır.

### 3.4.6. Dizi Döngüsü

The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak PCR yapıldı.

Kit içeriği:

- Hazır reaksiyon karışımı
- pGEM -3Zf(+) çift zincirli DNA
- 21 M13 Kontrol Primeri(İleri )

Deneyin Yapılışı:

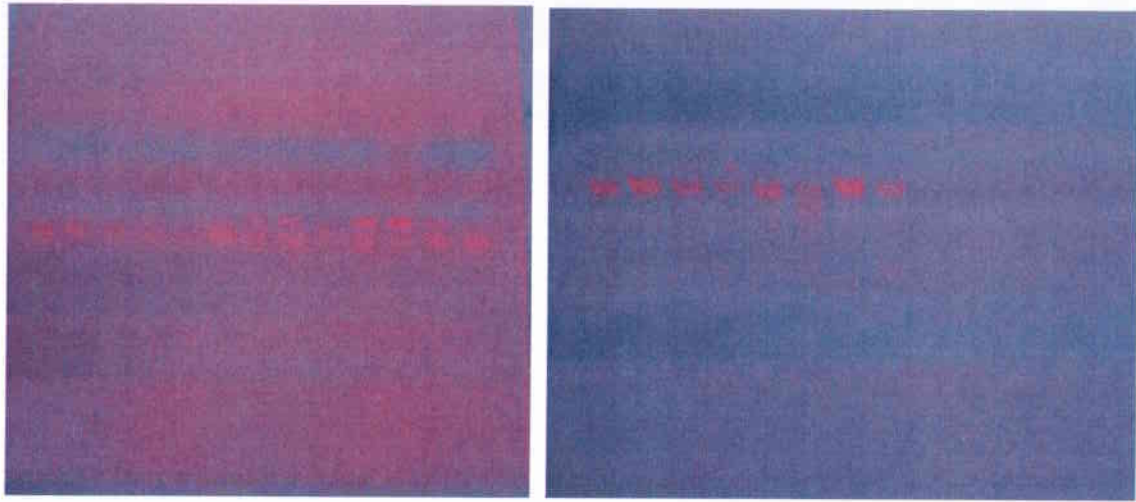
PCR sonrası dizi döngüsü hazırlanırken sadece kitin içindeki hazır reaksiyon karışımı alınarak yapıldı.

1-Kit yeni açıldığında veya örneklerin yürütülmesinde herhangi bir problem olduğunda cihazı, kiti, PCR ve kendimizi kontrol etmek amacıyla pGEM kontrol örneği hazırlandı.

PCR metod kontrol çalışması;

Hazır reaksiyon karışımı	8	μL
pGEM -3Zf(+) çift zincirli DNA	4	μL
-21 M13 Kontrol Primeri (İleri)	4	μL
ddH <sub>2</sub> O	4	μL
Toplam Hacim	20	μL

2-Jelde bantlarını gördüğümüz saflaştırılmış ürünler hazır reaksiyon karışımı ile karıştırılarak dizi analizine hazırlandı (Şekil 15 A).



A

B

Şekil 10. A) PCR sonrası elektroforez jel görüntüsü. B). Saflaştırma sonrası elektroforez jel görüntüsü

#### Sekans analizi çalışması

Hazır reaksiyon karışımı	8	$\mu\text{L}$
Primer (İleri)- Ekson 16	0,5	$\mu\text{L}$
Primer (Geri)-Ekson 18		
Kalıp* (2-6 $\mu\text{l}$ )	...	$\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O*	...	$\mu\text{L}$
Toplam Hacim	20	$\mu\text{l}$

Elektrofez jelinde bantların parlaklığına göre bakılarak 2-6  $\mu\text{l}$  arasında kalıp ilave edilir. ddH<sub>2</sub>O miktarı ise toplam hacim 20  $\mu\text{l}$  olacak şekilde ayarlanır.

3- Dizi döngüsü esnasında PCR aşamasında kullanılan İleri ve geri primerler ayrı ayrı kullanılarak dizileme için hazırlandı. Her iki primer de kullanılacak ise ileri primer ile ayrı karışım, geri primer ile ayrı karışım hazırlandı ve dizi döngüsüne koyuldu.

#### 4- Döngü sıcaklıkları ve süreleri

<i>İşlem</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>	<i>Süre (saniye)</i>
Denatürasyon	96	10
Yapışma (Annealing)	50	5
Uzama (extention)	60	240
Denatürasyon, yapışma ve uzama 25 tekrar		
Saklama	4	$\infty$

5- Dizi döngüsü sonrası ürün artıklardan temizlemek için yeniden saflaştırma işlemine tabii tutuldu. Bu aşama kit ile değil elle yapılan yöntemlerden biri olan Sodyum asetat (NaAc) ile yapıldı.

### 3.4.7. NaAc ile Saflaştırma

1- Elimizdeki PCR ürünü üzerine 2 µl 3 M pH:4.60 olan NaAc (Sodyum asetat) tamponu eklendi.

2- Üzerine 50 µl %95'lik etanol eklendi.

3- Karışım 1,5'lik ependorf türüne aktarıldı, hafifçe elle vurularak karıştırıldı. Saflaştırmanın hiçbir aşamasında voteks kullanılmadı.

4- Buz üzerinde 15 dakika dinlenmeye bırakıldı.

5- Süre sonunda hiç bekletilmeden 13 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.

6- Üst sıvı çekildi ve üzerine 250 µl % 70'lik etanol eklendi ve yine elle hafifçe karıştırıldı.

7- 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi

8- Üst sıvı tamamen atıldı ve kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi tüpü oda ısısında bırakarak yapıldı.

9- Liyofilize edilen DNA'lar saklanması halinde -20 °C'de 1 hafta süreyi aşmamaya gayret gösterildi.

10- İyice kuruyan örnekler üzerine 20 µL formamid eklenerek vortekslendi.

11- 95 °C de 5 dakika denatürasyon yapıldı ve hemen buza alındı 1-2 dakika buz üzerinde soğutulan örnekler dizi analizi için cihaza yükleme hazır hale getirildi.

### 3.4.8. DNA Dizi Analizi

Applied Biosystem Perkin Elmer Marka ABI 310 genetik analizörü kullanılarak DNA bazı dizi analizi yapıldı. Kapiller elektroforezin ardından software ortamında elektroferogram verileri ile elde edilen diziler standart Ekson dizileri ile karşılaştırılarak mutasyon taraması yapıldı.



School of Health Science Griffith University Gold Coast Campus Southport, queensland Australia) programı kullanılarak karşılaştırma yapıldı.

#### **3.4.9. DNA Dizi Uyum Analizi**

Her bir ekson için kullanılan primerlere ait referans dizi web ortamında <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> adresinde tarama yapılarak aşağıdaki gibi çıkarıldı. Dizi analizi yapılan örnekler ile bu referans dizi arasındaki moleküler değişim analizleri MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) kullanılarak yapıldı.(40)

Bu analizler yapılırken ve değerlendirilirken uluslar arası genetik kod tablosu kodon aminoasit dönüşümü için, amino asit üç harf, tek harf kısaltmaları ve IUB kodları için referans olarak kullanıldı.

#### 4. BULGULAR

Hasta ve kontrol grubuna ait serum glukoz, total kolesterol (TK), trigliserit (tg), yüksek yoğunluklu lipoprotein –kolesterol (HDL-K), düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K), sistolik kan basıncı (SKB), diastolik kan basıncı (DKB), ve bel çevresi değerleri metabolik sendromlu bireyleri sağlıklı kontrol grubu bireylerden ayırtetmek için kullanıldı. Metabolik sendromlu hastalar ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında cinsiyet hariç bu parametrelerin hepsi anlamlı düzeyde farklıydı (Tablo 6).

Tablo 6. Metabolik Sendromlu hasta ve kontrol grubunda parametreler

	Kontrol n=43	Hasta n=58	P
Cinsiyet K/E	24/19	32/26	
Yaş	43±12 (22-75)	51±14 (21-80)	0.003*
Glukoz (mg/dL)	82±9 (66-105)	131±60 (64-345)	0.001*
HDL-K (mg/Dl)	60±12 (40-99)	41±8 (28-70)	0.001*
TK (mg/Dl)	173±17 (140-210)	196±50 (104-297)	0.001*
TG (mg/dl)	85±29 (37-155)	241±99 (79-506)	0.001**
LDL-K (mg/Dl)	107±20 (26-141)	133±43 (60-222)	0.001*
SKB (mmHg)	115±12 (90-140)	149±22 (110-200)	0.001*
DKB (mmHg)	75±11 (50-100)	89±12 (60-120)	0.001*
BEL ÇEVRESİ (cm)	84±11 (66-104)	106±16 (50-165)	0.001*

(\*Student-t,\*\* mann-whitney-u)

Sağlıklı kontrol grubu ile metabolik sendromlu bireylerde kadın ve erkeklerde ayırt edici kriterlerin ortalama değerleri, minimum ve maksimum değerleri ile standart sapmaları tabloda verilmiştir.

Tablo 7. Metabolik sendromlu (hasta) ve sağlıklı bireylerde (kontrol) parametrelerin cinsiyete göre dağılımı

Parametreler	Kontrol X±SD (min-max)		P	Hasta X±SD (min-max)		P
	Kadın 24	Erkek 19		Kadın 32	Erkek 26	
Yaş	40±11 (22-75)	45±13 (29-75)	A.D.**	51±15 (21-80)	51±14 (29-77)	A.D.**
Glukoz (mg/dL)	82±10 (60-105)	83±8 (69-96)	A.D.**	135±68 (64-345)	127±50 (68-280)	A.D.**
TK (mg/dl)	172±17 (140-201)	174±17 (145-210)	A.D.*	198±50 (104-294)	192±50 (103-297)	A.D.**
HDL-K (mg/Dl)	65±11 (52-99)	54±10 (140-73)	0.001*	44±8 (30-67)	39±9 (28-70)	0.019*
TG (mg/dl)	74±23 (37-135)	99±30 (59-155)	A.D.*	253±101 (79-457)	227±96 (91-506)	A.D.**
LDL-K (mg/Dl)	103±23 (26-134)	113±16 (72-141)	A.D.*	136±43 (61-222)	130±44 (62-110)	A.D.**
SKB (mmHg)	113±10 (100-130)	119±14 (90-140)	A.D.**	147±22 (110-200)	150±22 (110-200)	A.D.**
DKB (mmHg)	74±10 (50-90)	77±11 (60-100)	A.D.**	87±12 (70-120)	92±12 (60-110)	0.033**
BEL ÇEVRESİ (cm)	79±8 (66-95)	89±12 (68-104)	0.033*	103±13 (75-130)	109±20 (50-165)	0.015**

(\*student-t,\*\*mann withney-u)A.D.:Anlamli değil

Tablo 8. ABCA1 Ekson 7,Ekson 15,Ekson 19,Ekson 36, Ekson 41 ve Ekson 49 için tespit edilen polimorfizmlerin lokasyon,kodon,nükleotid ve amino asit değişimleri.

Lokasyon	Kodon	Nükleotid değişimi	Amino Asit Değişimi
ABCA1 Ekson7	192	CAT-CGT	His- Ala
	219	AGG-AAG	Arg-Lys
	231	TCC-TTC	Ser-Phe
ABCA1 Ekson15	680	ATC-ATA	YOK,Iso
ABCA1 Ekson19	901	ATT-TTT	Iso-Phe
	904	CTG-TTG	YOK,Leu
	919	CTG-TTG	YOK,Leu
	920	GCA-GCT	YOK,Ala
	935	AAT-AAG	Asp-Lys
ABCA1 Ekson36	1590	CAG-CAA	YOK,Glu
ABCA1 Ekson41	1855	GCC-TCC	Ala-Ser
	1858	GTG-GAG	Val-Glu
	1860	GGG-AGG	Gly-Arg
	1861	GTG-GAG	Val-Glu
	1877	AGG-AAG	Arg-Lys
ABCA1 Ekson 49	2161	GAC-GAA	Asp-Glu

Bu polimorfizmlerden sadece 4'ü istatistiksel manada anlamlı bulunmuştur. Bu polimorfizmlerin genotip ve allel frekansları Tablo 9, 10, 11, 12'de verilmiştir.

Tablo 9. ABCA1 Ekson 7 kodon 219 AGG → AAG polimorfizminin genotip ve allel frekansları

	Kontrol	Metabolik Sendrom	$\chi^2$	P
n	43	58		
Genotip				
G/G	30 (0.70)	28 (0.48)		
G/A	10 (0.23)	22 (0.38)		
A/A	3 (0.07)	8 (0.14)	6.998,df=1	0.008
Allel				
G	70	78		
A	16	38		



Tablo 9 ABCA1 Ekson 7 kodon 219 AGG→AAG polimorfizmi hasta ve kontrol grubunda yaygın bir şekilde bulunmuştur. Bunlardan onbir tanesi homozigottur.

Tablo 10. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 (W) GCA→GCT polimorfizminin genotip ve allel frekansları

	Kontrol	Metabolik Sendrom	$\chi^2$	P
n	43	58		
Genotip				
A/A	43 (1.00)	52 (0.90)		
A/T	0	6 (0.10)		
T/T	0	0	4.729,df =1	0.03
Allel				
A	86	110		
T	0	6		

Tablo 11. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 GGG→AGG polimorfizminin genotip ve allel frekansları

	Kontrol	Metabolik Sendrom	$\chi^2$	P
n	43	58		
Genotip				
G/G	43 (1.00)	55 (0.95)		
G/A	0	3 (0.05)		
A/A	0	0	2.292,df =1	0.130
Allel				
G	86	113		
A	0	3		

Tablo 12. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 AGG→AAG polimorfizminin genotip ve allel frekansları

	Kontrol	MetabolikSendrom	$\chi^2$	P
n	43	58		
Genotip				
G/G	43 (1.00)	52 (0.90)		
G/A	0	6 (0.10)		
A/A	0	0	4.729, df =1	0.03
Allel				
G	86	110		
A	0	6		

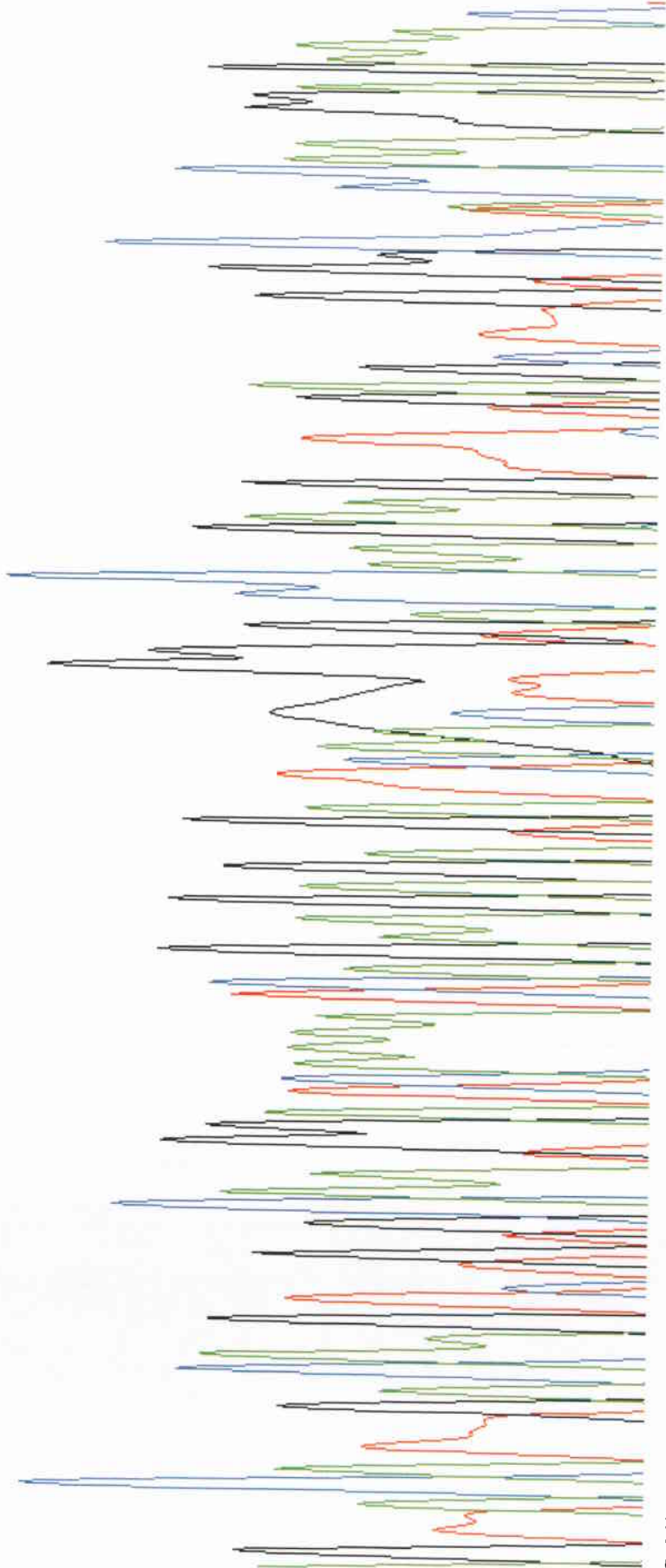
Bunların dışında Ekson 7, Ekson 19 ve Ekson 49 'da insersiyonlara da rastlanmıştır. Bu insersiyonlar aşağıdaki Tablo 13'de belirtilmiştir.

Tablo 13. ABCA1 Ekson 7,Ekson 19 ve Ekson 49 'daki insersiyonların lokasyon, kodon, nükleotid ve amino asit değişimi.

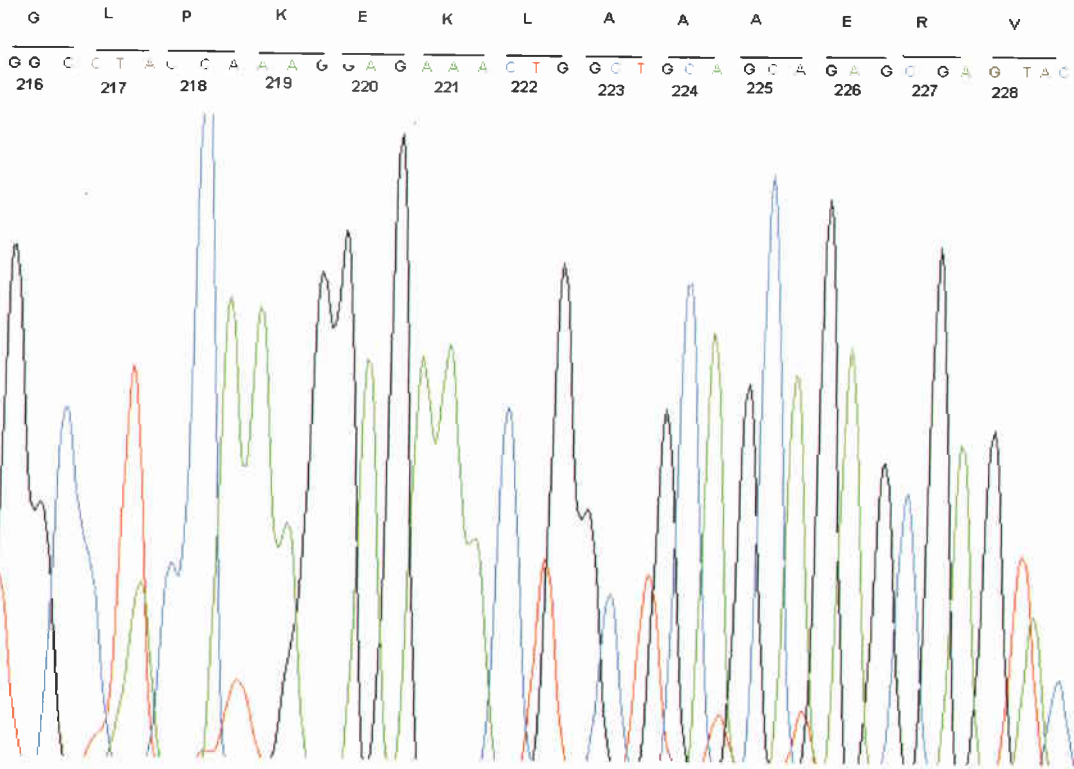
Lokasyon	Kodon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
ABCA1 Ekson 7	190	Yok	Yok,GI
ABCA1 Ekson 7	229	CTT→CAT	His-Arg
ABCA1 Ekson 7	233	ATG→AAG	Met-Lys
ABCA1 Ekson 7	235	ATC→ATT	Yok,Iso
ABCA1 Ekson 19	918	GGC→GCG	Yok,Leu
ABCA1 Ekson 49	2189	Yok	Yok,Pro

Tablolardan da görüldüğü gibi sağlıklı kontrol grubunda sadece bir adet polimorfizm (ekson 7 R219K) görülürken ABCA1 geninin ekson 7 219.,ekson 19 920., ekson 41 1860. ve ekson 41 1877. kodonlarda görülen polimorfizmler metabolik sendromla ilişkili bulunmuştur.Bu polimorfizmlerden 37 tanesi heterozigot (31 adet G/A, 6 adet A/T ) iken sadece 11 tanesi homozigot (11 adet A/A) tur. Örnek sonuç çıktıkları Şekil 13-58'de verilmiştir.

