

***HEPATİK LİPAZ GEN (HL) POLİMORFİZMİNİN
EN YAYGIN VARYANTININ TÜRK POPULASYONUNDA
GENEL DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI***

**DİDEM SEGÂH AKSÜT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2010

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİK LİPAZ GEN (HL) POLİMORFİZMİNİN
EN YAYGIN VARYANTININ TÜRK POPULASYONUNDA
GENEL DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

DİDEM SEGÂH AKSÜT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Naci DEĞERLİ
2010

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24-09-2008 tarih ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen ve Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'nce hazırlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Bu Çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Hatice PINARBAŞI
Üye Danışman : Prof. Dr. Naci DEĞERLİ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Musa SARI

ONAY

Bu tez çalışması, 25/11/2010 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan Jüri Üyeleri tarafından kabul edilmiştir

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SİMGELER DİZİNİ	X
1.GİRİŞ	1
1.1. Lipit Hidrolizinde Etkli Lipaz Ailesinin Üç Önemli Enzimi	2
1.1. Pankreatik Lipaz (PL)	2
1. 2. Lipoprotein Lipaz (LPL)	2
1.4. Hepatik Lipaz (HL)	3
1.4.1. Hepatik Lipaz' ın Evrimi	5
1.4.2. Hepatik Lipaz'ın Yapısı ve Fonksiyonu	6
1.4.3. Hepatik Lipaz (HL) Geni	8
1.4.4. Polimorfizm	10
1.4.5. Hepatik Lipaz' ın Lipoprotein Metabolizmasındaki Rolü	12
1.4.6. Hepatik Lipaz'ın HDL Metabolizmasındaki Rolü	13
2. MATERYAL VE METOD	14
2.1. Populasyon Çalışması ve Örnekleme:	14
2.2. DNA İzolasyonu:	14
2.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu	14
2.3. DNA Derişiminin Belirlenmesi	15

2.4. PZR Koşulları ve PZR Karışımı	15
2.4.1. PZR karışımının hazırlanışı	16
2.5. Agaroz Jel Elektroforez Uygulaması	16
2.6. Endonükleaz Enzimi İle Kesim İşlemi.....	17
2.7. İstatistiksel Analizler.....	19
3. BULGULAR	18
4. TARTIŞMA.....	28
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	36

ÖZET

Hepatik Lipaz Gen (*HL*) Polimorfizminin En Yaygın Varyantının Türk Populasyonunda Genel Dağılımının Araştırılması

Didem Segah AKSÜT

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Naci DEĞERLİ

Hepatik lipaz geni (*LIPC*)nin promotor bölgesinde yaygın bir -514 C/T değişimi ve bu varyantın sıklığında etnik farklılıklar tanımlanmıştır. *T* alel varyantının ortalama frekansı % 15-35 arasında değişmekte olup, populasyonlar arasında etnik farklılık belirgindir. Bu tek nükleotid polimorfizmi enzim aktivitesindeki % 20-30'luk değişimden sorumlu tutulmaktadır. *C* aleli yüksek enzim aktiviteli küçük ve yoğun LDL parçacıkları ve düşük HDL₂ düzeyi, teorik olarak ise yüksek bir damar darlığı riski ile ilişkilidir. *T* alel varyantını taşıyan bireylerde ise tersine bir ilişki gözlenmektedir. *T* alel'i taşıyanlar, homozigot *C* alel taşıyıcılarından daha yüksek HDL₂-kolesterol düzeyine sahiptirler. Enzim aktivite farklılıkları bazı araştırmacılar tarafından yalnız erkek bireylerde, diğerleri tarafından kadınlarda gözlenirken, bazıları araştırmacılar ise genotipler arasında bir fark gözlememiştir.

Çalışmamızda 700 bireyi içeren Türk populasyonunda *hepatik lipaz geni -514C/T* varyantının sıklığı PCR-RFLP metoduyla belirlenmiştir. 543 bireyin CC (yabanıl tip) genotipi (% 81.90), 85 bireyin CT genotipi(heterozigot) (%12.10), 42 bireyin ise TT genotipi (homozigot polimorfik) (% 6) taşıdığı saptanmıştır. *C* alel frekansının % 87.90, *T* alel frekansının ise %12.10 olduğu belirlenmiştir. Yapılan Hardy-Weinberg Denge analizinde beklenen ve gözlenen genotip frekansları benzer bulunduğundan, populasyonun Hardy-Weinberg Dengesinde olduğu saptanmıştır ($\chi^2=0.739$, $p=0.396$).

Anahtar Kelimeler: *Hepatik Lipaz Geni (LIPC)*, Polimorfizm, -514C/T Aleli, Türk Populasyonu.

SUMMARY

Investigation of General Distribution of the Most Common Allele Variant of *Hepatic Lipase Gene (HL)* in the Turkish Population

Didem Segâh AKSÜT

**Cumhuriyet University Graduate School of Natural and
Applied Sciences Department of Biology**

Supervisor

Prof. Dr. Naci DEĞERLİ

A common-514C → T substitution in promoter region of *hepatic lipase gene (LIPC)* and ethnic differences in the frequency of this variant have been described. The average frequency of T allele variant is vary between 15-35 %, and this etnical differences among populations are clearly observed. This single nucleotide polymorphism (SNP) is responsible for 20-30 % of the variation in the activity of the enzyme. *The C allele* is associated with a greater enzymatic activity, with particles of LDL that are smaller and denser, with lower of HDL₂ level and, as such, with a higher theoretical atherogenic risk. The individuals that bearing the T allele variant exhibits activities relationships inversely. The carriers of the T allele have higher concentrations of HDL-cholesterol than the homozygous carriers of the C allele. The enzyme activity difference has been observed by some invastigators in males only, others only in women, but some investigarors observe no significant between genotypes. Our study was based on the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the *hepatic lipase gene* promotor region consisting of 285 bp. A total of 700 individual representing of the general Turkish population were investigated and of the 543 individuals bearing CC genotype, (% 81.90), of the 85 individuals having heterozygote CT genotype (12.10 %) and lastly , 42 individuals with TT genotype (%6.00), have been determined. Allel frequencies were determined as

87.90 % for *C allele* and, 12.10 % for *T allele*. After Hardy-Weinberg equilibrium analysis, and since observed and expected genotype frequencies of the tested population was determined similar, it was decided that population is in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=0.739$,;p=0.396).

Key Words: *Hepatic lipase gene (LIPC)*, polymorphism, -514C/T allele, Turkish population.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve çalışmalarımın her basamağında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bütün çalışma süreci boyunca bana destek olan Sayın Hocam Prof. Dr. Naci DEĞERLİ'ye ve yoğun katkılarından dolayı Arş. Gör. Sevgi DURNA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Didem Segâh AKSÜT

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipaz Süper Ailesinin Filogenetik İlişkisi	6
Şekil 2. Aktif Dimerik Hepatik Lipaz Modeli.	7
Şekil 3. <i>Hepatik Lipaz Geni'nin(LIPC)</i> yapısal düzeni.	9
Şekil 4. Saflaştırılmış DNA örneklerinin %0.8'lik agaroz jel görüntüleri.....	18
Şekil 5. PZR ürünleri ve restriksiyon kesimi sonucunda oluşan bant profillerinin 50 bp'lik DNA ladder eşliğindeki görünüşleri.....	19

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bölgelere göre 700 bireyin genotip dağılımları	22
Tablo 2. Genotip ve alel sıklıklarının genel dağılımı	23
Tablo 3. İstatiksel analiz sonuçları.....	24
Tablo 4. Alel sıklıklarının genel dağılımı	25

SİMGELER DİZİNİ

APO	Apolipoprotein
CETP	Kolesterol veya plazma lipit transfer proteini
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EL	Endotelyal lipaz
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
IDL	Orta Dansiteli Lipoprotein
HL	Hepatik Lipaz
Kb	Kilobaz
KDa	Kilo Dalton
LCAT	Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LIPC	Hepatik Lipaz Geni
LPL	Lipoprotein Lipaz
LRP	Lipoprotein Reseptör Proteini
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PL	Pankreatik Lipaz
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA tamponu
TG	Trigliserit
Tris bazı	Tris (hidroksimetil) metilamin
PNLIP	Pankreatik lipaz geni
PS-PLA₁	Fosfatidilserin-Fosfolipaz A ₁

1.GİRİŞ

Lipidler, organik bileşiklerin heterojen bir grubudur. En önemli karakteristik özellikleri suda sınırlı düzeyde, buna karşılık eter, kloroform gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilir olmalarıdır. Lipidler polar ve nonpolar olarak iki gruba ayrılır. Polar lipidler sınırlı da olsa suda çözünebilme özelliği gösterirler. Bu grup içerisinde kolesterol, yağ asitleri, glikosfingolipidler, gliserofosfolipidler yer alır. Non polar lipidler ise trigliseritler ve kolesterol esterleridir (Murray ve Ark., 1990; Bhagavan, 1992; Burtis ve Ashwood,1996).