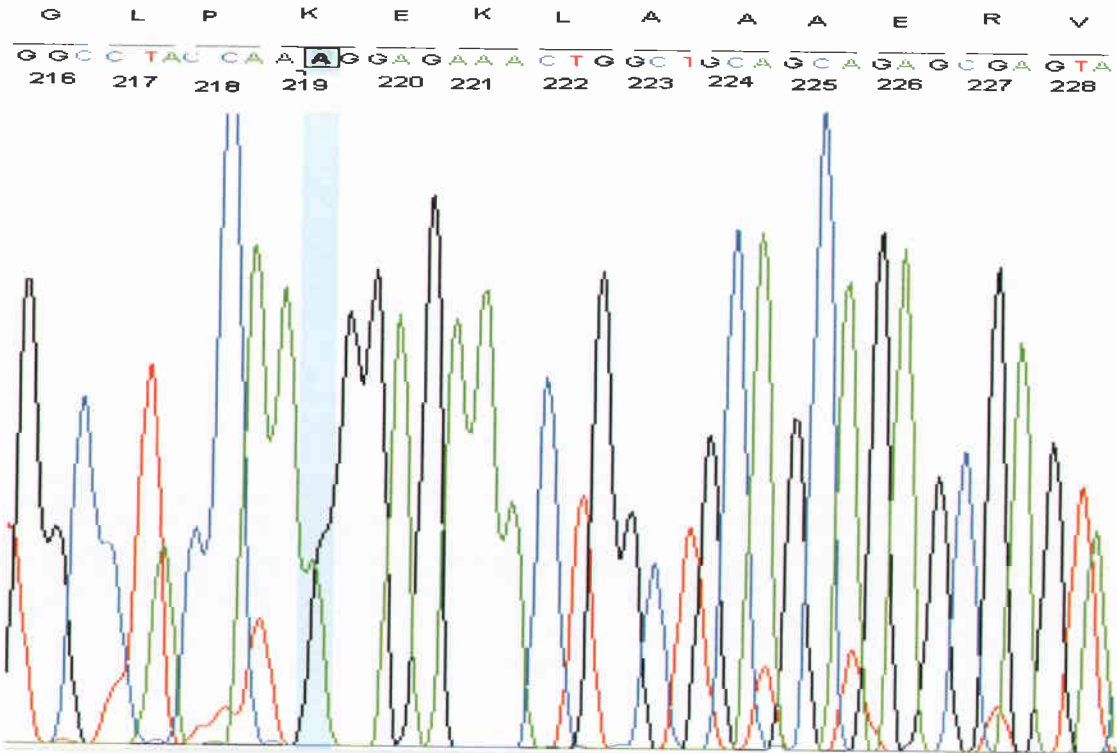
V T L T S L C N G S K S E E M I Q L G D Q E V S E L C G L P R E L  
 G T T A C A T T G A C A A G T C T G C C A A T G G A T C A A A A T C A G A A G A G A T G A T T C A A C T T G G T G A C C A A G A A G T T T C T G A G C T T T G T G C C T A C C A A G G G A G A A C T  
 565 219 662



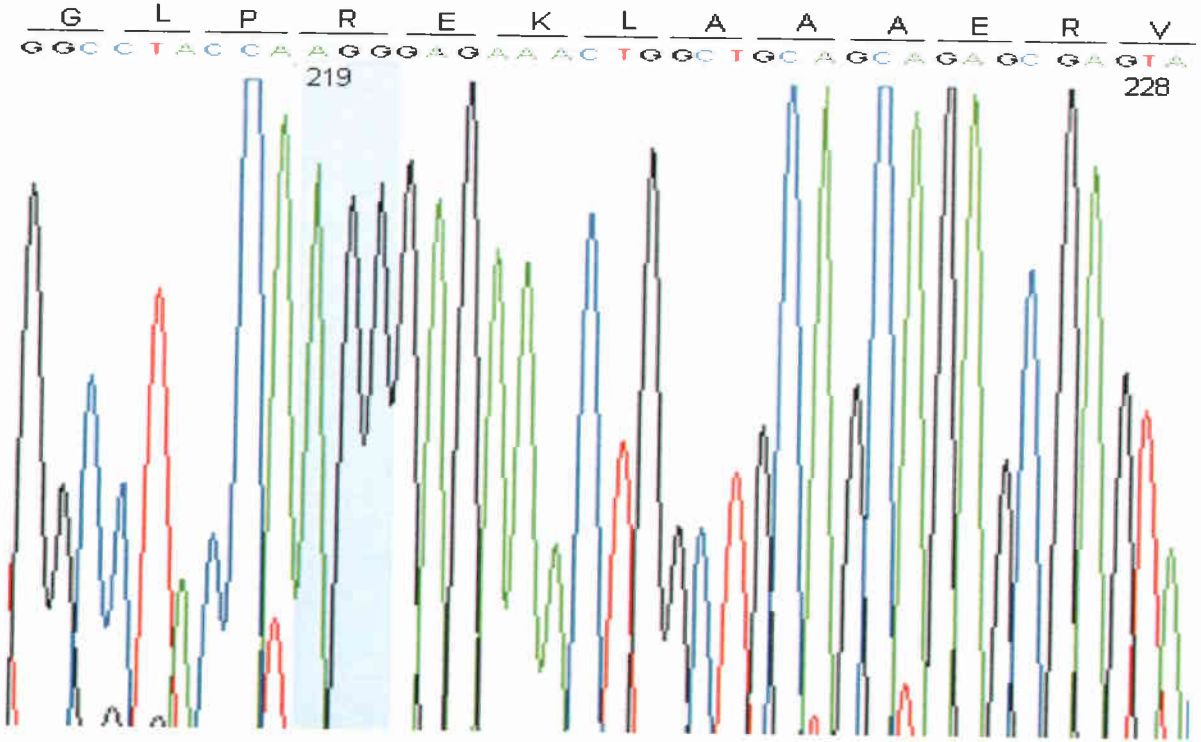
Şekil 12. ABCA1 Ekson 7 referans diziyeye uyan kontrol grubu elektroforam örneği nükleotit dizisi kodon sırası (48)



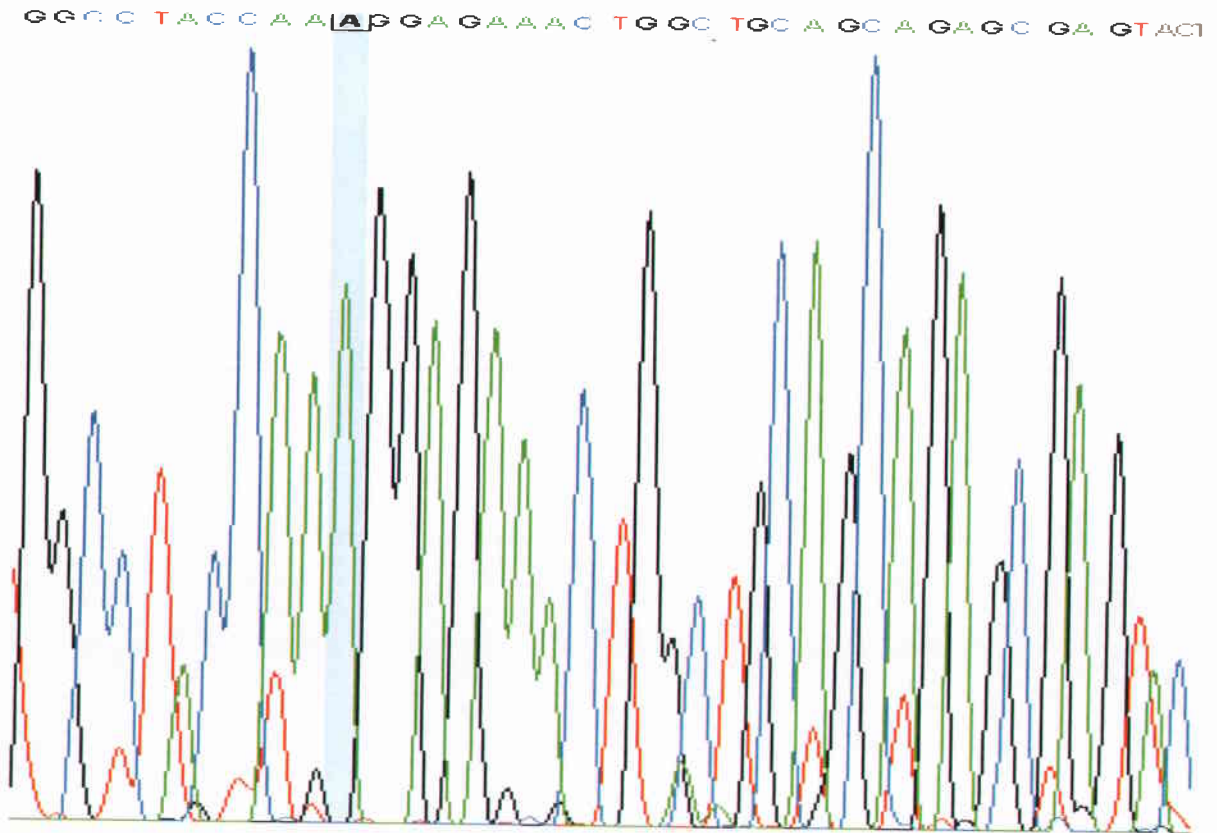
Şekil 13. ABCA1 Ekson -7 219. kodon heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi F.Y (76 y) kadın



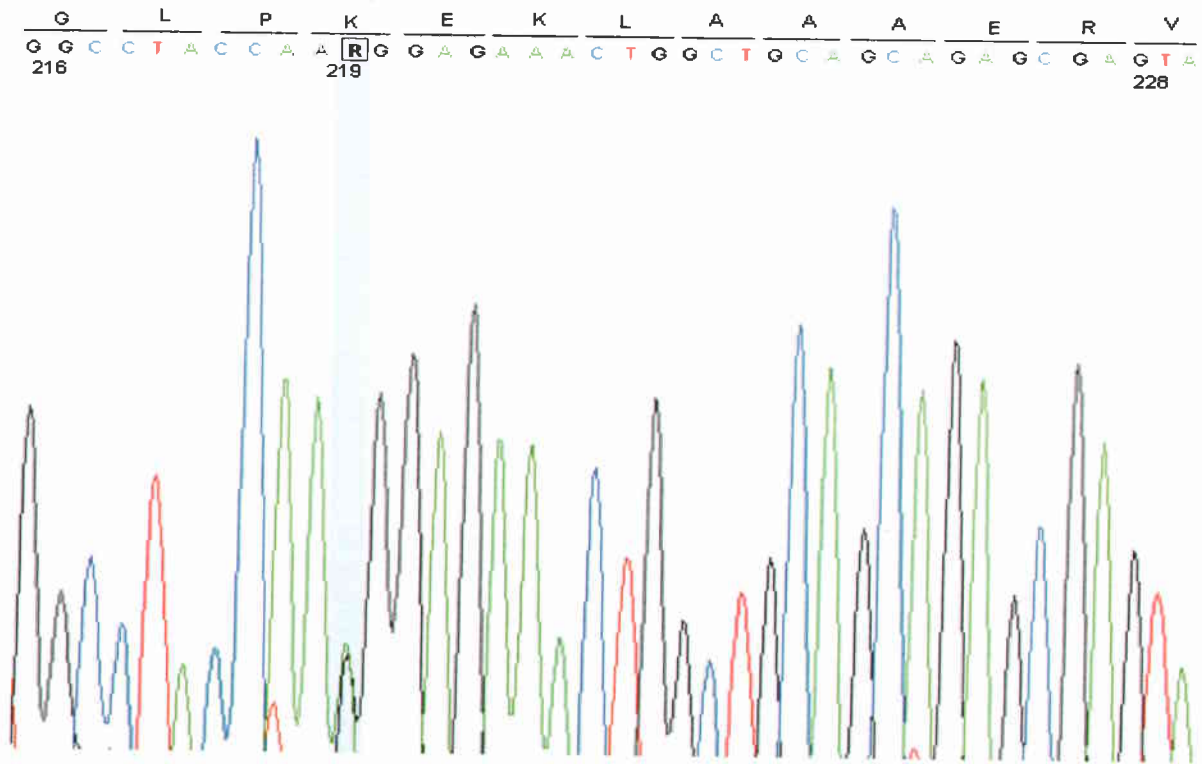
Şekil 14. ABCA1 Ekson 7, 219. kodon heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi O.M (36 y)erkek



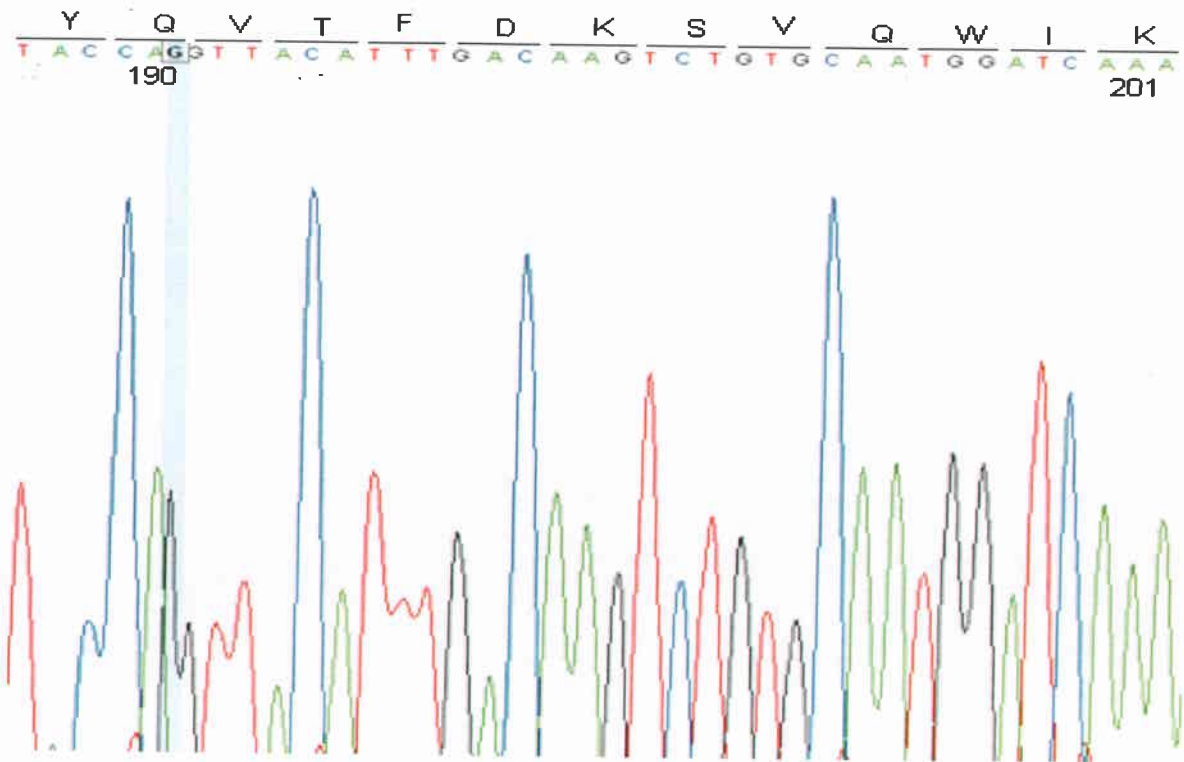
Şekil 15. Sağlıklı kontroldeki normal dizi.



Şekil 16. ABCA1 Ekson -7, 219. kodon homozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi F.T (70 y) kadın

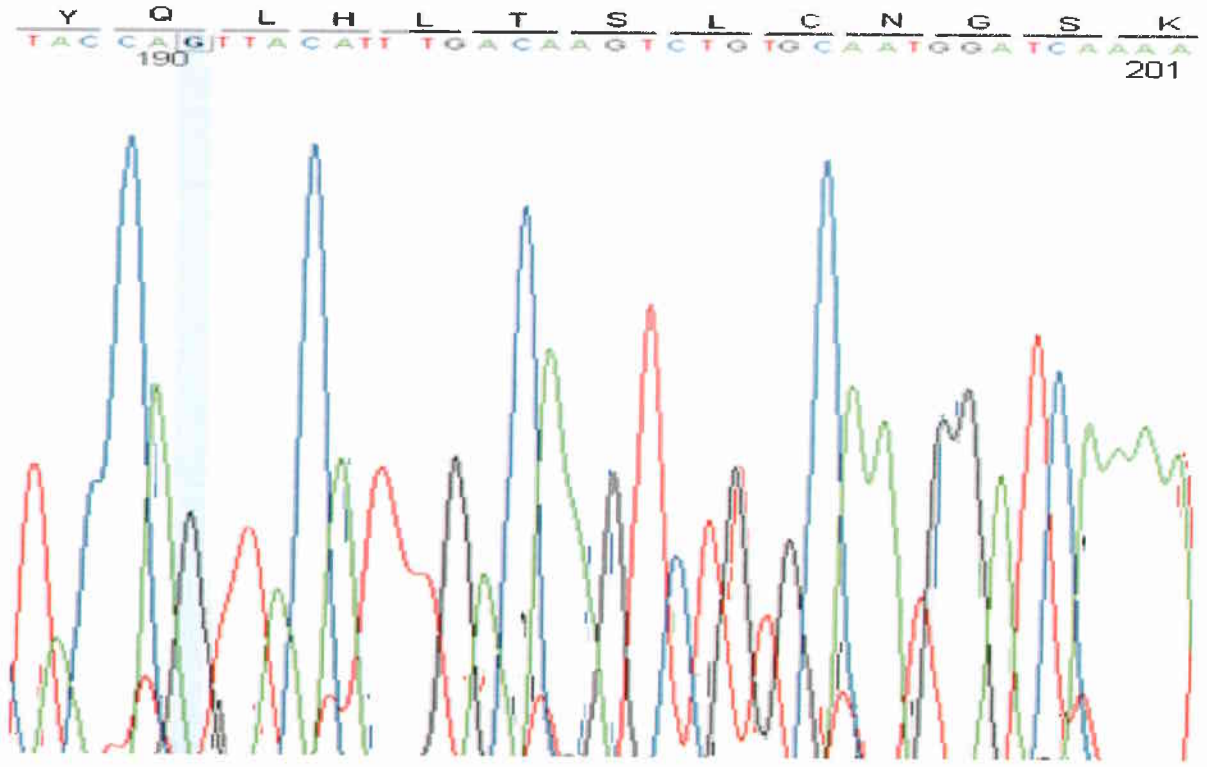


Şekil 17. ABCA1 Ekson 7 219. kodon heterozigot g→a, R (AGG –AAG) polimorfizmi  
Z.A (42 y) kadın

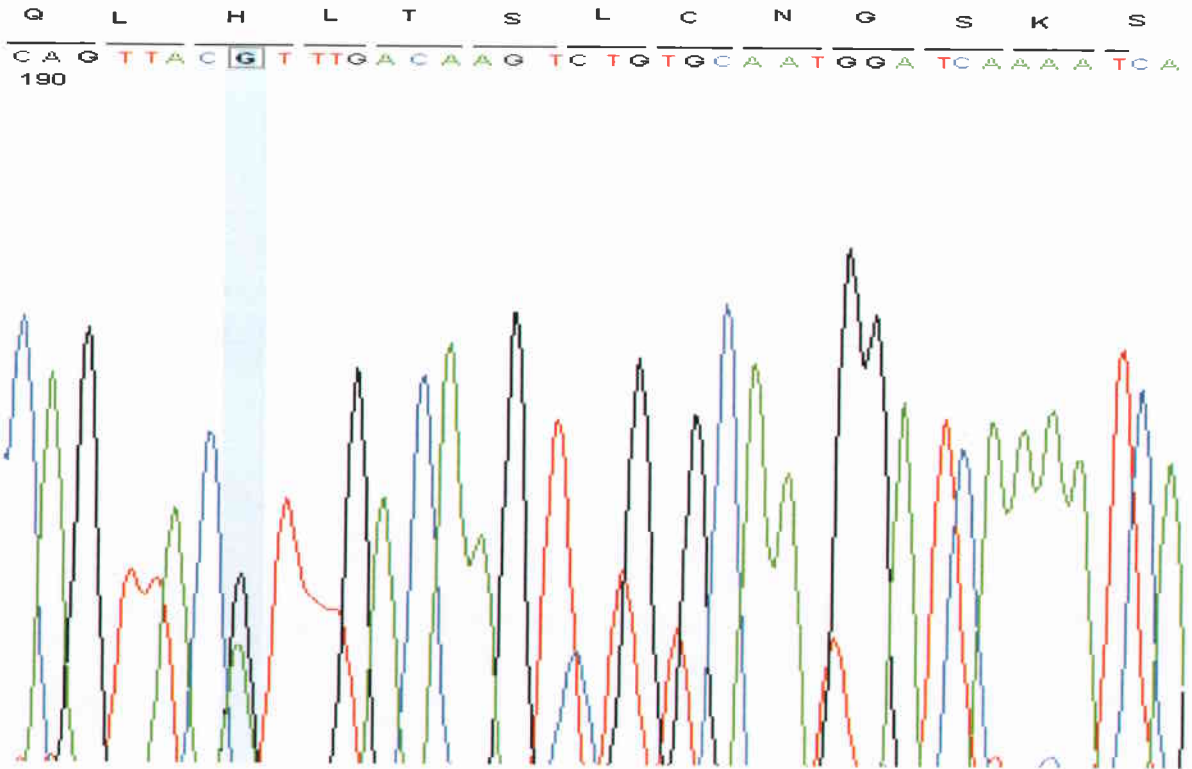


Şekil 18. ABCA1 Ekson 7, 190.kodon g insersiyonu (üçlü kodon değişmiyor –CAG) İ.K.  
(38Y) erkek

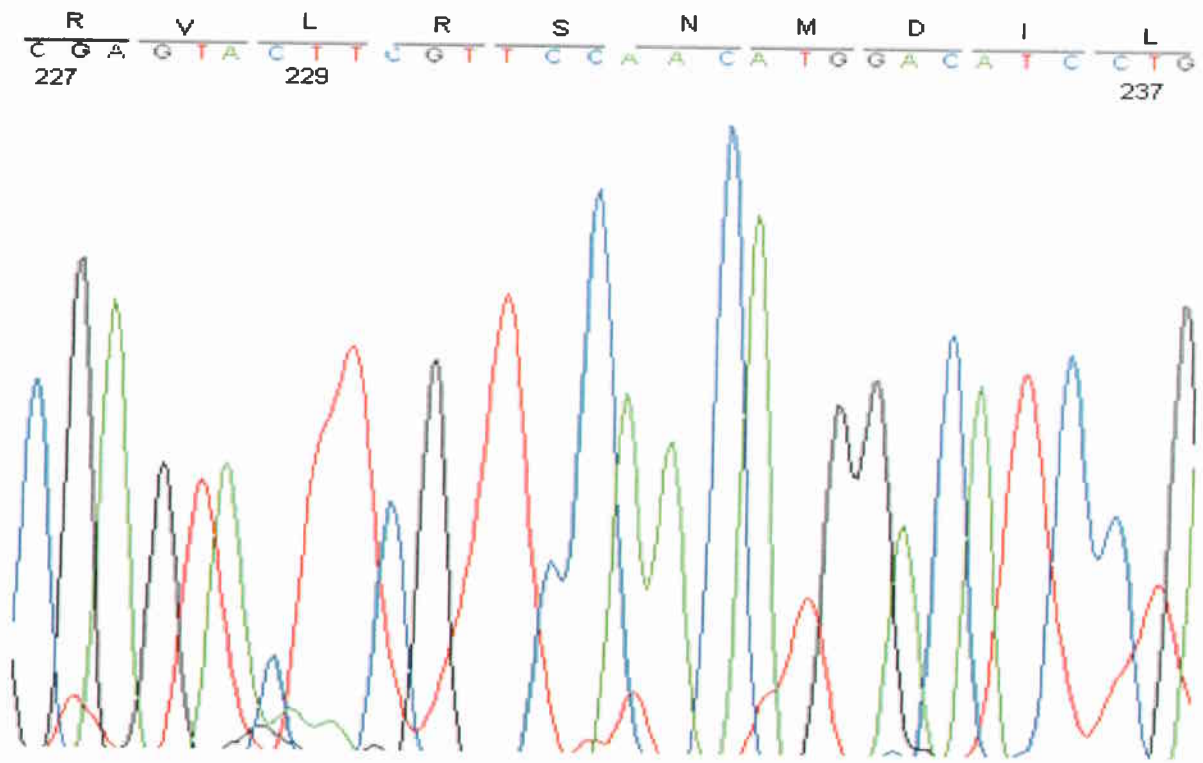




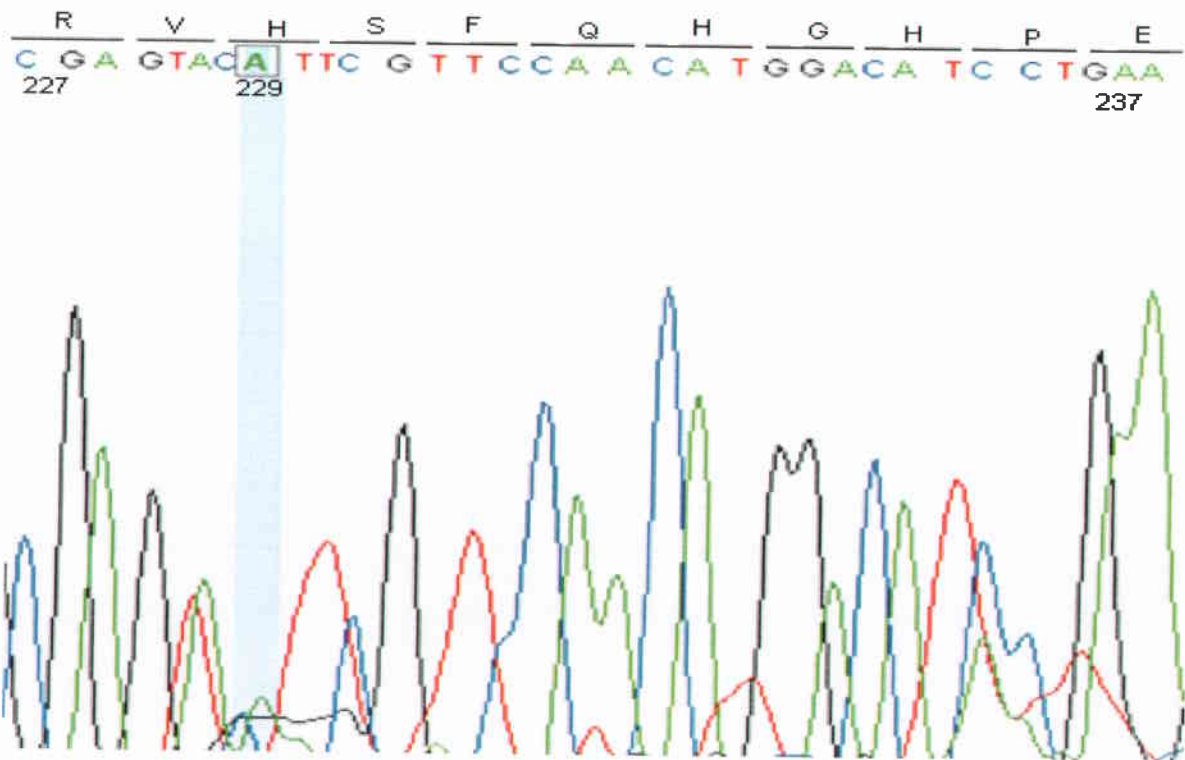
Şekil 19. BCA1 Ekson 7,190.,192. kodonları içeren sağlıklı kontrol dizisi.