Hidrofobik özellikleri nedeni ile nonpolar lipidlerin plazmada taşınmaları lipoproteinler olarak adlandırılan özel yapılar sayesinde mümkün olur. Tüm lipoproteinlerin temel yapısı benzer olup, kolesterol esterleri ve trigliseritleri içeren, nötral lipidlerden oluşan bir gövdeye ve daha polar yağlardan ve apoproteinlerden oluşan bir dış tabakaya sahiptirler. İçerdiği lipidlerle, hücrelerin tipik plazma membranına benzeyen ve örtücü bir yapı oluşturan dış tabaka, sıvı plazma ile içteki nonpolar lipid gövde arasındaki bir aratabaka olarak iş görür. Böylece, bu polar yüzey, plazmadaki aşırı derecede çözünmez nitelikte olan kolesterol esterleri ve trigliseritlerin bir yerden başka bir yere taşınmasını olanaklı kılar. (Jakson ve Gotto. 1974; Zubay, 1993; Baynes ve Dominiczah 1999; Davidson, 2002)

Karmaşık özelliklerin çoklu genler tarafından düzenlendiği muhtemeldir. Bu yüzden, bir grup genin eş zamanlı olarak sorgulanması, aday genlerin katkılarını ortaya koymak amacıyla daha kapsamlı bir bakış açısı sağlayabilir. Lipit metabolizması da çok sayıda enzim, lipit taşıyıcıları, hücrel reseptör ve lipoproteinler vasıtasıyla yönetilen değişik etkileşim ağlarıyla dengelenmektedir. Lipit çeşitliliğini açıklamada, tersinir kolesterol taşınma yolunda tek genli bir yaklaşımdan ziyade çoklu genlerin birleşik etkilerinin göz önünde bulundurulması, çok daha iyi bir yaklaşım kabul edilmektedir (Liao ve Ark., 2007). Bu yüzden lipaz ailesi nötral lipit ve lipit türevi substratların hidrolizinde rol alan bir grup enzimden oluştuğu iyi bilindiğinden burada öncelikle lipit metabolizmasında rol alan bir grup enzim ve reseptörleri ile ve aktivite üzerinde etkili olan genetik varyasyonla ilgili

temel bilgiler verilmesi faydalı olacaktır. Ancak biz daha çok hidrolizde etkili olan enzimler üzerinde duracağız. Lipit hidrolizi ile ilgili enzimler lipaz ailesinin temel üyeleri olup sırasıyla bu grupta yer alan enzim adları ve açıklamalar aşağıda yer almaktadır. Bunlar kısaca pankreatik lipaz (PL), lipoprotein lipaz (LPL), hepatik lipaz (HL) memeli lipaz gen ailesinin en iyi tanımlanmış üç yaygın üyesidir. Bu ailede bunun dışında endotelyal lipaz (EL), fosfotidilserin fosfolipaz A1 (PS-PLA₁) ve çok yeni tanımlanmış olan lipaz H (LPH)da yer almaktadır. Bunlardan ilk üçü baskın olarak lipit hidrolizini belirlediğinden bu enzim adları ve çalışmaya konu olan Hepatik lipaz enzim geni üzerinde detaylı olarak durulacaktır.