Şekil 20. ABCA1 Ekson 7 192. kodon heterozigot a→g (CAT-CGT) polimorfizmi A.Ç. (32Y) kadın

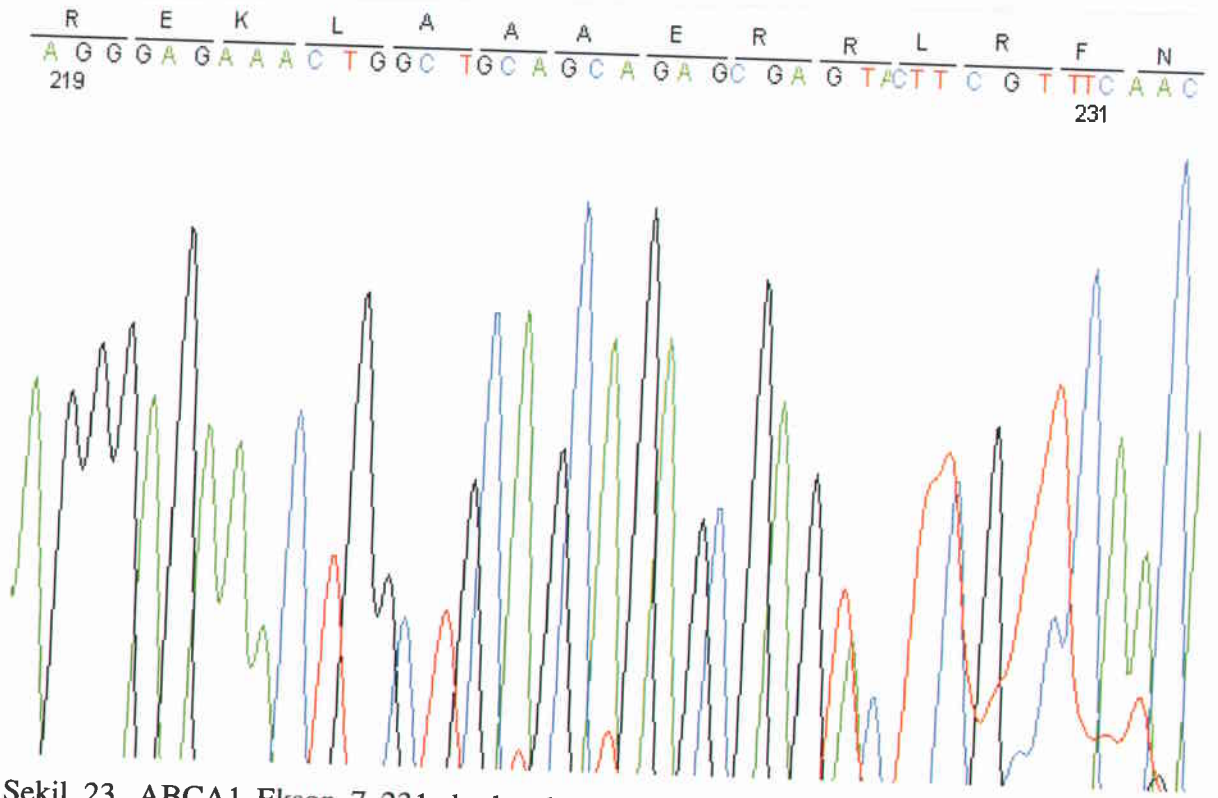


Şekil 21. ABCA1 EX-7 229. kodon sağlıklı kontrol dizisi

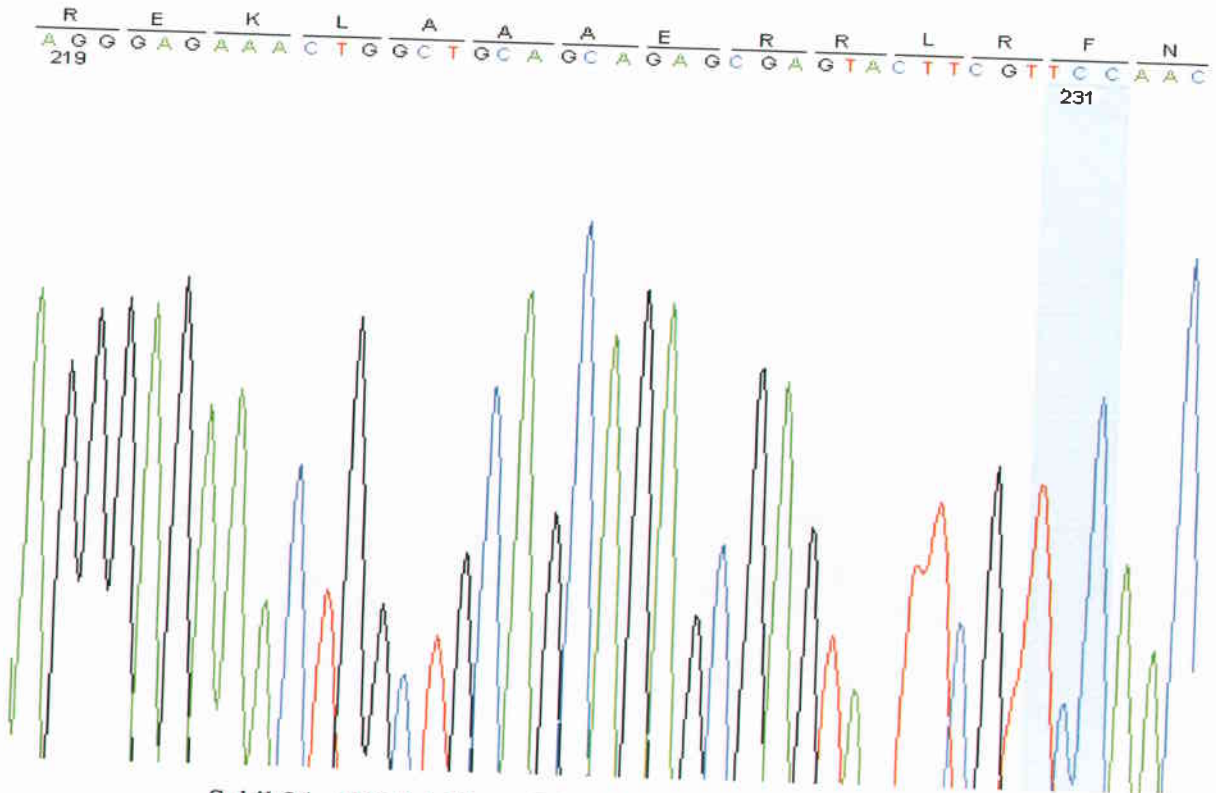


Şekil 22. ABCA1 Ex-7 229.kodon ins.A (CTT-CAT) polimorfizmi K.Y (72Y) erkek

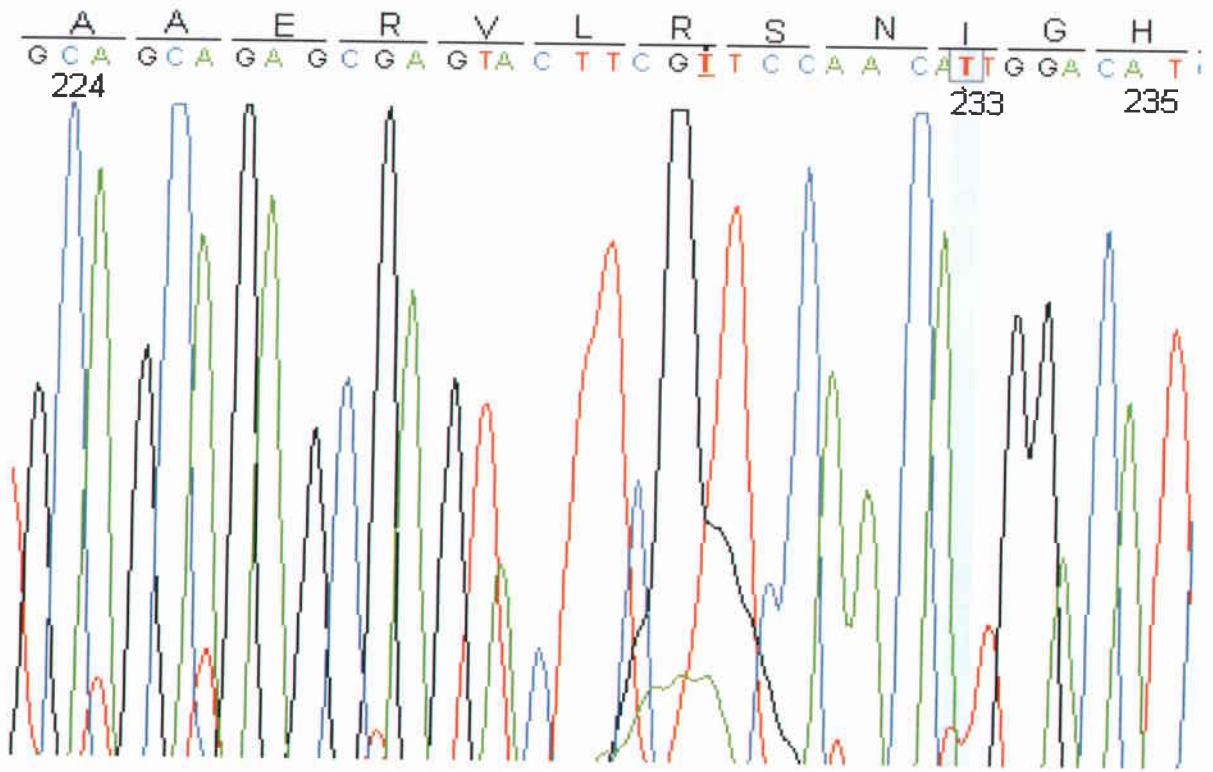




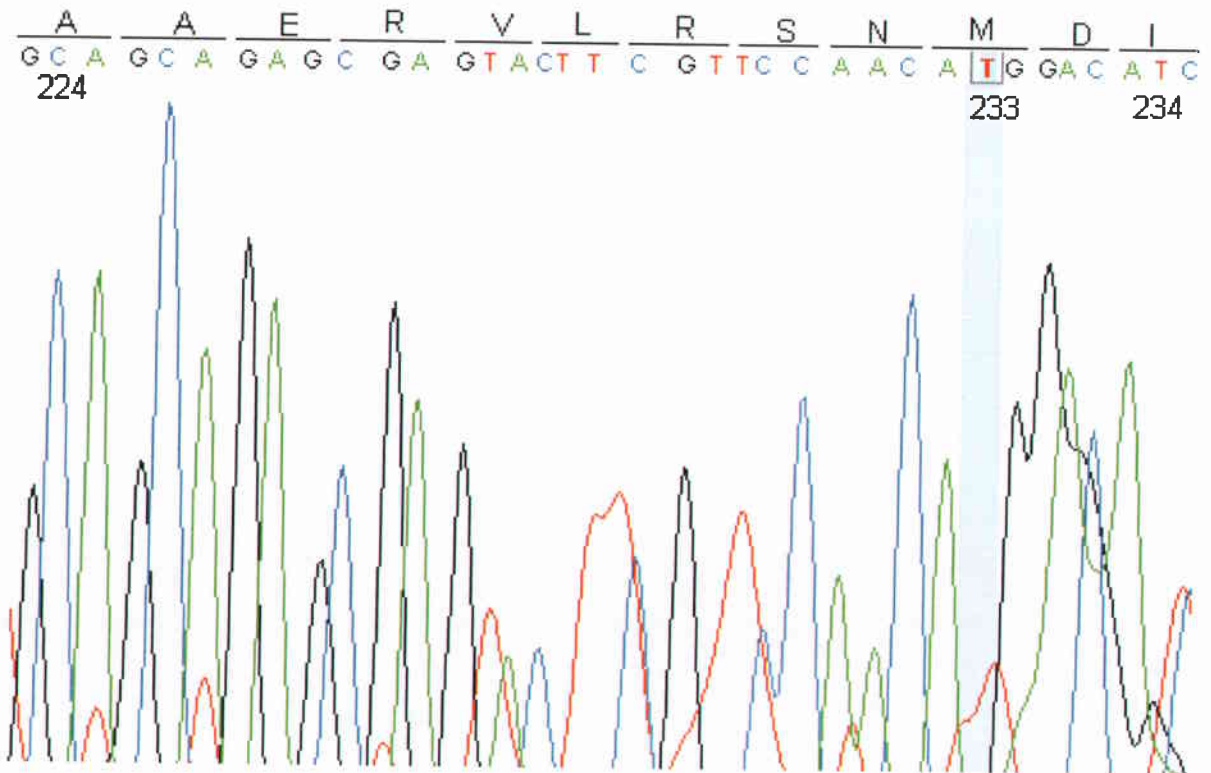
Şekil 23. ABCA1 Ekson 7 231. kodon heterozigot c→t (TCC-TTC) polimorfizmi H.K (67Y) kadın



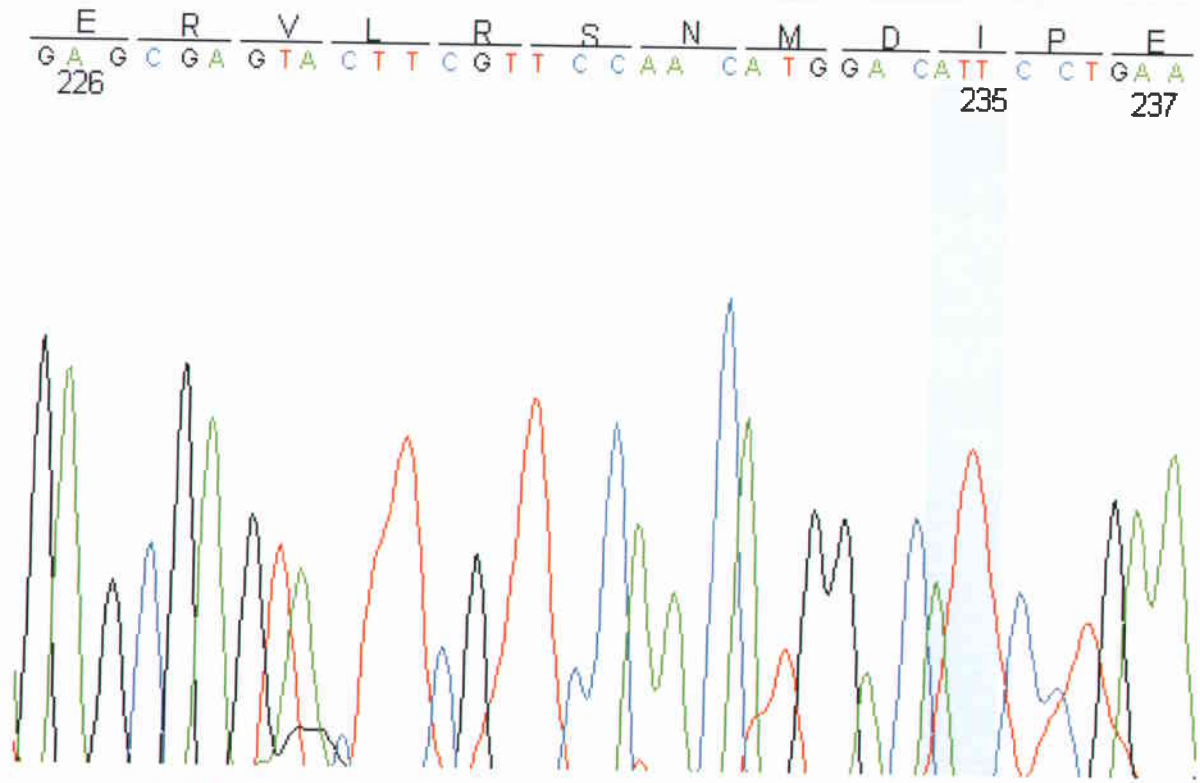
Şekil 24. ABCA1 Ekson 7 231. kodon sağlıklı kontrol dizisi



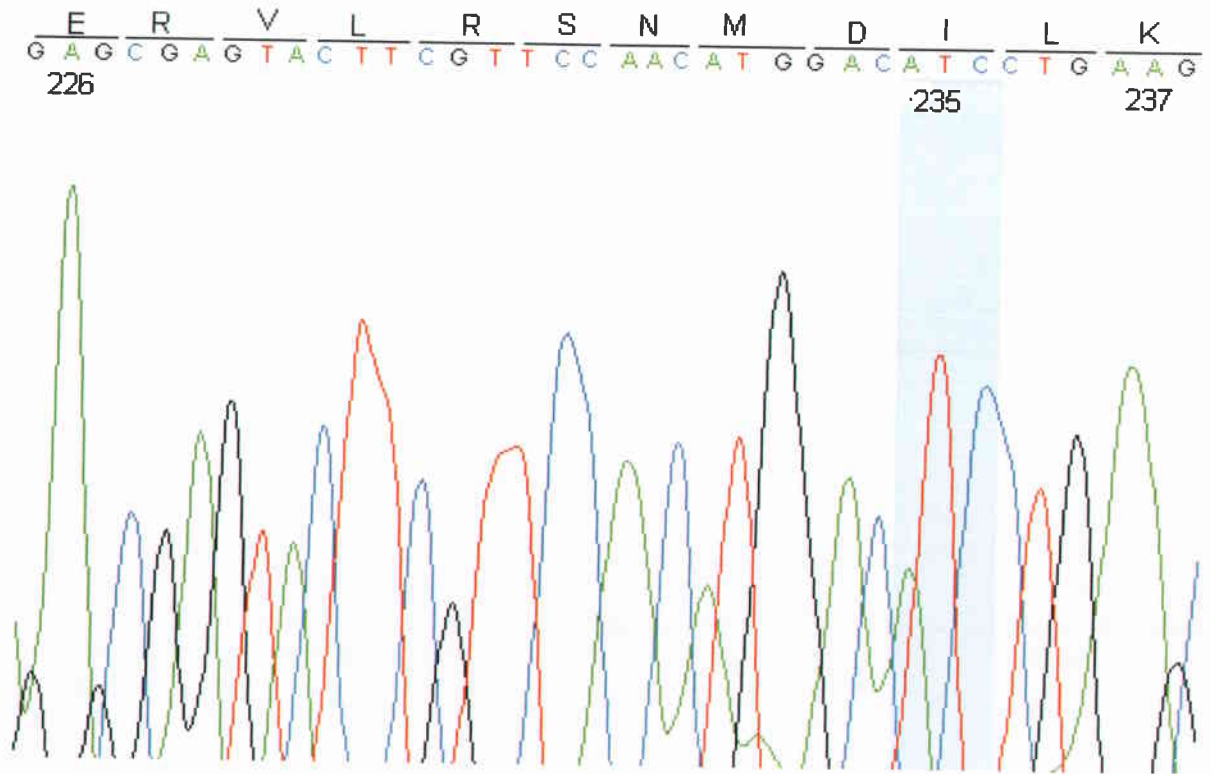
Şekil 25. ABCA1 Ekson 7 kodon 233 T insersiyonu F.E (53Y) kadın



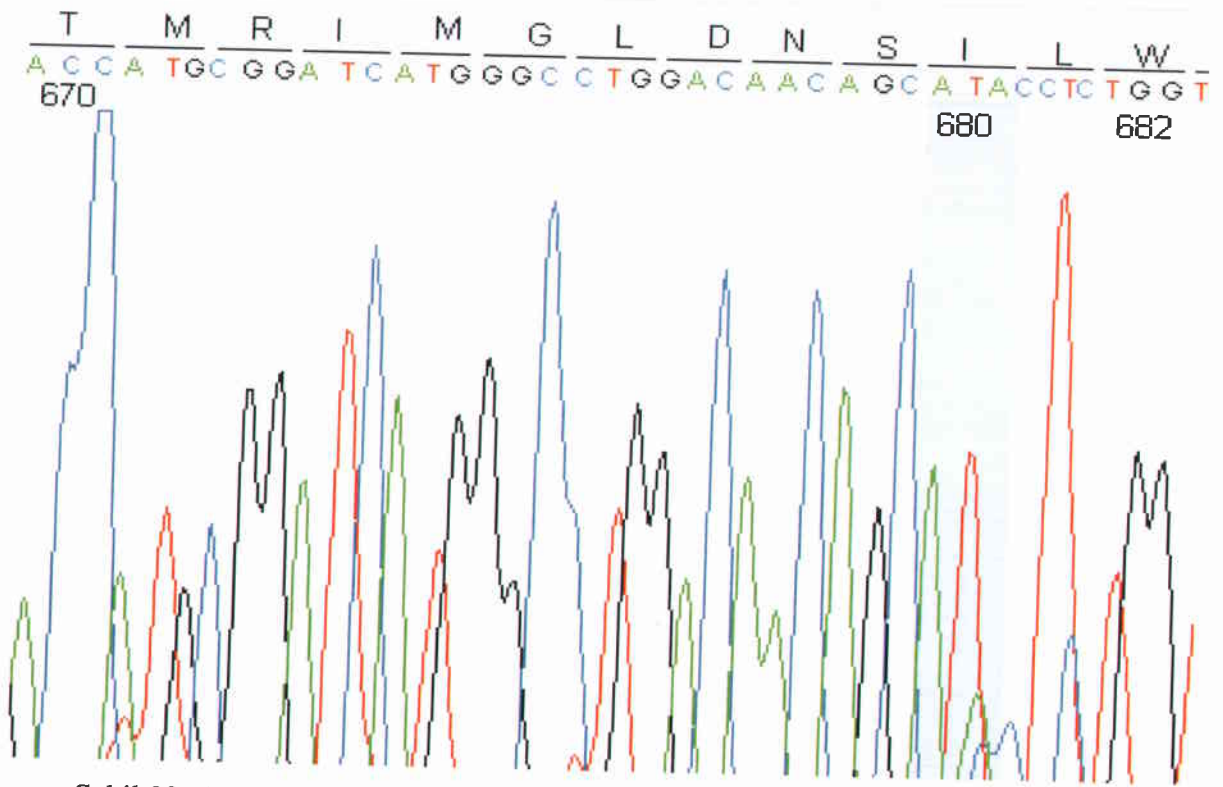
Şekil 26. ABCA1 Ekson 7 kodon 233 sağlıklı kontrol dizisi



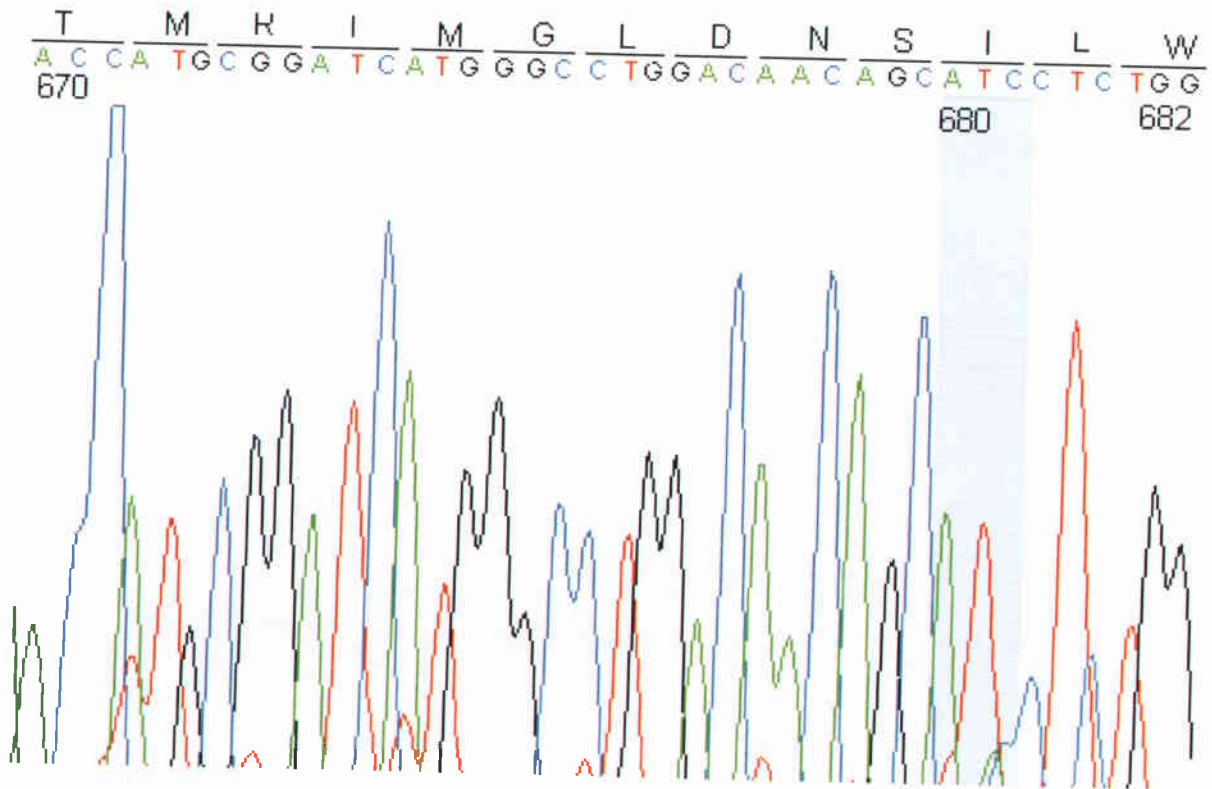
Şekil 27. ABCA1 Ekson 7 kodon 235 T insersiyonu F.A. (31Y) kadın



Şekil 28. ABCA1 Ekson 7 kodon 235 sağlıklı kontrol dizisi

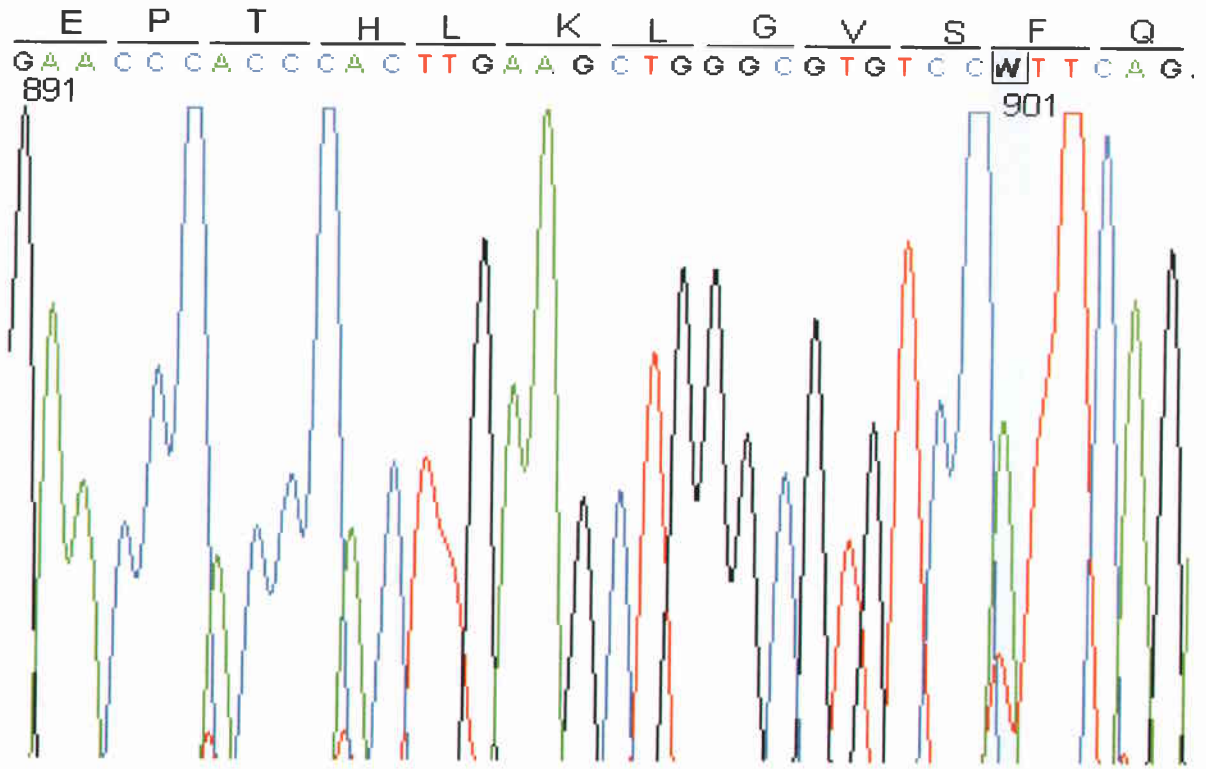


Şekil 29. ABCA1 Ekson15 kodon 680 ATC-ATA polimorfizmi İ.K. (38Y) erkek

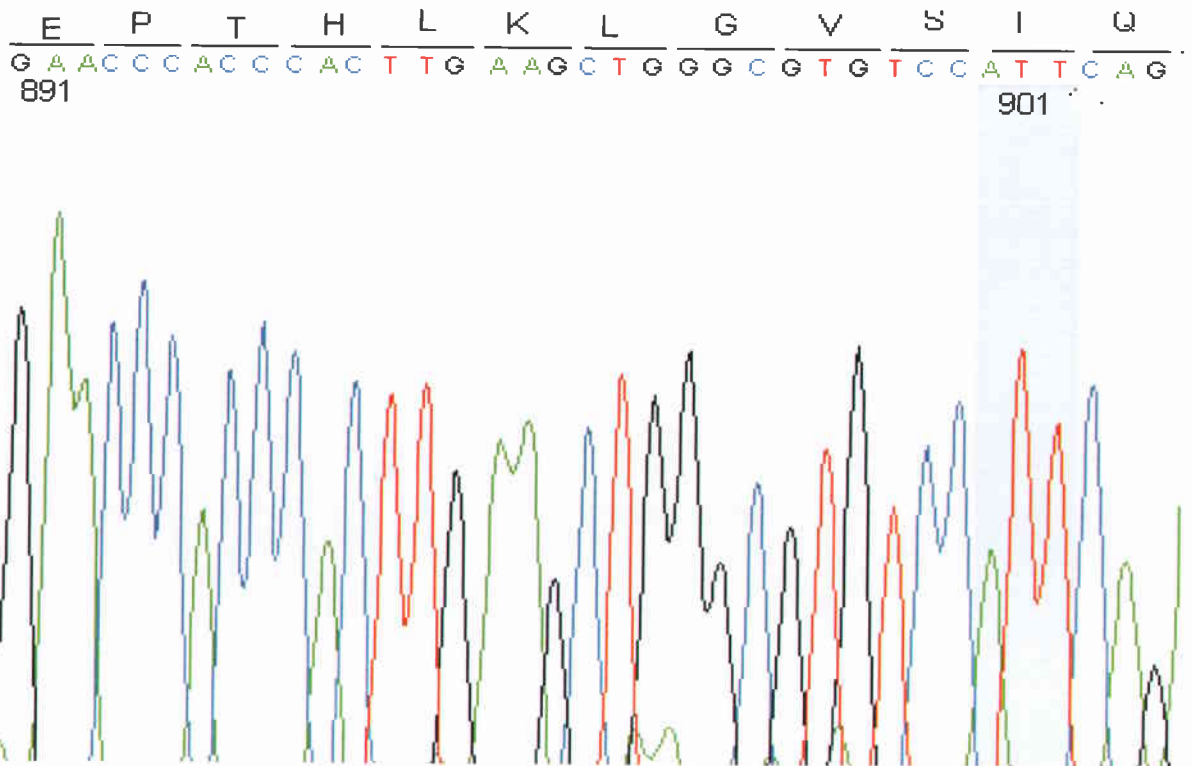


Şekil 30. ABCA1 Ekson 15 kodon 680 sağlıklı kontrol dizisi

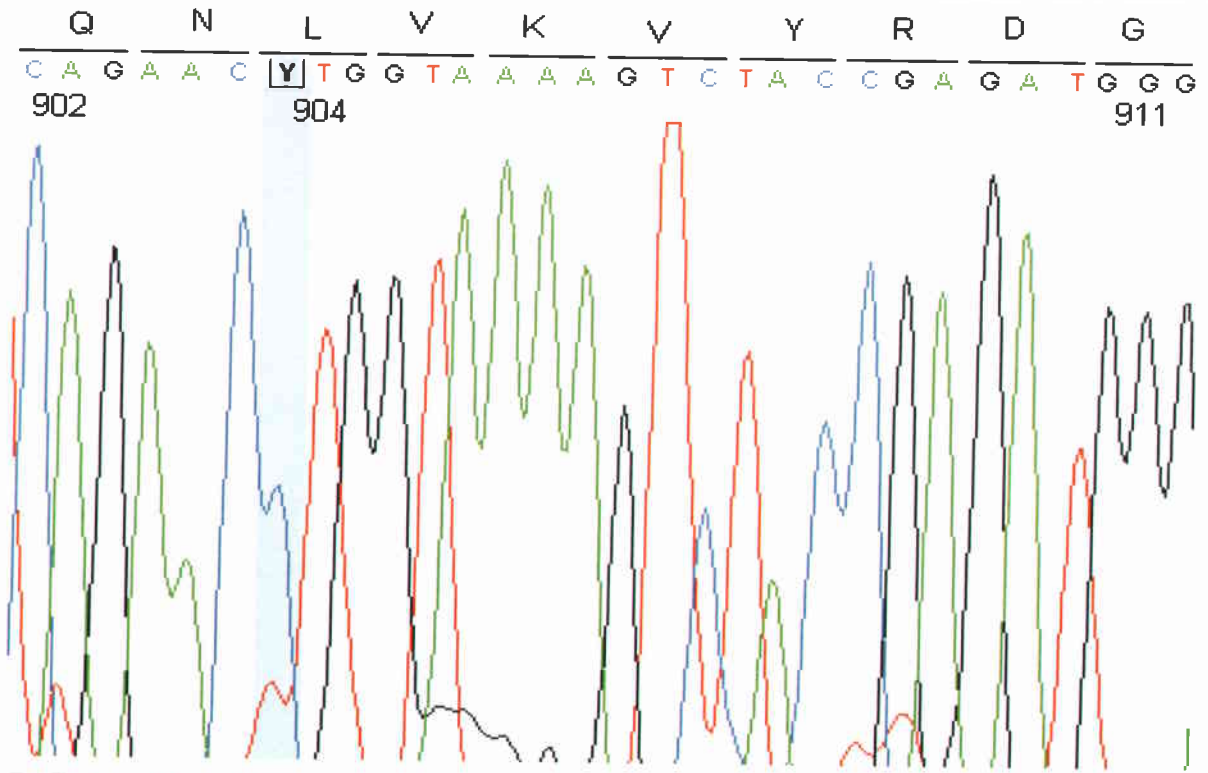




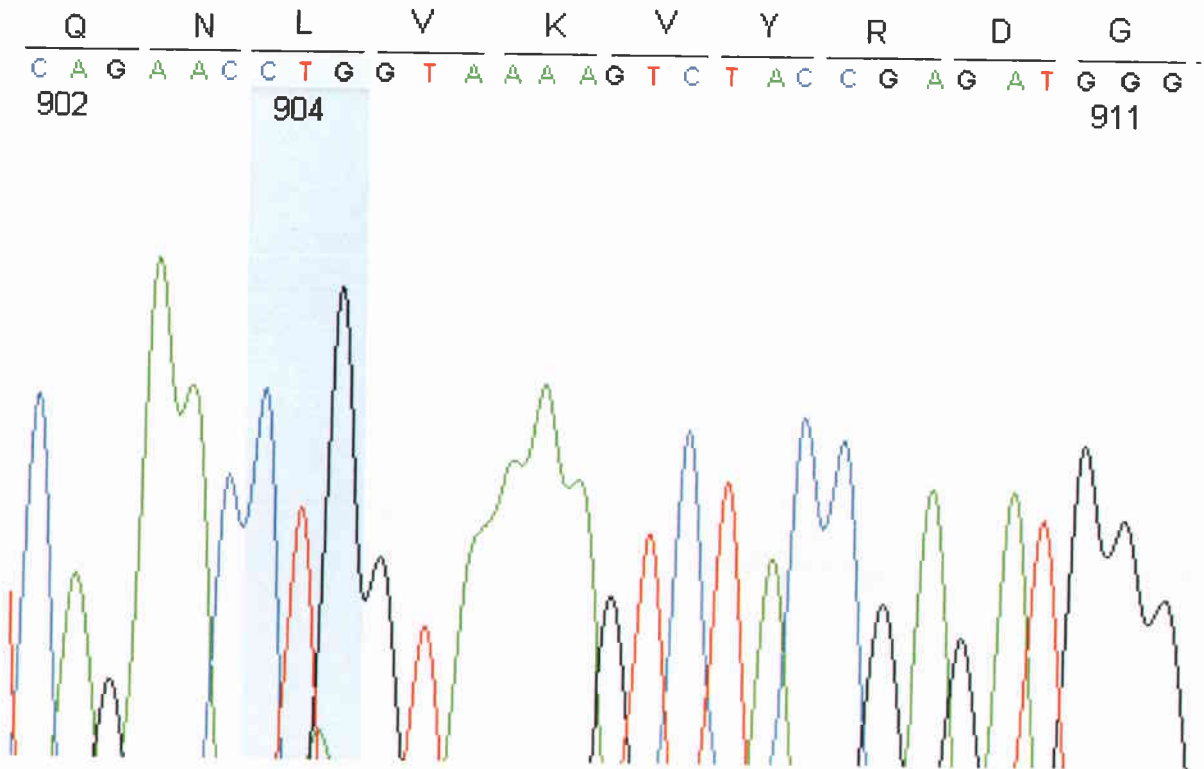
Şekil 31. ABCA1 Ekson19 kodon 901 heterozigot a→t (ATT-TTT) polimorfizmi S.G. (27Y) kadın



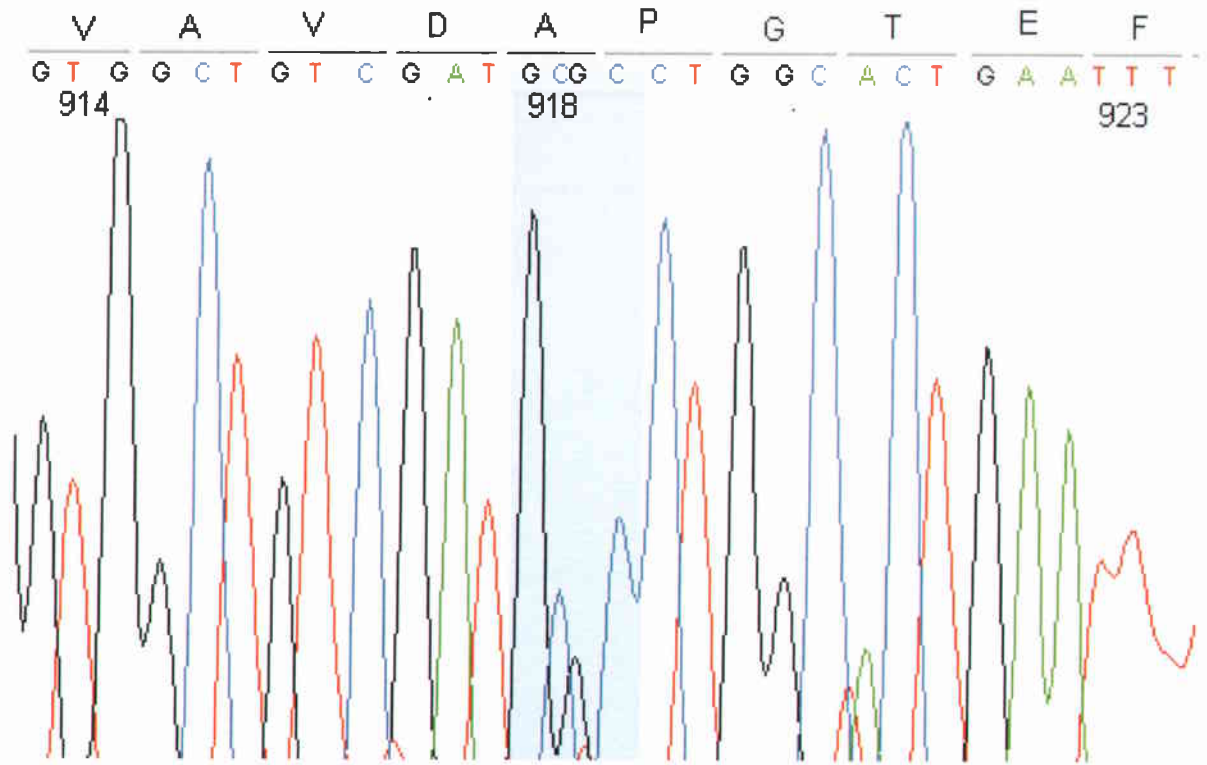
Şekil 32. ABCA1 Ekson 19 kodon 901 sağlıklı kontrol dizisi



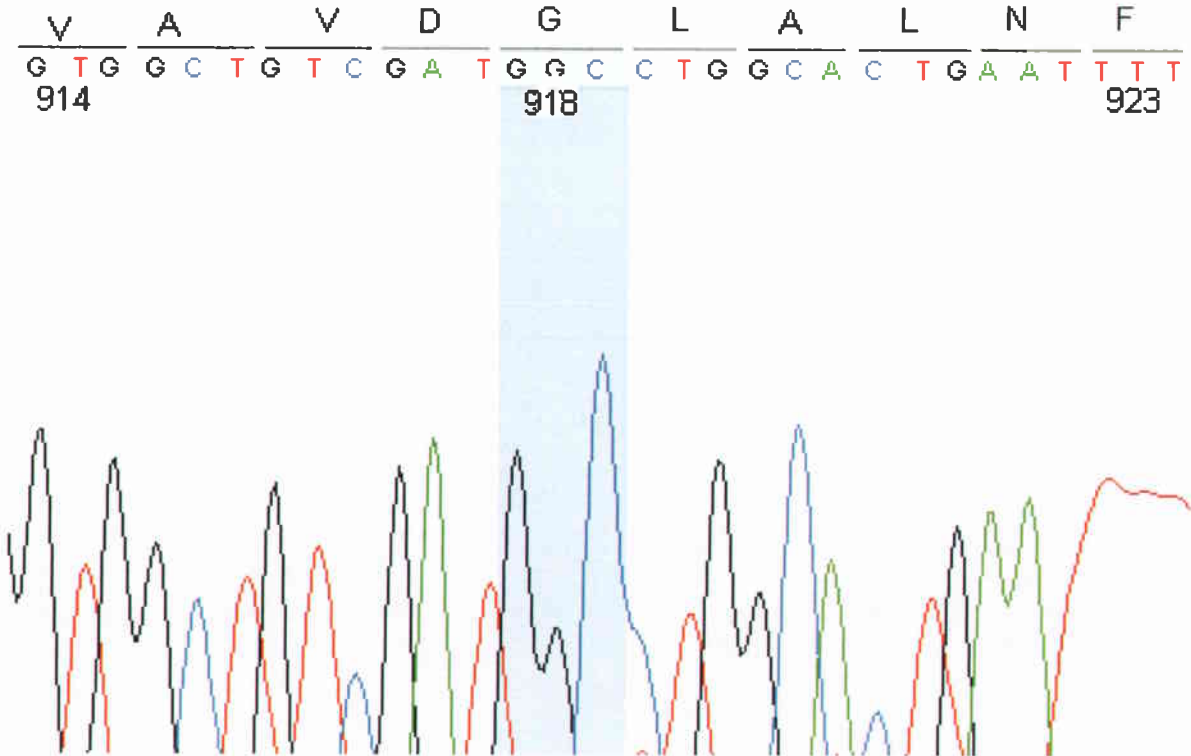
Şekil 33. ABCA1 Ekson 19 kodon 904 heterozigot c→t (CTG-TTG) polimorfizmi S.G. (27Y) kadın



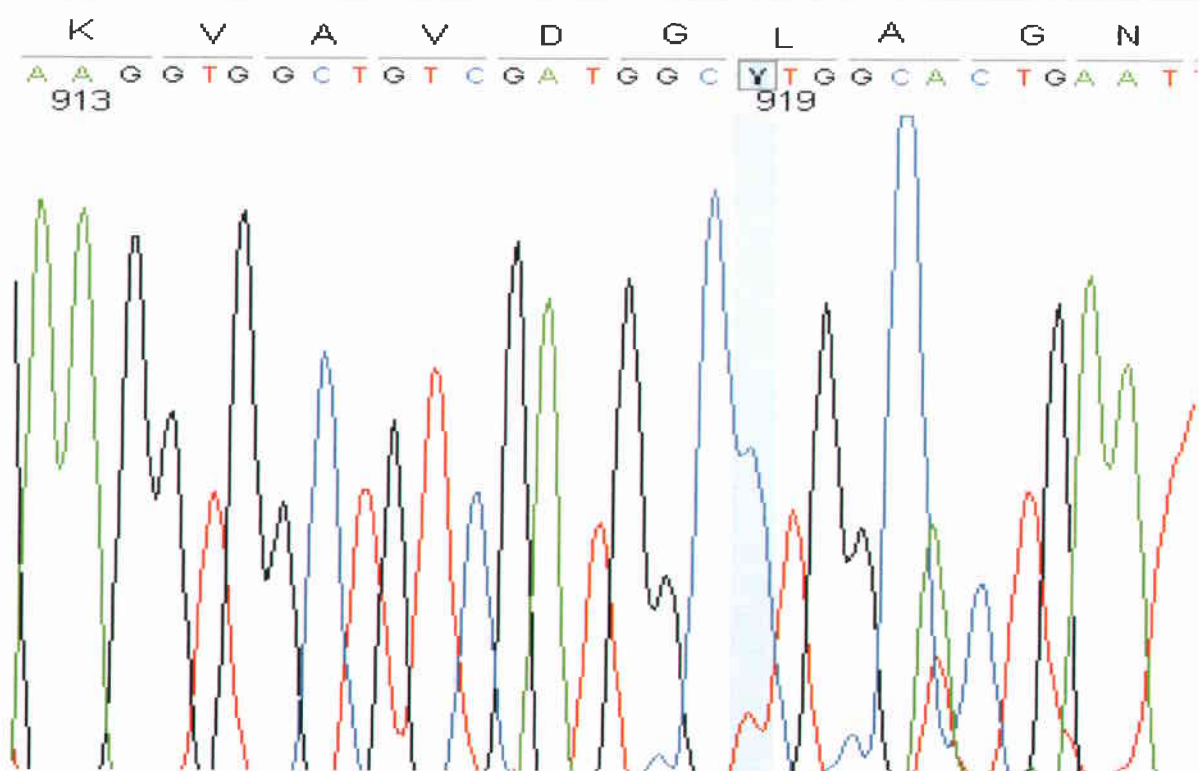
Şekil 34. ABCA1 Ekson 19 kodon 904 sağlıklı kontrol dizisi



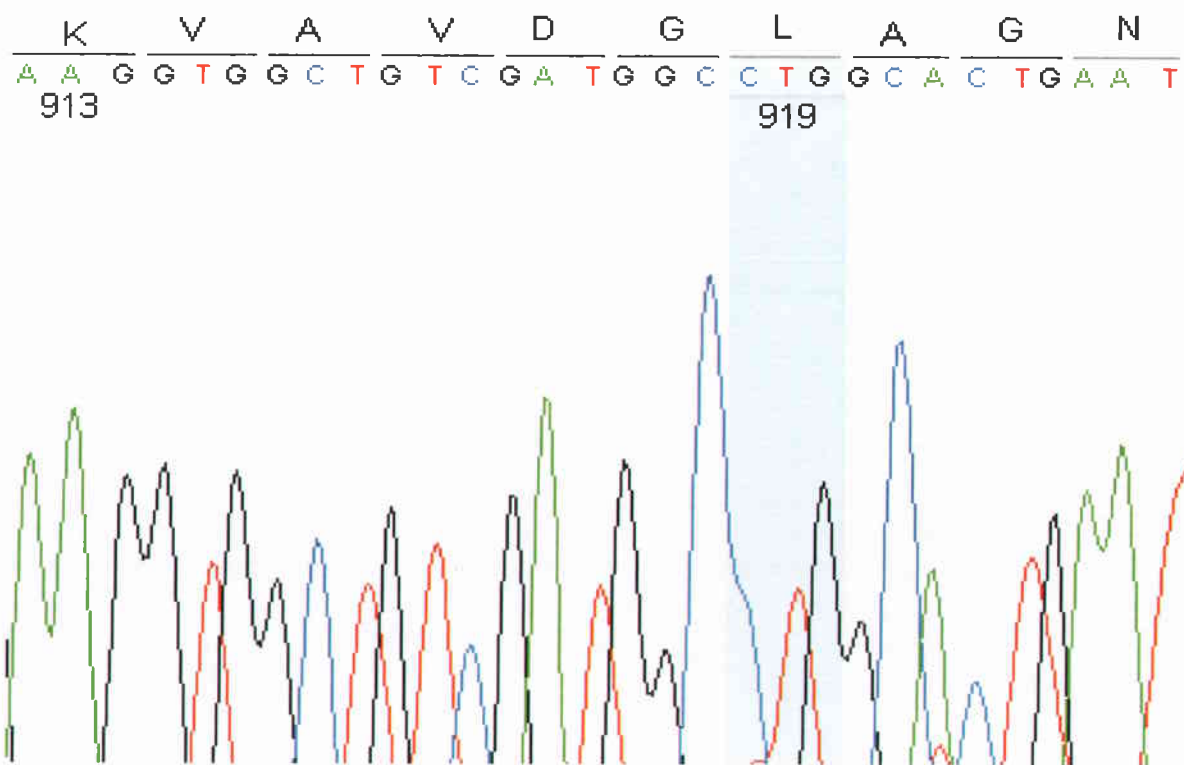
Şekil 35. ABCA1 Ekson 19 kodon 918 C insersiyonu K.B. (58Y) kadın