1. 1.Lipit Hidrolizinde Etkli Lipaz Ailesinin Üç Önemli Enzimi

1.1. Pankreatik Lipaz (PL)

Pankreatik Lipaz (EC 3.1.1.3) pankreasın kanal hücreleri tarafından salgılanan, trigliserit moleküllerini hidroliz eden, bir lipaz ailesi enzimidir. Kolipaz olarak adlandırılan polipeptidik yapının safra tuzu varlığında triaçilgliserollere bağlandığı ve enzimi substrat yüzeyine demirleyerek bir aktivatör gibi çalıştığı, bu kofaktör proteinle birlikte oluşan ünitenin yüzey denatürasyonuna daha dayanıklı olduğu belirtilmektedir (Momsen ve Brockman 1976). Hidroliz reaksiyonu sonucu monoaçilgliserol ve yağ asitleri oluşur. Trigliserit hidroliz ürünleri ince bağırsak tarafından emilir, epitel hücrelerinde başka enzimler tarafından tekrar trigliserite dönüştürülürler, sonra da vücuda dağıtılmak üzere, şilomikronlar içinde lenf sistemine salgılanırlar. Plazma lipoproteinleri sürekli bir değişim, yıkım ve yapım halindedirler. Metabolizmalarının birçok noktasında önemli enzimler görev yapmaktadır. Pankreatik lipaz *PNLIP* geni tarafından kodlanır. *PNLIP*, kromozom 10 üzerinde, 10q26.1 konumundadır. Genin 13 eksonu vardır, 20 kb uzunluğundadır. (Davis ve Ark., 1991).

1. 2. Lipoprotein Lipaz (LPL)

Lipoprotein lipaz (EC 3.1.1.34) 449 aminoasitten oluşan 50 kDa'lık bir proteindir. Başlıca parankimal hücrelerde sentezlenir fakat sentezi yağ dokusu hücreleri ve kalp kası hücrelerinde daha yoğundur. LPL, makrofajlarda yapım ve yıkımını

yürütmektedir. LPL adiposit ve miyositlerden salındıktan sonra bu dokulardaki kapiller endotelyal hücrelerin yüzeyine taşınıp hücre yüzeyindeki heparansulfat proteoglikanlara bağlanmaktadır. Endotele bağlanmış olan LPL, şilomikron ve VLDL yapısında bulunan trigliseritlerin hidrolizini sağlamaktadır. Kofaktör olarak Apo C-II' ye ihtiyaç duymaktadır. (Murray ve Ark., 1993).

LPL plazmadaki şilomikron ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin ayrıştırılmasından sorumlu olduğundan, plazmadaki yüksek LPL düzeyinin özellikle HDL₂ alt fraksiyonu başta olmak üzere artan HDL-kolesterol düzeyi kadar, azalan plazma trigliserit düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu lipit hidroliz eden enzim aktivitesindeki genetik faktörlerin rolleri hakkındaki temel bilgiler moleküler esaslı çalışmalardan gelmektedir. Özellikle, bu enzimin kodlayıcı bölgesindeki mutasyonların belirgin olarak lipoprotein formlarda bozulmaya yol açtığı ve bazı araştırmalar ise LPL gen polimorfizmleri ile lipit ve lipoprotein düzeyi arasında doğrudan ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Perusse ve Ark., 1997).

1.3. Hepatik Lipaz (HL)

Hepatik lipaz (E.C.3.1.1.3) lipoprotein metabolizmasında anahtar rolü olan lipolitik bir enzimdir. Monogliserit, digliserit, trigliserit hidrolaz ve fosfolipaz A₁ aktivitesi vardır. Glikoprotein yapısında olup triaçilgliserol, fosfotidil-kolin ve fosfotidiletanolamin hidrolizini katalizlemektedir (Connelly, 1999). Karaciğerde sentezlenir ve Disse aralığına salgılanır. Heparansulfat proteoglikanlara bağlanarak hücre yüzeyine tutunur (Connelly,1999; Ben-Zeev and Doolittle, 2004). Karaciğer dışında Hepatik lipaz aktivitesine sıçanlarda ve diğer memelilerin ovaryum ve adrenallerinde de rastlanmıştır. Ama HL'nin ovaryum ve adrenallerdeki orijini tartışmalıdır (Bensadoun ve Berryman, 1996; Jones ve Ark., 2002). Aşırı şişmanlık, kalp damar hastalıkları, lipoprotein kaynaklı hastalıkları ve damar tıkanmaları dâhil HL işlevindeki anormalliklerle doğrudan veya dolaylı olarak bağlantılı gözükmektedir. Kan basıncının düzenlenmesinde, lipit metabolizması ve arteriyel duvar değişikliklerinde rol oynayan bir takım aday genler belirlenmiştir. Bu genlerdeki değişikliklerin kardiyovasküler hastalıkların oluşumu ve/veya

gelişmesinde risk faktörü olabileceği öne sürülmektedir. Bu aday gen ürününün biri olan LP lipolitik bir enzim olup trigliseritleri ve fosfolipidleri hidroliz etmektedir (Chang ve Ark., 1997; Perret ve Ark., 2002).