Şekil 36. ABCA1 Ekson 19 kodon 918 sağlıklı kontrol dizisi

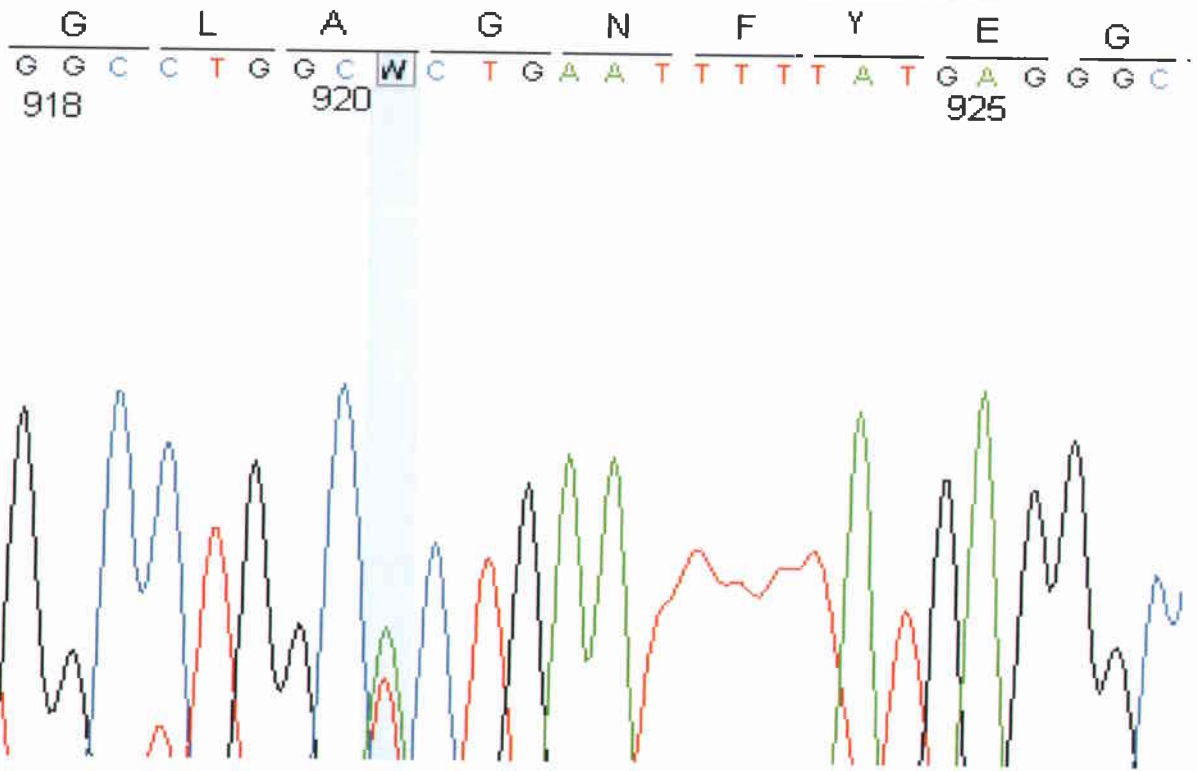


Şekil 37. ABCA1 Ekson 19 kodon 919 heterozigot c→t (CTG-TTG) polimorfizmi S.G. (27Y) kadın

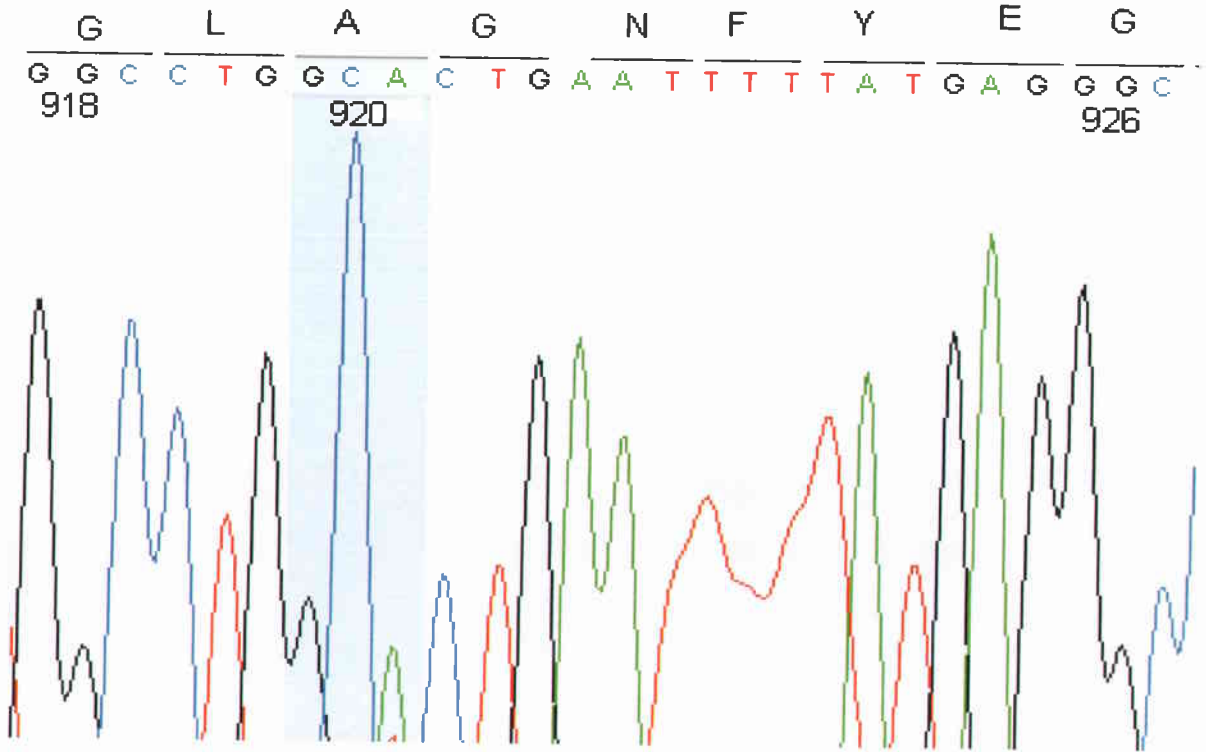


Şekil 38. ABCA1 Ekson 19 kodon 919 sağlıklı kontrol dizisi

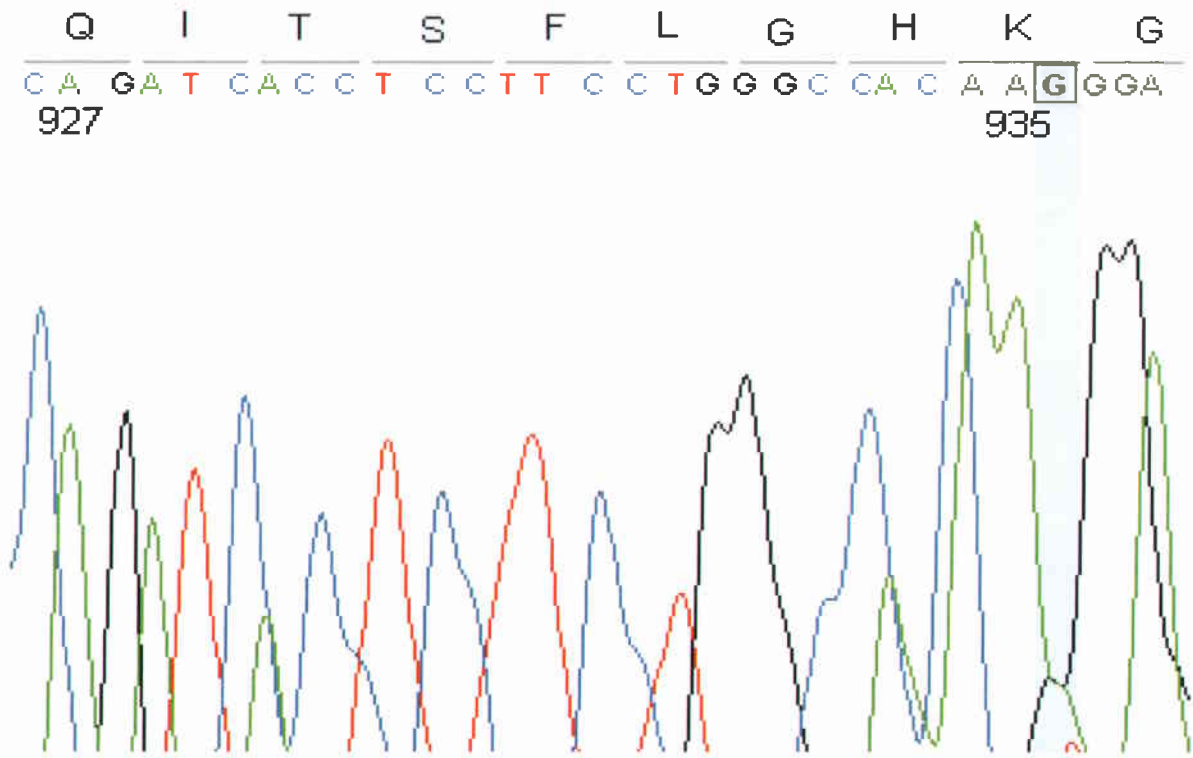




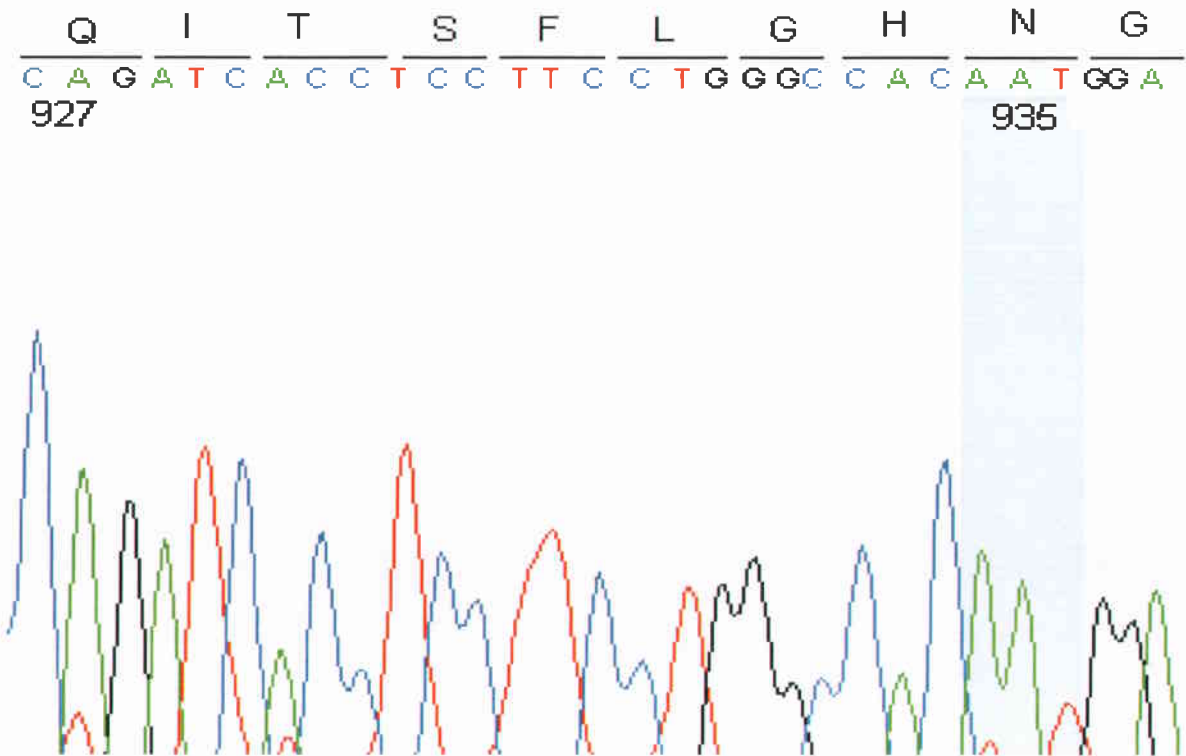
Şekil 39. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 heterozigot a→t (GCA-GCT) polimorfizmi T.B. (50Y) erkek



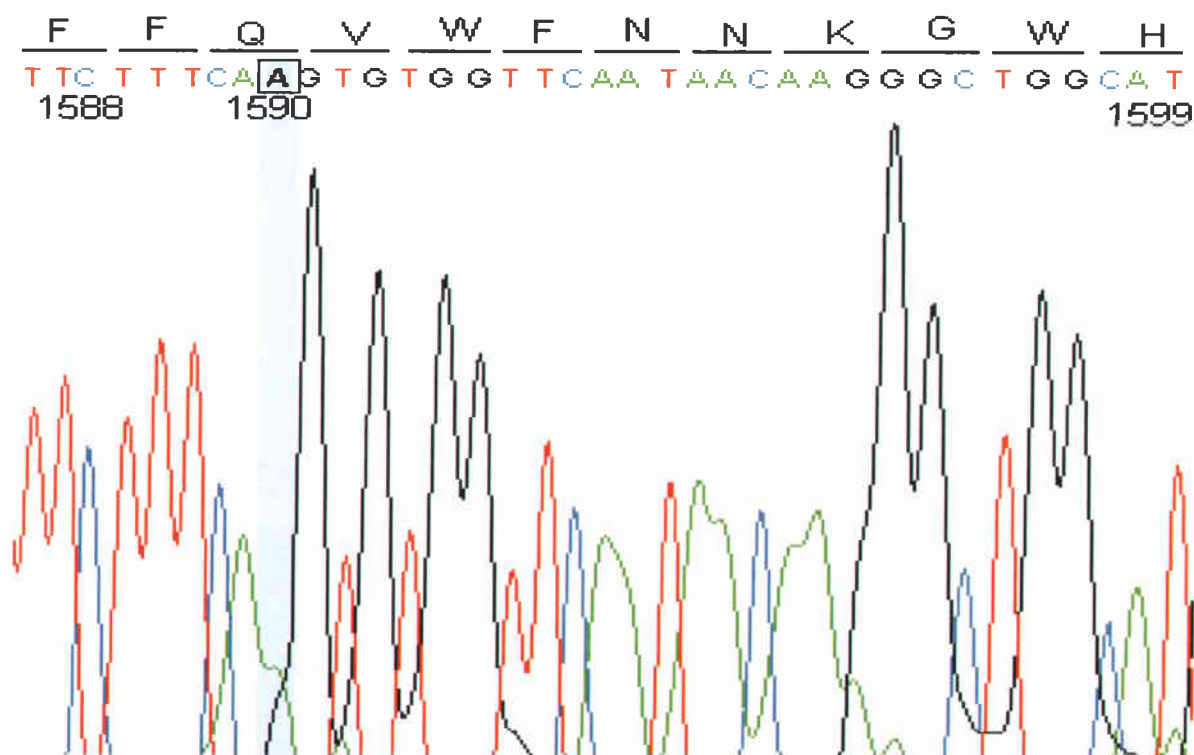
Şekil 40. ABCA1 Ekson 19 kodon 920 sağlıklı kontrol dizisi



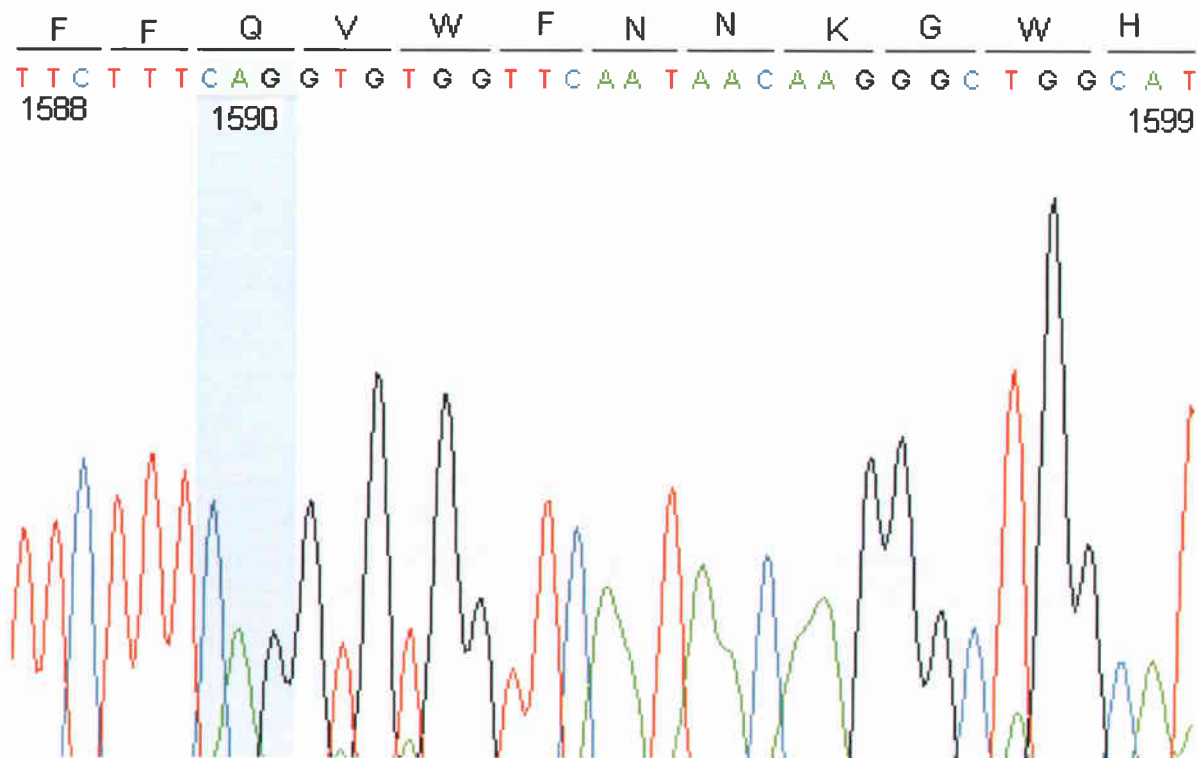
Şekil 41. ABCA1 Ekson 19 kodon 935 heterozigot t→g (AAT-AAG) polimorfizmi M.B. (77Y) erkek



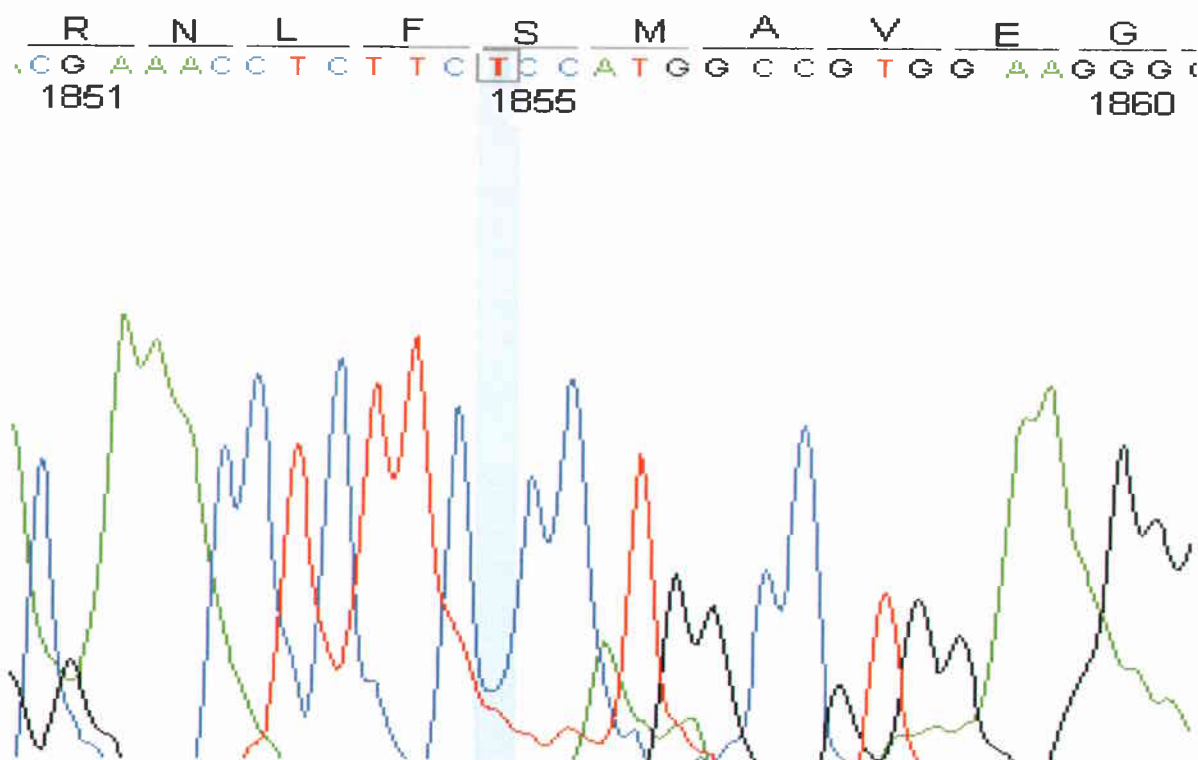
Şekil 42. ABCA1 Ekson 19 kodon 935 sağlıklı kontrol dizisi



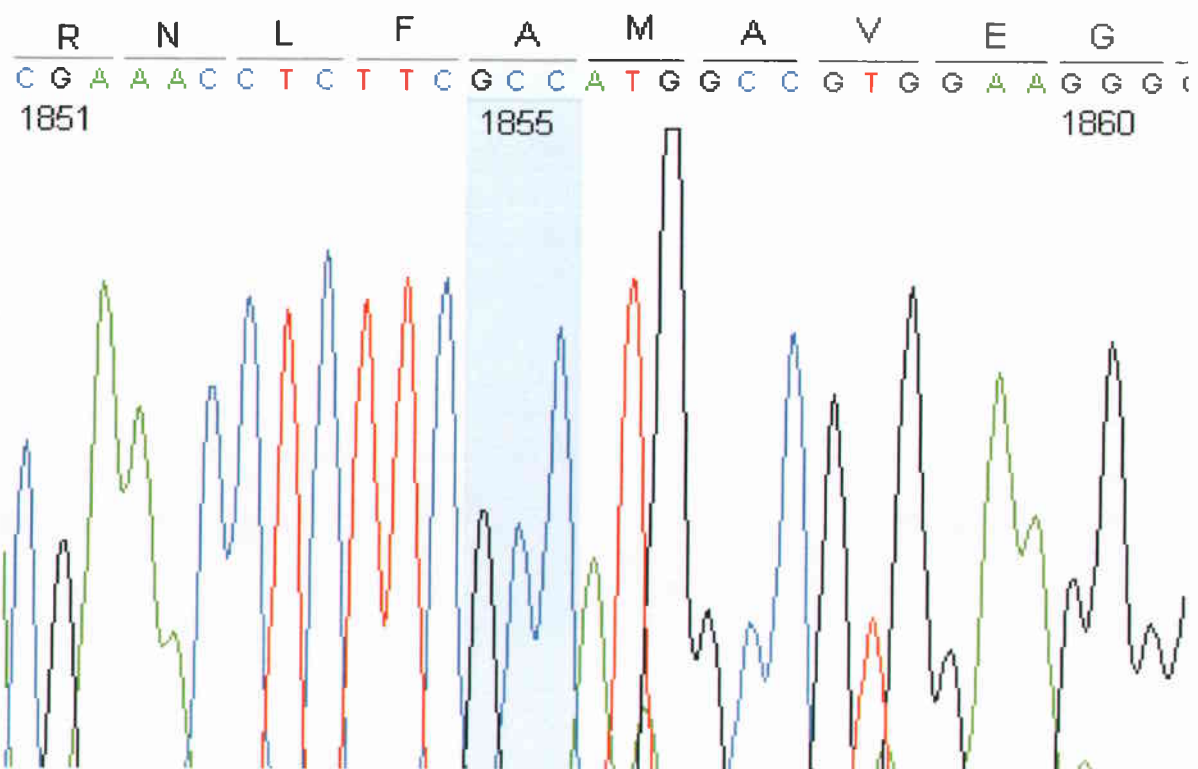
Şekil 43. ABCA1 Ekson7 kodon 1590 heterozigot g→ a (CAG-CAA) polimorfizmi E.E. (43Y) erkek



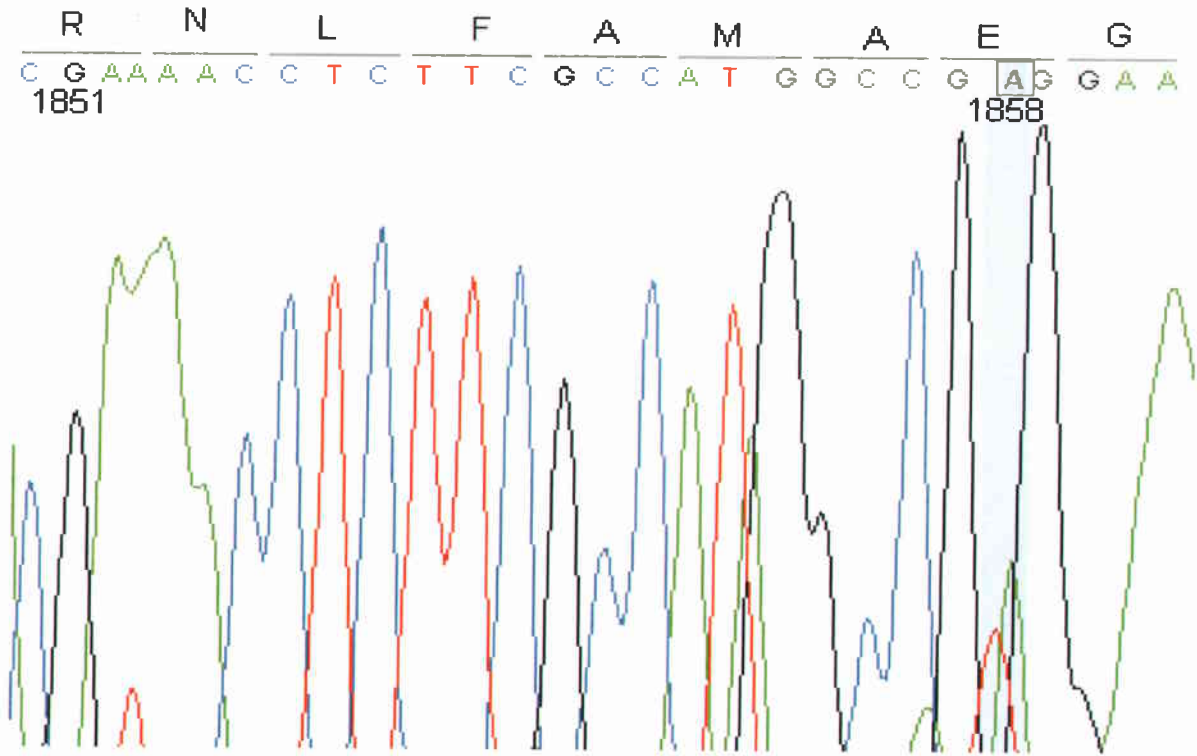
Şekil 44. ABCA1 Ekson 7 kodon 1590 sağlıklı kontrol dizisi



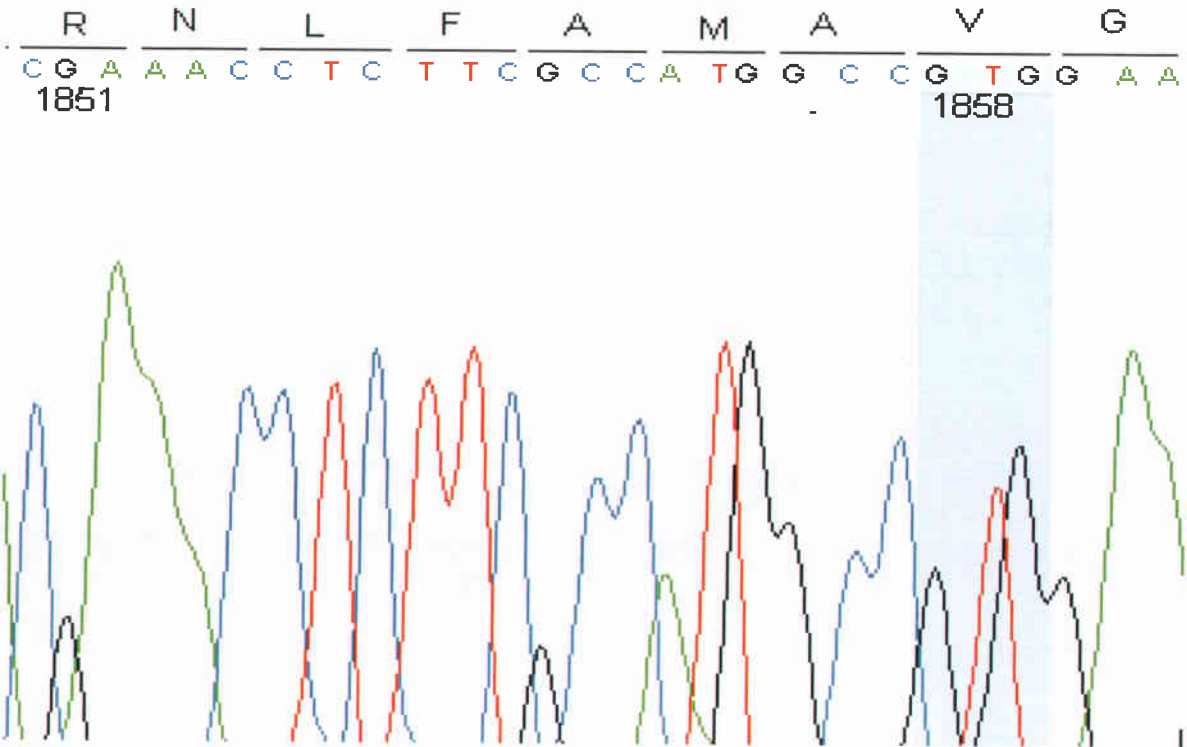
Şekil 45. ABCA1 Ekson 41 kodon 1855 heterozigot g→t (GCC-TCC) polimorfizmi M.B. (44Y) erkek



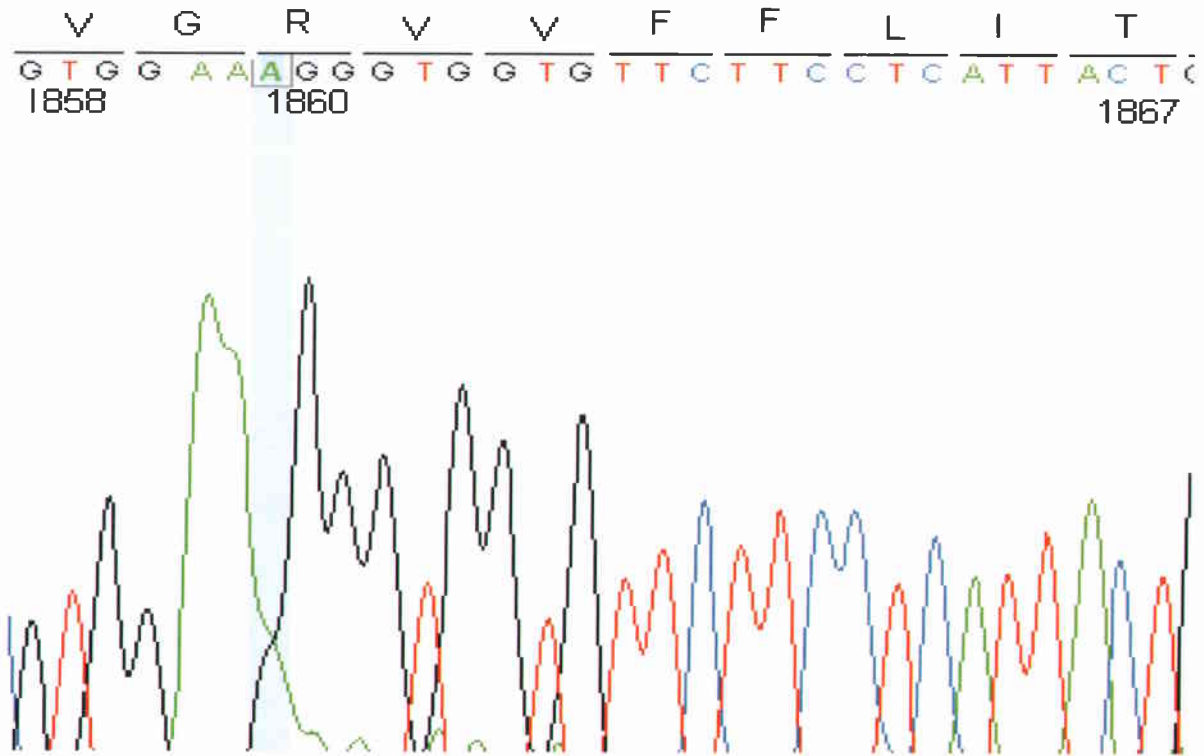
Şekil 46. ABCA1 Ekson 41 kodon 1855 sağlıklı kontrol dizisi



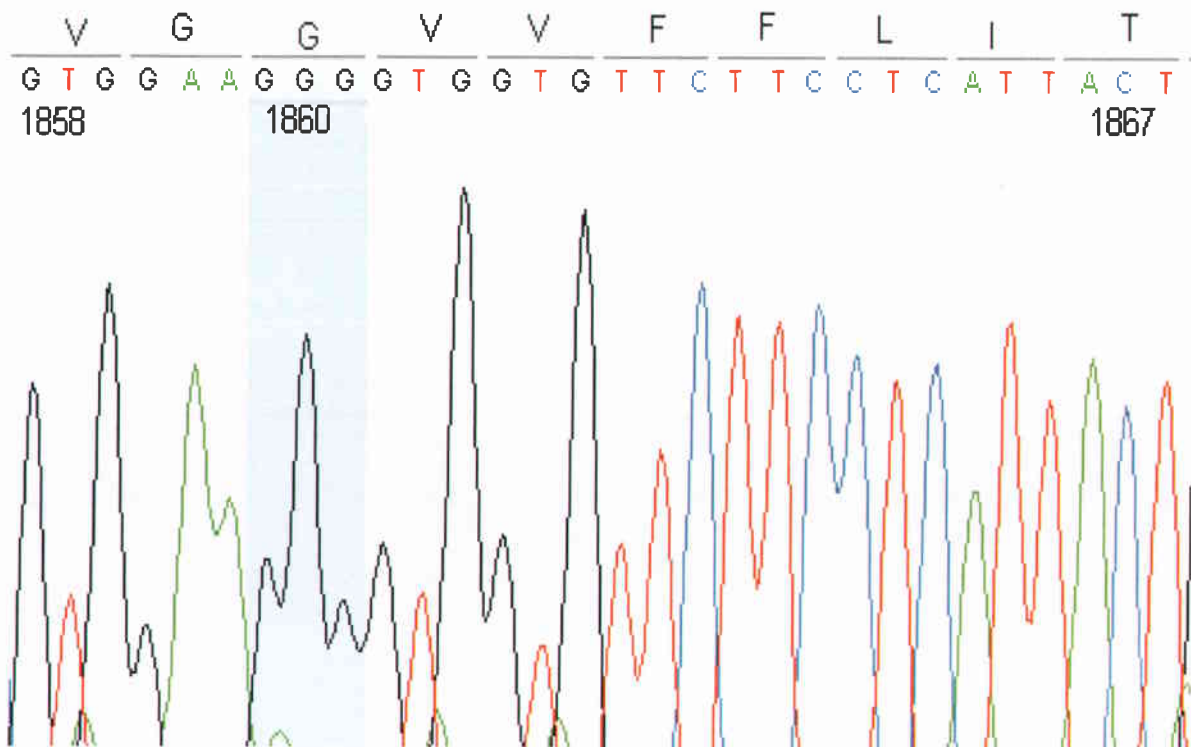
Şekil 47. ABCA1 Ekson 41 kodon 1858 heterozigot t→a (GTG-GAG) polimorfizmi M.M. (55Y) erkek



Şekil 48. ABCA1 Ekson 41 kodon 1858 sağlıklı kontrol dizisi

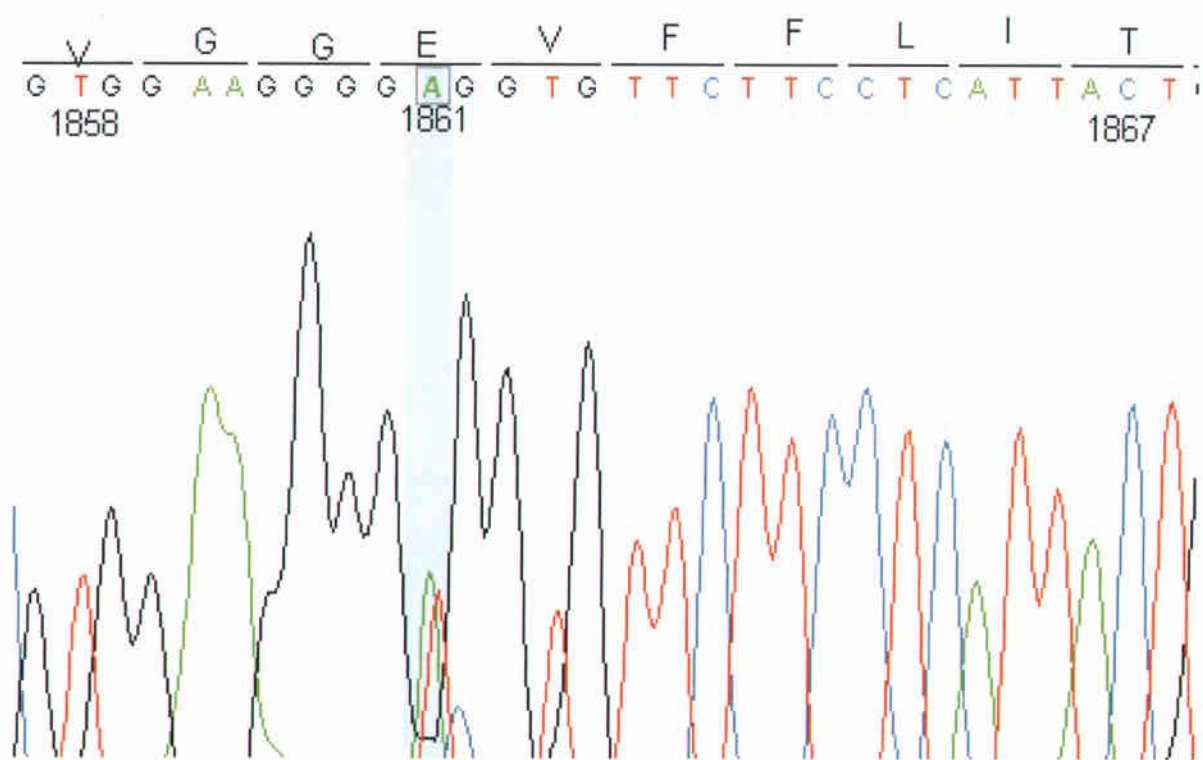


Şekil 49. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 heterozigot g→a (GGG-AGG) polimorfizmi A.A (50Y) kadın

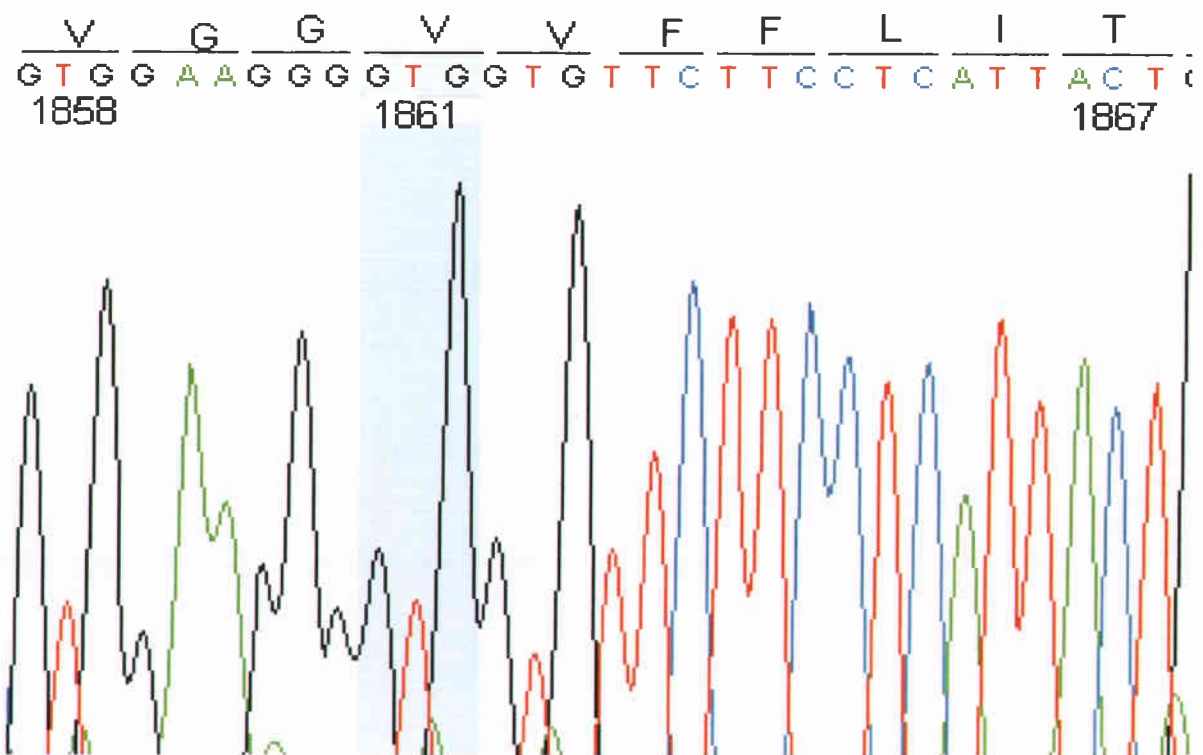


Şekil 50. ABCA1 Ekson 41 kodon 1860 sağlıklı kontrol dizisi

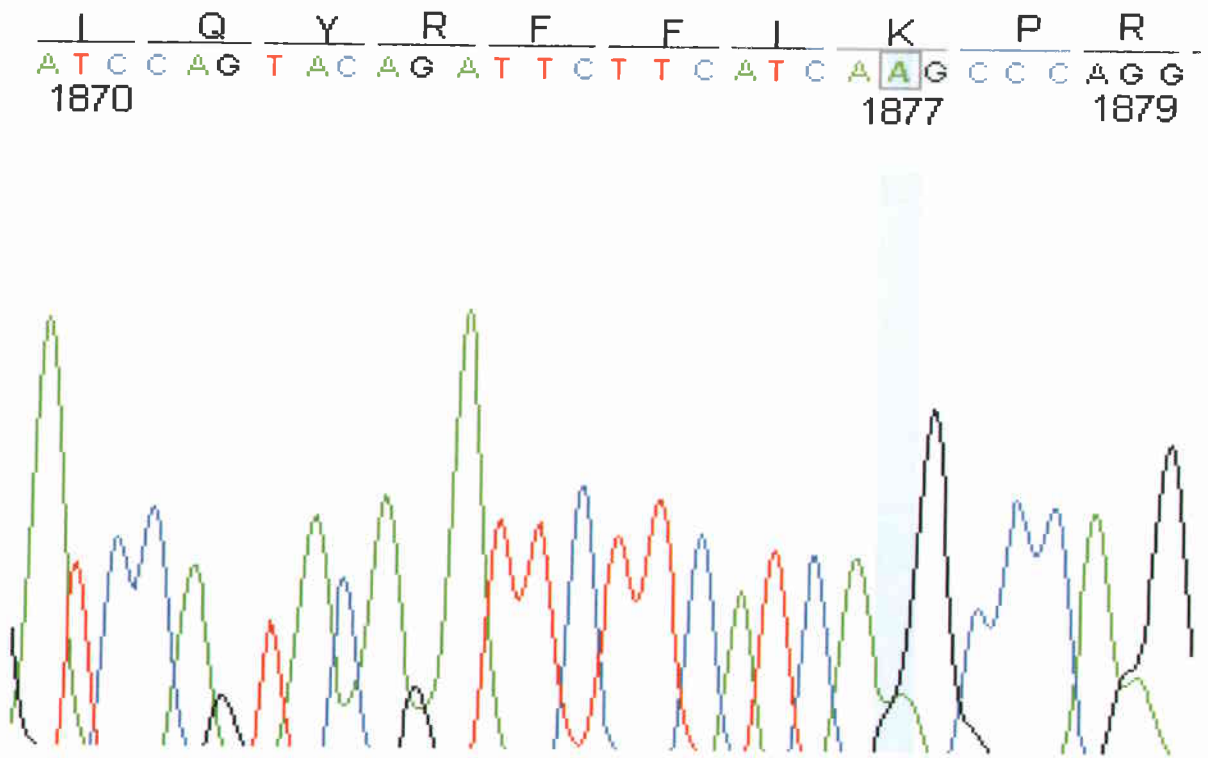




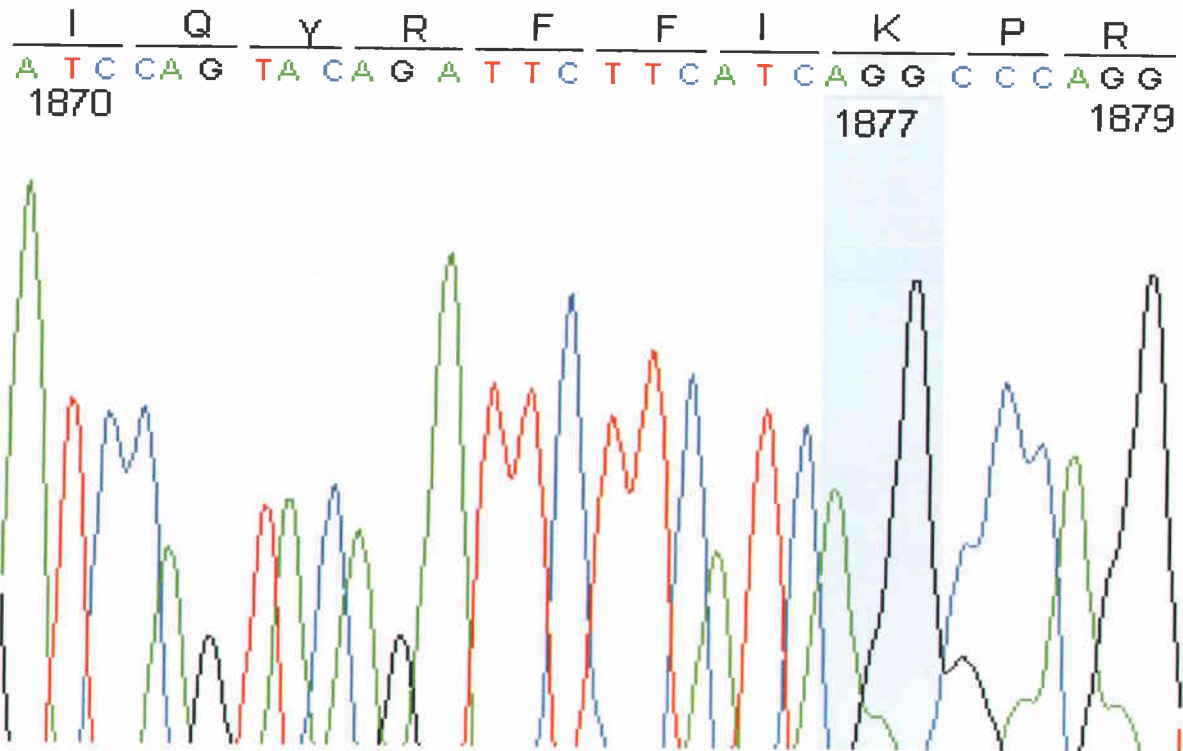
Şekil 51. ABCA1 Ekson 41 kodon 1861 heterozigot t→a (GTG-GAG) polimorfizmi S.Y (53Y) erkek