Hepatik lipaz düşük dansiteli lipoprotein (LDL), yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve bazı trigliseritçe zengin lipoproteinler için ligand olarak hareket eden ve bunların karaciğer tarafından alınmasını teşvik eden bir enzim olarak işlev görmektedir. Ayrıca LDL ve HDL trigliserit ve fosfolipitlerini hidrolizler ve partiküllerin daha küçük ve daha yoğun olmalarını sağlar (Steinmetz ve Ark., 1992). Enzim daha ayrıntılı olarak mono-, di- ve trigliseritler ile açıl- CoA tiyoester ve fosfolipit hidrolizleri yapmaktadır. Öte yandan plazma HDL düzeyi ile HL aktivitesi arasında ters bir ilişki olduğu göze çarpan bir durumdur. HL etkinliği süresince IDL ve HDL₂ hidrolize edilerek, LDL ve HDL₃ e dönüştürülür. Fakat yine de HL eksikliği içeren hastalar artan HDL düzeyine sahip olmakta veya olmamaktadır. Bu yüzden HL aktivitesinin eşey-steroid hormonları dahil birkaç faktör tarafından etkilendiği gözükmemektedir (Despres ve Ark., 1989). HL'nin temel işleyiş mekanizmasının damar içi daralma önleyici olduğuna inanılmaktadır. HDL düzeyindeki bu gözlenen artışın (enzim düzeyine bağlı olarak) %60' ının genetiksel olduğu başka araştırmacılar tarafından da desteklenmektedir (Steinmetz ve Ark., 1992)..

Hepatik lipaz gen mutasyonu ender bir otozomal resesif bozukluktur. *LIPC* genindeki bir mutasyon sonucu kandaki HDL düzeyleri yüksek olur ayrıca hem HDL hem de LDL'deki trigliserit oranı yüksektir. Bununla ilgili olarak hastalığın yönlendirilmiş mutajenezle oluşturulan transjenik hayvan modellerinde ateroskleroz oluşmasının ise geciktiği rapor edilmiştir (Karackattu ve Ark., 2006). *LIPC* geninde bulunan 9 polimorfizm üzerinde yapılan bir araştırmada belli polimorfizmlerin düşük HDL ve yüksek LDL düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Olumsuz tek nükleotid polimorfizm alel taşıyan kişilerin kardiyovasküler hastalık riski taşıma olasılığının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Kathiresan ve Ark.,2008).

1.3.1. Hepatik Lipaz' ın Evrimi

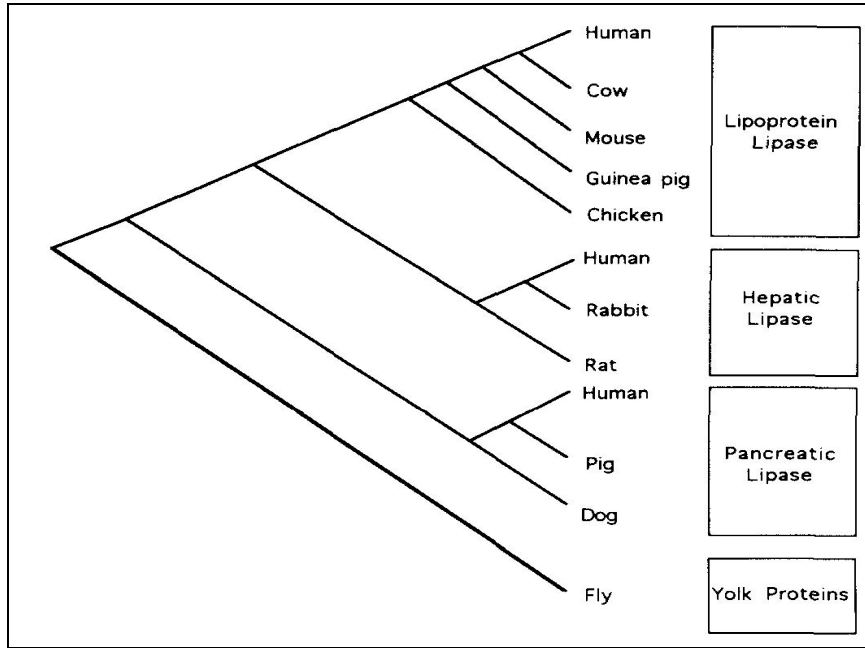
Hepatik Lipaz memeli lipaz gen ailesinin daha önce belirtilen diğer enzimlerle birlikte (pankreatik lipaz, endotelyal lipaz, fosfatidilserin fosfolipaz A1 ve Lipaz H) bilinen üyesidir (Chang ve Ark., 1997; Hill ve Ark.,1996; Hill ve Ark.,1998; Dugi ve Ark.,1995; Ben-Zeev and Doolittle 2004; Wong ve Schotz, 2002) Diğer enzimlerin ekspresyonuna katılan genlerle ortak intron ve ekson bağlantılarını paylaşımlarının yanı sıra yüksek düzeyli dizi homolojisi özellikle üç temel enzimi (PL, LPL ve HL) ortak atadan geldiklerini göstermektedir (Dugi ve Ark., 1995; Wong ve Schotz, 2002; Conelly,1999).