Şekil 52. ABCA1 Ekson 41 sağlıklı kontrol dizisi

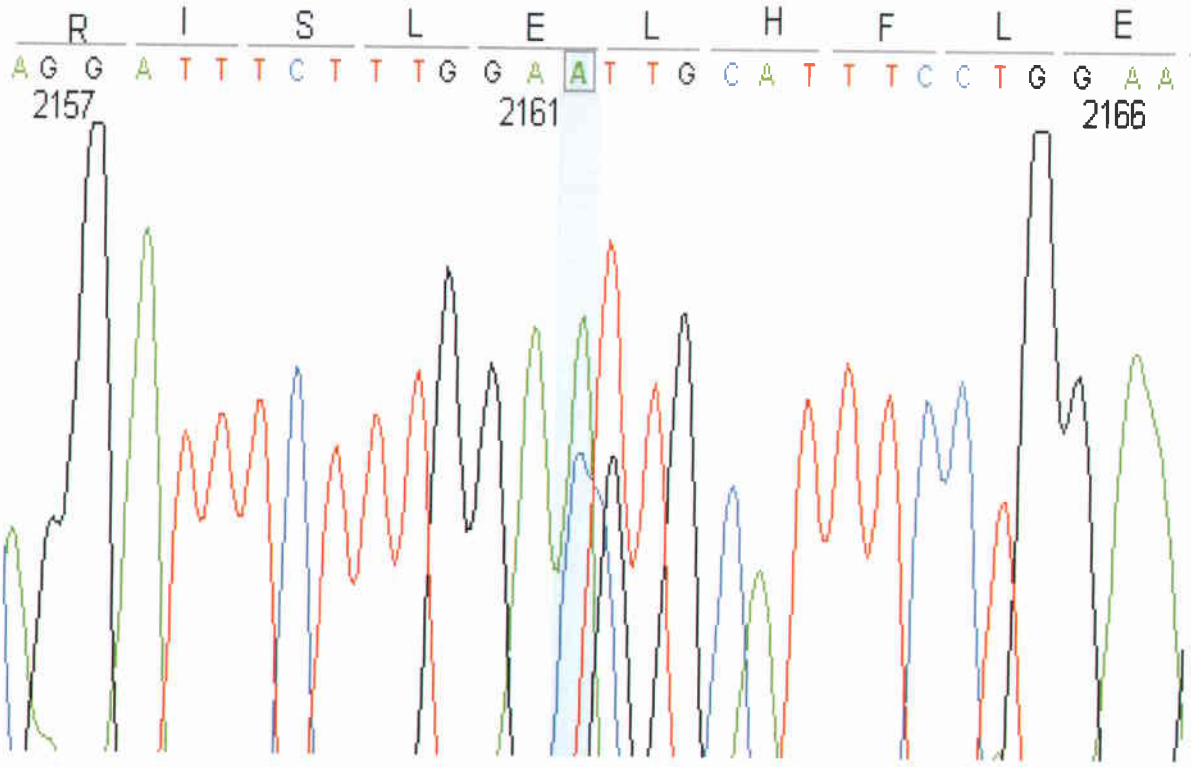


Şekil 53. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 heterozigot g→a (AGG-AAG) polimorfizmi İ.K (38Y) erkek

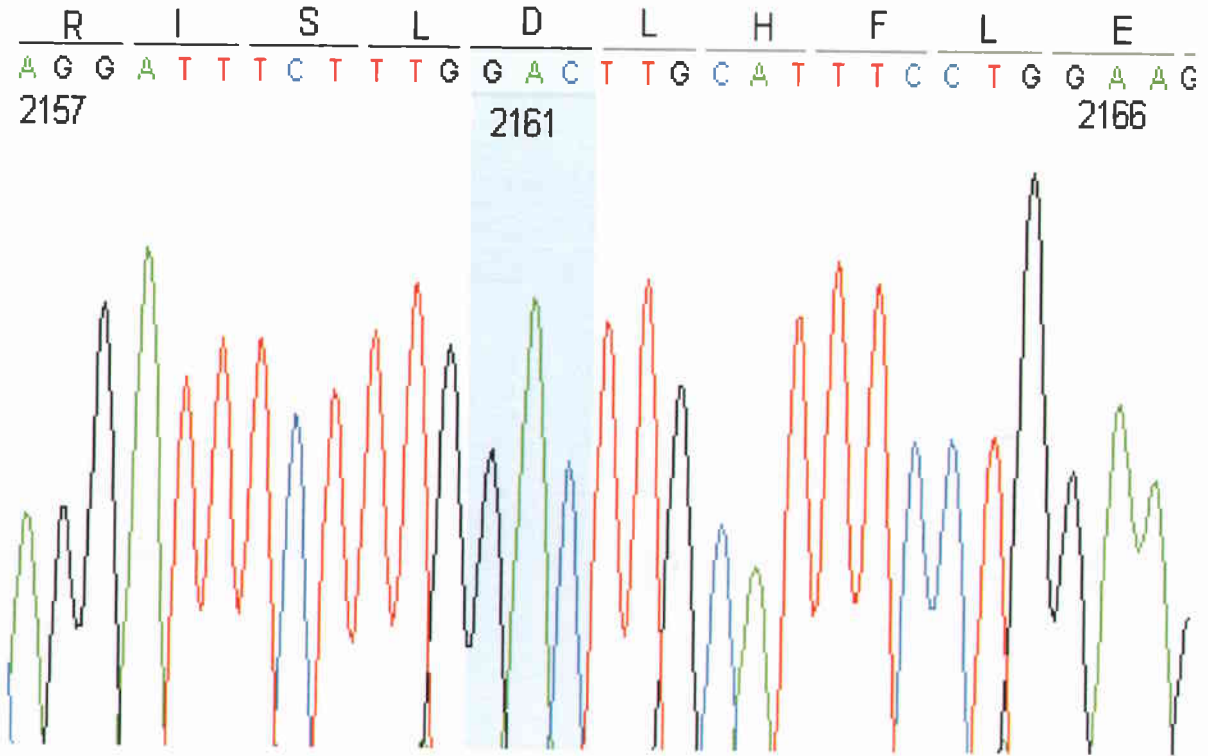


Şekil 54. ABCA1 Ekson 41 kodon 1877 sağlıklı kontrol dizisi

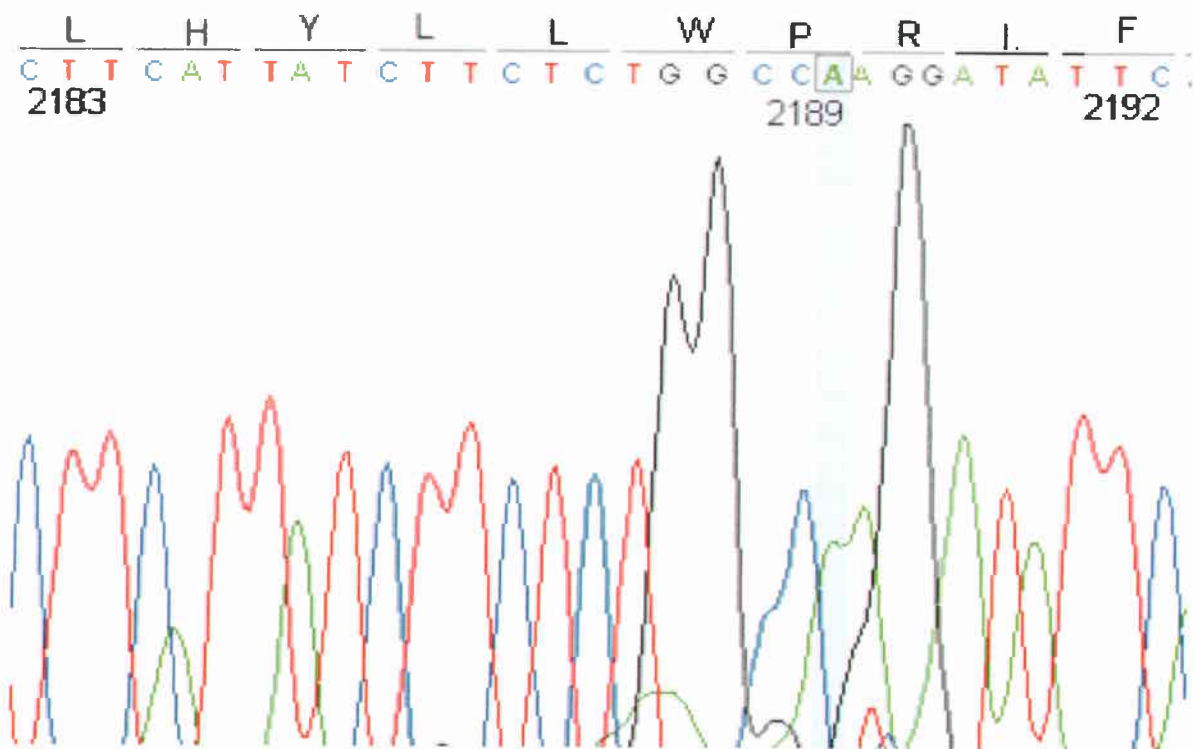




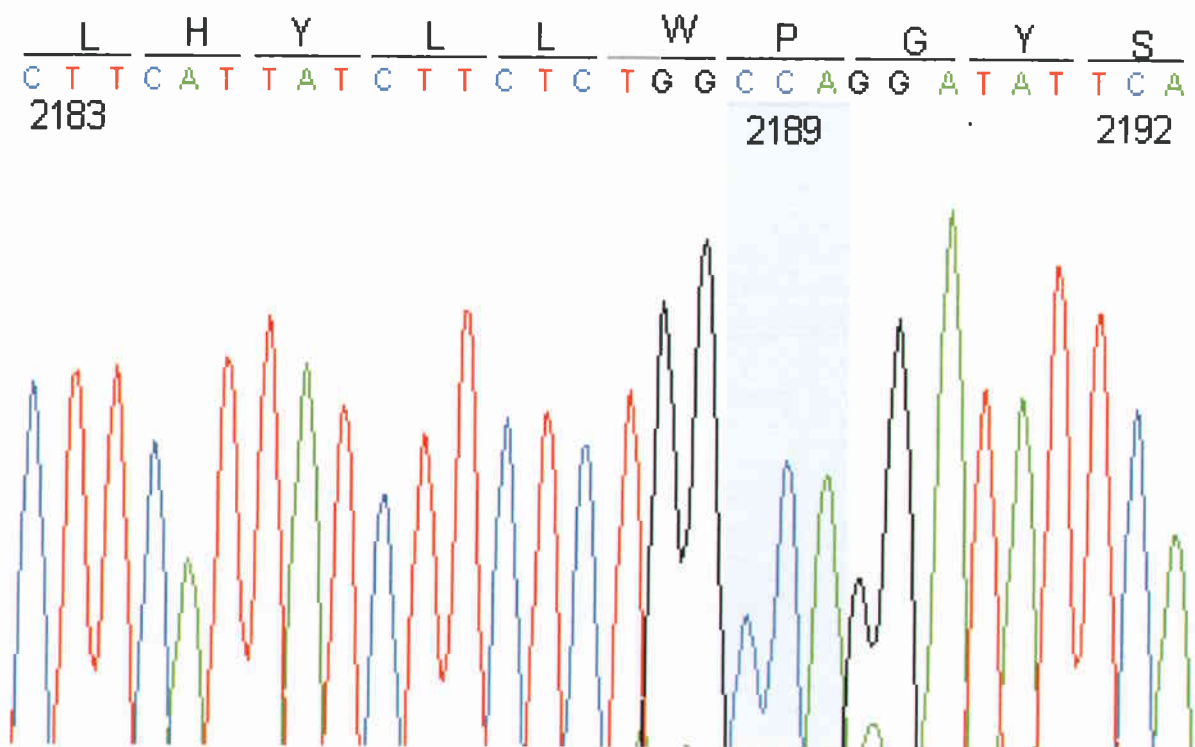
Şekil 55. ABCA1 Ekson 49 kodon 2161 heterozigot c→ a (GAC-GAA) polimorfizmi H.H. (40Y) kadın



Şekil 56. ABCA1 Ekson49 kodon 2161 sağlıklı kontrol dizisi



Şekil 57. ABCA1 Ekson 49 kodon 2189 A insersiyonu M.D. (47Y) erkek



Şekil 58. ABCA1 Ekson 49 kodon 2189 sağlıklı kontrol dizisi

Metabolik sendrom grubunda yer alan bireylerin allellere göre çalışma parametreleri ve karşılaştırmaları Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo14. ABCA1 genini ekson 7219.kodonda G/G ve G/A allellere göre çalışma parametrelerinin ortalamaları.

ABCA1 Ekson7 kodon 219	Allel	
	G/G n = 28	G/A n = 22
Glukoz (mg/dL)	135.1±73.1	97.4±45.2
HDL-K (mg/Dl)	41.5± 8.5	41.1±8.8
TK (mg/Dl)	190.3±50.5	200±51.6
TG (mg/dl)	279.2±203.2	223.3±105.5
LDL-K (mg/Dl)	131.2±43.4	145.8±41
SKB (mmHg)	148.3±21.6	151.3±23.6
DKB (mmHg)	90.1±11.8	83.8±13.0
BEL ÇEVRESİ (cm)	105.5±15.3	108.3±23.7

Tablo 14’deki parametrelerin karşılaştırılmasında student-t testinde (HDL-K, TK, LDL-K ve bel çevresi için) anlamlılık bulunmamakla birlikte ekson 7 219.kodonda G/A alleleline sahip olanların daha düşük glukoz ve trigliserit düzeyleri olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 15’de metabolik sendromlu bireylerin ekson 7 219. kodonda G/G ve A/A allellere göre çalışma parametreleri ve karşılaştırmaları verilmiştir.

Tablo 15. ABCA1 geninin ekson 7 219.kodonda G/G ve A/A allellere göre çalışma parametrelerinin ortalaması

ABCA1 Ekson 7 kodon 219	Allel	
	G/G n = 28	A/A n = 8
Glukoz (mg/dL)	126.7±59.8	135.0±66.6
HDL-K (mg/Dl)	40.6±8.9	42.9±7.6
TK (mg/Dl)	195.3±49.1	185.82±52.9
TG (mg/dl)	265.2±170.3	281.7±229.5
LDL-K (mg/Dl)	137.97±44.6	125.2±40.4
SKB (mmHg)	152.2±21.5	142.9±21.2
DKB (mmHg)	89.3±12.7	89.5±11.2
BEL ÇEVRESİ (cm)	106.9±17.6	104.2±14.7

Tablodaki parametrelerin karşılaştırılmasında student-t testinde (glukoz, trigliseritve LDL-K için) anlamlılık bulunmamakla birlikte A/A alleleline sahip olanlarda daha yüksek glukoz ve trigliserit değerleri olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 16. ABCA1 Ekson 19 920.kodonda A/A ve A/T allellerine göre çalışma parametrelerinin ortalaması

ABCA1 Ekson 19 kodon 920	Allel	
	A/A n = 52	A/T n = 6
Glukoz (mg/dL)	132.6±64.2	106.7±33.7
HDL-K (mg/Dl)	41.9±8.7	37.8±3.9
TK (mg/Dl)	190.5±52.1	202.7±31.6
TG (mg/dl)	274.5±202.0	245.3±89.3
LDL-K (mg/Dl)	130.7±44.0	154.0±29.9
SKB (mmHg)	149.3±22.0	143.3±19.7
DKB (mmHg)	89.3±12.3	88.3±11.7
BEL ÇEVRESİ (cm)	106.9±17.1	97.0±3.2

Tablo 16'daki parametrelerin değerlendirilmesinde student-t testinde (glukoz, trigliserit ve LDL-K için) anlamlılık bulunmamakla birlikte A/T alleleline sahip olanlarda daha düşük glukoz ve trigliserit değerleri ; daha yüksek LDL-K değeri olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 17. ABCA1 Ekson 41 1860. kodonda G/G ve G/A allellerine göre çalışma parametrelerinin ortalaması

ABCA1 Ekson 41 kodon 1860	Allel	
	G/G n = 55	G/A n = 3
Glukoz (mg/dL)	131.8±63.9	95.3±10.0
HDL-K (mg/Dl)	41.6±8.6	38.3±4.5
TK (mg/Dl)	192.8±51.1	171.0±31.2
TG (mg/dl)	264.65±189.1	396.0±269.6
LDL-K (mg/Dl)	134.6±43.0	106.3±44.5
SKB (mmHg)	149.4±22.0	136.7±5.8
DKB (mmHg)	89.7±12.2	80.0±0.0
BEL ÇEVRESİ (cm)	106.5±16.4	94.0±15.1

Tablo 17'deki parametrelerin karşılaştırılmasında student-t testinde (glukoz, total kolesterol, trigliserit ve LDL-K için) anlamlılık bulunmamakla birlikte, ekson 41 1860.kodonda G/A alleleline sahip olanlarda daha düşük glukoz, TK ve LDL-K değerleri; daha yüksek trigliserit değerleri olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 18. ABCA1 Ekson 41 1877.kodonda G/G ve G/A allellere göre çalışma parametrelerinin ortalaması

ABCA1 Ekson 41 kodon 1877	Allel	
	G/G n = 52	G/A n = 6
Glukoz (mg/dL)	129.9±59.6	129.5±87.5
HDL-K (mg/Dl)	41.6±8.7	40.3±6.2
TK (mg/Dl)	193.3±52.0	178.5±31.0
TG (mg/dl)	275.2±201.5	238.8±97.6
LDL-K (mg/Dl)	134.0±44.2	125.7±35.0
SKB (mmHg)	147.9±21.7	155.0±22.6
DKB (mmHg)	88.9±11.8	92.5±15.4
BEL ÇEVRESİ (cm)	105.6±17.0	108.5±10.1

Tabloda parametrelerin istatistiksel karşılaştırılmasında student-t testinde (total kolesterol, trigliserit ve LDL-K için) anlamlılık bulunmamakla birlikte, ekson 41 'de 1877.kodonda G/A alleleline sahip olanlarda daha düşük total kolesterol, LDL-K ve trigliserit değerleri olduğu anlaşılmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Metabolik sendrom (MS), tip II diyabet ve kardiyovasküler hastalığa artmış risk sergileyen ve genelde abdominal obeziteye eşlik eden bir risk faktörleri kümesidir. Kümelenen risk faktörleri yüksek trigliserit ve düşük HDL-kolesterolden oluşan aterojen dislipidemi, yüksek kan basıncı ile glukoz, protrombik ve proinflamatuvar durumlardan ibarettir. Çok etkenli bir patogeneze sahip metabolik sendromun altında yatan başlıca iki neden abdominal obezite ile insülin direncidir; yaşlanma, fiziksel inaktivite, genetik unsurlar gibi tetikleyici faktörlerin varlığı da bilinmektedir (2).

Metabolik sendrom ile ilgili KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın ortaklaşa yürüttükleri Trabzon ve çevresinde Metabolik Sendrom ve ilişkili faktörler çalışmasının bir alt grup çalışması olarak metabolik sendrom genetiğine yönelik bu çalışma planlanmıştır. Bu projede metabolik sendrom prevalansı Trabzon ve çevresinde taranan 2601 kadın (%54.1) ve 2208 erkek (%49.9) olmak üzere 4809 kişi dahil edilmiştir (1).

Metabolik Sendrom ile ilgili çalışmalar, metabolik sendromun bileşenleri içinde insülin direncinin diğerleri üzerine etkisini ve potofizyolojisindeki kritik rolü ortaya çıkarmaktadır. Metabolik sendrom bileşenlerini taşıyan bir çok insanda insülin aracılı glukoz metabolizması bozuklukları olduğu epidemiyolojik çalışmalarla desteklendi. Fakat ; her obez insanda insülin direnci olmadığı veya olanlarda da metabolik sendrom prezentasyonunun değişik fenotiplerde olabildiği görülünce, genetik mirasın etkisinin araştırılması önem kazanmıştır (17).

Robitaille ve ark. 720 yetişkini kapsayan Quebec aile çalışmasında, lipid ve glukoz metabolizmasını düzenleyen bir nükleer faktör olan peroksizom proliferatör aktiflenmiş reseptör-gamma (PPAR- $\gamma$ )'yı kodlayan genin P12A polimorfizmini diyetdeki yağ miktarı ile ilişkili bulmuştur. A12 alleli taşıyanların yağ kütesini, vücut kitle indeksi (VKİ), bel çevresi, deri altı ve viseral yağ dokusundaki P12/P12 homozigot allele göre daha yüksek bulmuşlardır (89).



Kishida ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada adiponektin geninde I164T missense mutasyonunu rapor etmişlerdir. Adiponektinin globuler domainindeki 164. pozisyonda izolösin yerine treonin gelmesinin metabolik sendromun gelişmesinde rol oynayan hipoadiponektinemiye yol açtığını belirtmişlerdir.

Metabolik faktörlerin bir kümesinin koroner arter hastalığına (KAH) yol açtığı bilinmektedir. Hiperinsülinemi, KAH'nın gelişmesiyle ilişkili olan hipertansiyon, düşük HDL-kolesterol hipertiglisidemi, abdominal obezite ve bozulmuş glukoz toleransının önünde gelen bir faktördür (11).

Azalmış HDL-kolesterol seviyeleri, prematüre koroner arter hastalarında görülen en genel lipid anormalliğidir (58).

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı süper ailesi, metabolik ürünler, lipid ve steroller ve ilaçları da içeren çok çeşitli substratları hücre içi ve hücre dışı membranlar arasında taşıyan membran proteinlerini içerir. Bazı ABC taşıyıcılarının aşırı sentezlenmesi kanser hücre hatlarında ve tümörlerde çoklu ilaç direncine (MDR) sebep olur. Bu genlerdeki genetik varyasyonlar kistik fibrozis, nörolojik hastalıklar, retinal dejenerasyon, kolesterol ve safra taşıma defektlerini içeren Mendel ve kompleks kalıtmı insan hastalıklarına sebep olur (44).

ABCA1 geni hücrel kolesterol çıkışını (effluks) düzenleyen CERP proteinini kodlar. ABCA1 genindeki mutasyonlar, allelik hastalıklar olan Tangier Hastalığı (TD) ve ailesel hipoalfalipoproteinemiye (FHA) neden olur. ABCA1 genindeki mutasyonları yoğun olarak çalışan Marcil ve ark. 5 farklı grupta ABCA1 geninin ekson 18'deki C266T, ekson 22'deki T3212C, ekson 49'daki C6370T ve ekson 41'deki 6 baz çiftlik çifte delesyon (dd) mutasyonlarını düşük HDL-kolesterol seviyeleri ile ilişkili bulmuşlardır. Hasta gruplarının 3'ünde KAH bulmuşlardır. Marcil ve ark. bir başka çalışmada Tangier ve FHA hastalığı olan bireylerde ekson 13'de A1730G ve ekson 30'da T4369C mutasyonlarına rastlamışlardır (90). Nishida ve ark. bir başka çalışmada TD'li Japon hastalarda G1158A/A255T mutasyonunu bulmuşlardır. Bu bölge ABCA1'in hücre dışı bölgesinde yer almaktadır ve fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Tanaka ve ark. ABCA1'in birinci hücre dışı domainindeki üç farklı mutasyonun (R587W, W590S ve Q597R) hücre içindeki yerleşimini ve fonksiyonlarını ABCA1-GFP (Yeşil Floresan Protein) kullanarak, HEK293 hücrelerinde çalışmışlardır. R587W ve Q597R mutasyonlarını yüksek mannoz tip'ten kompleks tip'e kadar oligosakkaridlerin bozulmuş işlenmesiyle ve plazma membranına yanlış yerleşimiyle ilişkili bulmuşlardır; ancak W590S mutasyonu herhangi

bir fonksiyon bozukluğu göstermemiştir (56). Clee ve ark. Avrupalıların % 46'sında bulunan R219K mutasyonuna sahip bireylerde, taşımayanlara göre aterosklerozun ilerlemesini daha yavaş bulmuşlardır (78). Alenezi ve ark. hücrel lipid akışını 44 düşük HDL-K seviyesine sahip, 9 ABCA1 geni mutasyona uğramış birey ve 15 sağlıklı kontrolde çalışmışlar ve düşük HDL-K seviyelerini, metabolik sendromlu hastalarda hücrel lipid akışı defektine bağlı bulmamışlardır (91).

ABCA1 geninin 50 eksonu bulunmaktadır. Bu çalışmada literatürde en çok geçen 6 ekson (7, 15, 19, 36, 41 ve 49)'daki polimorfizmlerin (SNP'ler) belirlenmesi seçilmiştir. Literatürde ABCA1 varyantları (ABCA1 polimorfizmi) metabolik sendromda çalışılmamıştır. Koroner arter hastalığı ,ailesel hiperalfalipoproteinemi ve Tangier Hastalığı ile ilgili ekson 7, ekson 15, ekson 19, ekson 41, ekson 49 polimorfizm çalışmaları Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. ABCA1 Ekson 7, 15, 19, 41, 49 için tespit edilen SNP'lerin TD, FHA ve KAH ile ilişkisi

Ekson	SNP	İlişki	Kaynak	Yıl
7	g→a R219K	TD TD	M.E.Brousseau (83)	2001
15	c→a I680	TD	J.Wang (77)	2000
19	a→c N935H	TD	G.Zhigang (92)	2002
41	Δdd 568-5623 1833-1834	TD	M.Marcil (90)	1999
49	c→t R2144X	KAH FHA	R.Frikke-Schmidt (88)	2004

Tabloda belirtilen polimorfizmlerden ekson 7 kodon 219 'da R219K polimorfizmi 58 adet metabolik sendromlu hasta grubumuzun 30'unda (%52) tespit edilmiştir. Bunlardan 8 tanesi homozigot (A/A) ve 22 tanesi heterozigot (G/A)'tur. Ekson 7 219.kodondaki vakalar kan glukozlarının seviyelerine göre sınıflandırıldığında G/G alleleline sahip olan 28 kişiden 126 mg/dL'nin altında olan birey sayısı 17, üstünde olanlar 11 kişi iken (oran 1.5); G/A polimorfizmi taşıyanlarda 126 mg/dL'nin altında düzeyi olanlar 9 kişi, üstünde olanlar 13 kişidir (oran 1.4). A/A alleleline sahip hastalarda bu oran



1.6'dır. Dolayısıyla bu SNP'nin kan glukoz değerlerine etkili olmadığı sonucuna varılabilir.

Ekson 7 kodon 219'daki vakalar kandaki trigliserid seviyelerine göre sınıflandırıldığında G/A alleleline sahip olanlarda daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla bu polimorfizmin ateroskleroza karşı olumlu rolü ileri sürülebilir.

Ekson 15 kodon 680'deki c→a ATC-ATA polimorfizmi bizim vakalarımızda sadece 2 kişide bulunmuştur. Çalışmamızdaki en önemli polimorfizmler ekson 19'daki kodon 920 GCA-GCT, ekson 41 kodon 1860 GGG→AGG ve ekson 41 kodon 1877 AGG→AAG polimorfizmleridir. Bu polimorfizmler metabolik sendrom için ilk defa gösterilmektedir. Yine çalışmamızda ekson 7, ekson 19 ve ekson 49'da 6 adet insersiyon bulunmuştur

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Metabolik sendromlu olgularda ABCA1 için ekson 7, ekson 15, ekson 19, ekson 36, ekson 41 ve ekson 49 'daki polimorfizmler DNA dizi analiziz yöntemi ile çalışılmıştır.
2. Ekson 7 kodon 219 da AGG-AAG polimorfizmi kontrol grubunda 11 kişide metabolik sendromlu 30 kişide tespit edildi. Bu durum gen frekansları yönüyle anlamlı farklılık gösterdi.
3. Ekson 19 kodon 920 de GCA-GCT polimorfizmi metabolik sendromlu 6 kişide tespit edildi.
4. Ekson 41 kodon 1860 da GGG-AGG polimorfizmi metabolik sendromlu 3kişide tespit edildi.
5. Ekson 41 kodon 1877 de AGG-AAG polimorfizmi metabolik sendromlu 6 kişide tespit edildi.
6. Ekson 15 kodon 680 DE ATC-ATA polimorfizmi metabolik sendromlu 1 kişide tespit edildi.
7. Tespit edilen polimorfizmler kan glukozu, HDL-K, LDL-K TG, TK, SKB, DKB ve bel çevresi değerlerine göre karşılaştırıldığında metabolik sendromla ilişkili olabilecekleri söylenebilir.
8. Çalışma Metabolik sendromun genetik temelli olabileceğine ABCA1 proteini polimorfizmleri ile katkıda bulunmuştur.

## ÖZET

### METABOLİK SENDROMDA ABCA1 POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Metabolik sendrom koroner kalp hastalığı risk faktörlerinin pek çoğunun bir arada bulunduğu kompleks bir hastalıktır. Metabolik sendrom risk faktörleri, aterojenik dislipidemi, yüksek arteriyel kan basıncı, insülin direnci ve /veya glukoz intoleransı, proinflatuvar ve protrombik durum olarak belirtilmiştir. NCEP ATP III kriterlerine göre en az üç kriteri bulunan 58 hasta (32 kadın, 26 erkek) ve 43 sağlıklı kontrol (24 kadın, 19 erkek) çalışma grubunda yer aldı. Grupta yer alan şahısların ABCA1 geni 7, 15,19, 36, 41 ve 49. eksonlarının dna dizi analizi yapıldı. Ekson 7’de; 219. kodonda G/A alleli 22 hastada, A/A alleli 8 hastada, ekzon 19’da; 920. kodonda A/T alleli 6 hastada; ekson 41’de 1877. kodonda G/A alleli 6 hastada, ekson 41’de 1860. kodonda G/A alleli 3 hastada bulundu. Sağlıklı kontrollerde, ekson 7; 219. kodonda 3 kişide A/A alleli, 8 kişide G/A alleli bulundu. Hastalarda ve kontrol grubunda alleller arasında parametreler (glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K, bel çevresi, sistolik kan basıncı, diastolik kan basıncı) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak hasta ve kontrolde, ekzon 7; 219. kodon, ekzon 19; 920. kodon ve ekzon 41; 1877. kodonda allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü.

Sonuç olarak ABCA1 ekzon 7, 19 ve 41’de polimorfizm görülmüş olup metabolik sendrom hastalarında allel frekansları artmaktadır. ABCA1 proteinin polimorfizminin, metabolik sendromun genetik temelini ortaya koymaya katkıda bulunabileceği kanısına varılmıştır.

## **SUMMARY**

### **DETERMINATION OF ABCA1 POLYMORPHISM IN METABOLIC SYNDROME**

Metabolic syndrome is a complex disease including most of the coronary heart disease risk factors. Atherogenic dyslipidemia, high arterial blood pressure, insulin resistance and/or glucose intolerance, proinflammatory and prothrombic state are defined as the risk factors of metabolic syndrome. According to NCEP ATP III guidelines 58 patient (32 women, 26 men) having all the five criteria of metabolic syndrome and 43 healthy control (24 women, 19 men) are included to the study group. DNA sequence analysis on ABCA1 gene for exons 7, 15, 19, 36, 41 and 49 were performed on all the patients and controls in the study group. In exon 7, 22 patient had G/A allele, 8 patient had A/A allele of codon 219. In exon 19, 6 patient had A/T allele of codon 920. In exon 41, 3 patient had G/A allele of codon 1860, 6 patient had G/A allele of codon 1877. In controls, only 3 subject had A/A allele and 8 subject had G/A allele of codon 219 of exon 7. Between parameters (glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, waist circumference, systolic blood pressure, diastolic blood pressure) of belonging various alleles of patients and controls, there were no significant difference. But there were significant difference on account of allele frequencies among codon 219 of exon 7, codon 920 of exon 19 and codon 1877 of exon 41. Finally, we determined increased allele frequencies of those polymorphisms (SNPs) in codon 219 of exon 7, codon 920 of exon 19, codon 1877 of exon 41. It was concluded that polymorphism of ABCA1 protein may be contributed to establish the biochemical genetic basis of metabolic syndrome.

## 9. KAYNAKLAR

1. Hacıhasanoğlu M.A. Trabzon İlinde Metabolik Sendrom Prevalansı Ve Prevalansı Etkileyen Risk Faktörleri İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı KTÜ Tıp Fakültesi Yan Dal Uzmanlık Tezi Trabzon 2006
2. Onat A, Hergenç G, Can G, İki metabolik sendrom tanımının kardiyometabolik risk öngörüsünün aynı kohortta prospektif yolla değerlendirilmesi ve halkımız için en uygun tanımın seçilmesi, Anadolu Kardiyol.Derg. 7:29-34,2007
3. Reusch JEB., Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome, Am J Cardiol. Sep;90 (5A) :19G-26G, 2002
4. Broccardo C, Luciani MF, Chimini G, The ABCA subclass of mammalian transporters, Biochimica et Biophysica 1461: 395-404,1999
5. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG and Chimini G, Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9, Genomics 21: 150-159, 1994
6. Bodzioch M, Orso E, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Bariage S, Buchler C, Porch-Özçürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, Nat.Genet. Aug; 22 (4) :347-51, 1999
7. Young SG, Fielding CJ, The ABCs of cholesterol efflux, Nat. Genet. Aug; 22: 316-318, 1999
8. Ishii J, Nagano M, Kujiraoka T, Ishihara T, Takada D, Tsuji M, Hattori H, Emi M, Clinical variant of Tangier disease in Japan: mutation of the ABCA1 gene in hypolipoproteinemia with corneal lipidosis, J Hum Genet 47: 366-369, 2002
9. Joyce CW, Wagner EM, Basso F, Amar MJ, Freeman LA, Shaumburek RD, Knapper CL, Syed J, Vaisman BL, Fruchart-Najip J, Billings EM, Paigen B, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, and Brewer HB, Jr , ABCA1 overexpression in the liver of LDLr-KO mice leads to accumulation of pro-atherogenic lipoproteins and enhanced atherosclerosis, The Journal of Biological Chemistry. Nov; 281(44): 33053-33065, 2006
10. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J, The metabolic syndrome: A global public health problem and a new definition, Journal of atherosclerosis and Thrombosis 12 (6): 295-300, 2005

11. Reaven GM, Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*. Dec; 37 (12): 1595-607, 1988
12. Kaplan NM, The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension, *Arch Intern Med*. Jul; 149 (7): 1514-1520, 1989
13. Eckel RH, Zimmet PZ, The metabolic syndrome, *Lancet* 365: 1415-28, 2005
14. Eckel RH, Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases, *N Engl J Med*. Apr; 320 (16): 1060-8, 1989
15. Kim YB, Shulman GI, Kahn BB, Fatty acid infusion impairs insulin action on Akt1 protein kinase C  $\alpha/\zeta$  not on glycogen synthase kinase-3\*, *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32915-32922, 2002
16. Valensi P, Insulin resistance and impaired regulation of hemodynamic parameters, *International Congress Series* 1253: 197-203, 2003
17. Işıldak M, Güven SG, Gürlek A, Metabolik sendrom ve insülin direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 96-99, 2004
18. Shulman G, Cellular mechanisms of insulin resistance, *J Clin Invest*. July; 106(2): 171-6, 2000
19. Ravussin E, Smith SR, Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus, *Ann N Y Acad Sci*. Jun; 967: 363-78, 2002
20. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, and Schneider S, The metabolically obese, normal-weight individual revisited, *Diabetes*. May; 47: 699-713, 1998
21. Balkau B, Charles MA, Comment on the provisional report from the WHO consultation. European group for the study of insulin resistance (EGIR), *Diabet Med* 16: 442-443, 1999
22. Nesto RW, MD, Obesity. A major component of the metabolic syndrome, *Texas Heart Institute Journal* 32 (3): 387-389
23. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G, Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein in humans, *J Clin Invest*. 95: 158-66, 1995
24. Mukarami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconu F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G, Triglycerides are major determinant of cholesterol

esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma, *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15:1819-1828, 1995

25. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S, Insulin resistance in essential hypertension, *N Eng J Med.* Aug; 317(6): 350-7, 1987
26. Steinberg HO, Brethel G, Johnson A, Fineberg N, and Baron AD, Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent, *J Clin Invest.* Sep; 94: 1172-1179, 1994
27. DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona R, and Davis PJ, The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man, *J Clin Invest.* Apr; 55: 845-855, 1975
28. Barbato A, Cappucio FP, Folked EJ, Strazzullo P, Sampson B, Cook DG, Alberti KGMM, Metabolic syndrome and renal sodium handling in three ethnic groups living in England, *Diabetologia* 47: 40-46, 2004
29. Grekin RJ, Vollmer AP, Sider RS, Pressor effects of portal venous oleate infusion—a proposed mechanism for obesity, *Hypertension* . Jul; 26(1): 193-198, 1995
30. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RE, Metabolic syndrome and related disorders, *The Met.Synd.and Inf.* Jun; 2(2): 82-104, 2004
31. Fernandez-Real JM, Ricart W, Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome, *Endocrine Reviews* 24(3): 278-301, 2003
32. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, and Ferrante W ,Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J Clin Invest.* Dec; 112(12): 1796-1808, 2003
33. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, and Rizzetto M, Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: Further evidence for an etiologic association, *Hepatology* 35: 367-372, 2002
34. Chambers JC, Eda S, Basset P, Karim Y, Thomson SG, Gallimore JR, Pepys MB, Kooner JS, C-reactive protein, insulin resistance, central obesity, and coronary heart disease risk in Indian Asians from the United Kingdom compared with European whites, *Circulation* 104: 145-150, 2001
35. Ramachandran A, Snehalatha C, Satyavani K, Sivasankari S, Vijay V, Metabolic syndrome in Asian Indian adults—a population study using modified ATP III criteria, *Diabetic Res.and Clin. Prac.* 60: 199-204, 2003



36. Juhan-Vague I, Alessi MC, PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events, *Thromb Haemost.* Jul; 78(1): 656-60, 1997
37. Nawrocki AR, Scherer PE, The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation, *Current Opinion in Pharmacology* 4: 281-289, 2004
38. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rosetti L, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp, *J.Clin. Invest* 108: 1875-1881, 2001
39. Berg AH, Combs TP, and Scherer PE, ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism.* March; 13: 84-89, 2002
40. Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy E, Rosato EL, Barbot DJ, Rosato FE, and Goldstein BJ, Differential regulating of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(12): 5662-5667, 2002
41. Unger RH, Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism.* Nov; 14(9): 398-403, 2003
42. Minokoshi Y, Kahn BB, Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle, *Biochemical Society Transactions* 31(1): 196-201, 2003
43. Senfert J, Leptin effects on pancreatic  $\beta$ -cell gene expression and function, *Diabetes.* Feb; 53(1):S152-S158, 2004
44. Dean M, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, <http://www.antennahouse.com>
45. Hong SH, Rhyne J, Zeller K, Miller M, *ABCA1<sub>Alabama</sub>*: a novel variant associated with HDL deficiency and premature coronary artery disease, *Atherosclerosis* 164: 245-250, 2002
46. Dean M, Annilo T, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates, *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* Sep; 6: 123-142, 2005
47. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, and Higgins CF, Structural model of ATP-binding protein associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature.* July; 346: 362-365, 1990

48. Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qui Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Deneffe P, Fredrickson DS, and Brewer HB, Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: Analysis of the human and Mouse ATP-binding cassette A promoter, PNAS .July; 97(4): 7987-7992, 2000
49. Santamarina-Fojo S, Remaley A, Neufeld EB, Brewer B, Regulating ad intracellular trafficking of the ABCA1 transporter, J Lipid Res 42: 1339-1345, 2001
50. Schreyer S, Hart LK, Attie AD, Hypercatabolism of lipoprotein –free apolipoprotein-A-1 in HDL-deficient mutant chickens, Arteriosclerosis and Thrombosis 14 (12): 2053-2059, 1994
51. Chimini G, Chambenot O, and Fielding, Role of ABCA1 in turnover and lipid homeostasis, ABC Proteins: From Bacteria to Man .Chapter 23
52. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van DAM M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HOF, Loubser O, Ouelette BFF, Fitcher K, Ashborne-Excoffon KJD, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJP, Jr Genest J, and Hayden MR, Mutation in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, Nat Genet. Aug; 22: 336-345, 1999
53. Hong SH, Riley W, Rhyne J, Friel G, and Miller M, Lack of association between increased carotid intima-media thickening and decreased HLD-cholesterol in a family with a novel ABCA1 variant ,G2265T, Clinical Chemistry 48(11): 2066-2070, 2002
54. Astzalos BF, Brousseau ME, McNamara JR, Horvath KV, Roheim PS, Schaefer EJ, Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease, Atherosclerosis 156: 217-225, 2001
55. Altilia S, Pisciotta L, Garuti R, Tarugi P, Cantafora A, Calabresi L, Tagliaube J, Maccari S, Bernini F, Zanotti I, Vergani C, Bertalini S, Calandra S, Abnormal splicing of ABCA1 pre-mRNA in Tangier disease due to a IVS2+5G>C mutation in ABCA1 gene, J Lipid Res. 44: 254-264 ,2003
56. Tanaka AR, Abe-Dohme S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira KI, Ikeda Y, Kano F, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Murata M, Yokoyama S, Ueda K, Effect of mutation of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding /hydrolysis, J Biol Chem 278: 8815-8819, 2002
57. Rigot V, Hamon Y, Chambenoit O, Alibert M, Duverger N, Chimini G, Distinct site on ABCA1 contro distinct steps required for cellular release og phospholipid , J Lipid Res 43: 2077-2086, 2002

58. Singraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, and Hayden MR, Efflux and atherosclerosis ,The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1322-1332, 2003
59. Langman T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, and Schmitz G, *Biochem Biophys Res Comm* 257: 29-33, 1999
60. Costet P, Lou Y, Wang N, and Tall AL, Sterol-dependent transactivation of the ABCA1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor, *J Biol Chem. Sep*; 275(36): 28240-28245, 2000
61. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, and Freeman MW, ATP-binding Cassette Transporter A1 contains an NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor sequence that translocates the proteins first hydrophilic domain to the exoplasmic space, , *J Biol Chem. May*; 276(18): 15137-15145, 2001
62. Wang , Silver DL, Costet P, and Tall AR, Specific binding of Apo-A1, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1, *J Biol Chem .Oct*; 275(42): 33053-33058, 2000
63. Gottesman MM, and Ambudkar SV, Overview: ABC transporters and human disease, *Journal of Biogenetics and Biomembranes. Dec*; 33: 453-457, 2001
64. Oram JF, and Heinecke KW, ATP-binding cassette transporter A1: A cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease, *Physiol Rev* 85: 1343-1372, 2005
65. Tanaka AR, Ikeda Y, Abe-Dohme S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S, and Ueda K, Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjorgen's Syndrome, *Biochem Biophys Res Commun.May*; 283(5): 1019-25, 2001
66. Dean M, Hamon Y, and Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *J Lipid Res* 42: 1007-1017, 2001
67. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langman T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, and Schmitz G, Transport of lipids from golgi to plasma membrane is Tangier disease patients and Abcl1-deficient mice, *Nat Genet. Feb*; 24(2): 192-196, 2000
68. McNeish J, Alello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Rover LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, and Francone OL, High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1, *Proceedings of the national academy of science of the United States of America* 97.Apr; 8: 4245-4250, 2000

69. Bodzioch E, Orso E, Klucken T, Langman T, Bottcher L, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porch-Özçürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Alandis C, Lackner KJ, and Schmitz G, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat Genet.* Aug; 22(4): 347-351, 1999
70. Pajukanta P, Do DNA sequence variants in ABCA1 contribute to HDL cholesterol levels in the general population?, *J Clin Invest.* Nov; 114(9):1244-1247
71. Wu YC, and Horvitz HR, The *c.elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters, *Cell.* Jun; 93: 951-960, 1998
72. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, and Mangelsdorf DJ, Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (*SREBP-1c*) by oxysterol receptors, *LXR $\alpha$*  and *LXR $\beta$* , *Genes&Development* 14: 2819-2830, 2000
73. Prenger VL, Beaty TH, and Kwiterovich OP, Genetic determination of high-density lipoprotein-cholesterol and apolipoprotein A-1 plasma levels in a family study of cardiac catheterization patients, *Am J Hum Genet* 51: 1047-1057, 1992
74. Björkhem I and Meaney S, Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 806-815, 2004
75. Panzenboeck U, Balazs Z, Sovic A, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Wintersperger A, Malle E, and Sattler W, ABCA1 scavenger receptor class B, type 1, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells, *J Biol Chem.* Nov; 277(45): 42781-42789, 2002
76. von Eckardstein A, Langer C, Engel T, Schaukal I, Cignarella A, Reinhardt J, Larkowski S, Li Z, Zhou X, Cullen P, and Assmann G, ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages, *FASEB J* 15: 1551-1561, 2001
77. Wang J, Burrnet JR, Near S, Young K, Zinman B, Hanley AJG, Connelly PW, Haris SB, and Hegele RA, Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1983-1989, 2000
78. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwartz KY, Molhuizen HOF, Roomp K, Jukema J W, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brooks-Wilson A, Genest J, Kastelein JJP, and Hayden MR, Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease, *Circulation* 103: 1198-1205, 2001

79. Iida A, Saito S, Sekine A, Kitamura Y, Kondo K, Mishima C, Osawa S, Harigae S, and Nakamura Y, High-density single nucleotide polymorphism (SNP) map of the 150-kb region corresponding to the human ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene, *J Hum Genet* 46: 522-528, 2001
80. Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam H, Gotto Jr AM, , and Marian AJ, Novel polymorphisms in promoter region of ATP binding cassette transporter gene end plasma lipids, severity, and progression of coronary atherosclerosis and response to therapy, *Circ Res* 88: 969-973, 2001
81. Zwarts KY, Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Singraja RR, Loubser O, James E, Roomp K, Hudson TJ, Jukema JW, Kastelein JJP, and Hayden MR, ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effect on plasma lipid levels, *Clin Genet* 61: 115-125, 2002
82. Salek L, Lutucuta S, Ballantyne CM, Gotto Jr AM, and Marian AJ, Effects of SREBF-1a and SCAP polymorphisms on plasma levels of lipids, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy with fluvastatin, *J Mol Med* .Nov; 80(11): 737-44, 2002
83. Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ, Goldkamp AL, Kielar D, Probst M, Ordovas JM, Aslanidis C, Lackner KJ, Rubins HB, Collins D, Robins S, Wilson PWF, and Schmitz G, Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease, *Atherosclerosis* 154: 601-611, 2001
84. Ewans D, Beil FU, The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidemia, *J Mol Med*. Apr; 81(4). 264-70, 2003
85. Zhou J, You Y, Ryan AJ, and Mallampalli RK, Upregulation of surfactant synthesis triggers ABCA1-mediated basolateral phospholipid efflux, *J Lipid Res* 45: 1758-1767, 2004
86. S Kumar, K Tamura, and M Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
87. Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
88. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard GB, Jensen GB, and Tybjærg-Hansen A, Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population, *J Clin Invest* 114:1343-1353, 2004

89. Robitaille J, Despres JP, and Vohl MC, The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study, *Clin Genet.*Feb; 63(2): 109-16
90. Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM, Roomp K, Zhang LH, Collings JA, van DAM M, Molhuizen HOF, Loubster O, Ouelette BFF, Sensen CW, Fitcher K, Mott S, Denis M, Boucher B, Pimstone S, Genest JR J, Kastelein JJP, and Hayden M, Mutation in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux, *The Lancet* .OCT;354:1341-1346, 1999
91. Alenezi MY, Marcil M, Blank D, Sherman M, and Genest Jr J, Is the decreased high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome due to cellular lipid efflux defect? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(2): 761-764, 2004
92. Gou Z, Inazu I, Yu W, Suzumura T, Okamoto M, Nohara A, Higashigata T, Sano R, Wakasugi K, Hayakawa T, Yoshida K, Suehiro T, Schmitz G, Mabuchi H, Double deletion and missense mutation in the first nucleotide-binding fold of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene in Japanese patients with Tangier Disease, *J Hum Genet* 47: 325-329, 2002



## ÖZGEÇMİŞ

Mihriban AYVAZ 1969 yılında Giresun'da doğdu. İlk, orta ve lise tahsilini çeşitli illerde tamamladı. 1991 yılında KTÜ Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Programını bitirdi. 1992 yılında kimya öğretmenliği görevine başladı. 2000 yılında KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamlayarak doktora eğitimini sürdürdü. Halen Öğretmen olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.