Filogenetik olarak karşılaştırıldığında HL, LPL ve EL (endotelyal lipaz)'nin birbirine PL'den daha yakın olduğu bildirilmiştir (Hill ve Ark., 1996; Ben-Zeev ve Doolittle 2004). PL, Fosfatidilserin-Fosfolipaz A1(PS-PLA₁) ve Lipaz H nin primordial olarak bildiğimiz bir ilkin formdan önce ayrıldığı ve bu enzimlerin ortak ata geninden doğup farklı evrimsel yollarda evrildiği yönünde görüşler bildirilmiştir (Ben-Zeev ve Doolittle, 2004; Wong ve Schotz, 2002; Conelly, 1999).

Farklı türlerin saflaştırılan LPL, HL ve PL enzimlerinin aminoasit dizileri belirlenmiş ve böylece üç lipaz arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır. Filogenetik yeniden yapılanma Parsimony Metodu kullanılarak yeniden tasarlanmıştır. Buna göre son zamanlarda HL ve PLP'nin ortak ataları paylaştığı ileri sürülmektedir ve PLnin LPL ve HL den daha önce kollara ayrılmış olabileceği daha çok kabul görmektedir. Bu model Persson ve Ark., (1989) tarafından ileri sürülmüş olan (her üç lipaz arasındaki sonuçları Cys pozisyonları dışında, N bağlantılı glikolizasyon bölgelerini ve poli-anyon bağlayıcı bölgelerini esas alan) görüşlerin kabulüdür. Persson ve Ark., (1989) çalışmalarına ilave olarak, lipaz ailelerinin proteinleri arasındaki ilişki ile ilgili iki farklı analiz sunmuştur. Datta ve Ark., (1988) uzaklık bilgilerini ve karşılaştırmalı oranları kullanarak insan ve sıçan Hlsi, insan, fare ve sığır LPLsi ve köpek ve domuz PL'si arasındaki ilişkiyi belirlemek için bir çalışma yapmışlardır.

Uzaklık bilgileri başka yolla desteklense de, HL'nin PL ile LPL'ye göre daha yakından ilgili olduğu tahmin edilmektedir. PL'nin evrim oranının HL'ninkinden iki kat ve LPL'nin evriminden de 7 kat daha büyük olduğu tahmin edilmektedir.

Gen ilişkileri, karşılaştırılabilecek dış grup eksikliğine rağmen, farklılaşan evrim oranları kullanılarak tahmin edilmiştir. Yenilenen analizler ile oldukça çok veri elde edilmiştir (**Şekil 1**). *Drosophilada W* genleri gösterildiğinden beri lipazlarla önemli bir diziliş benzerliği bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu diziliş bilgileri basit oranlar ve bilinen ayrılma zamanlarından ziyade Parsimony analizi temeline dayalı yapılarak daha inandırıcı filogenetik yeniden yapılanmaya referans oluşturmuştur.

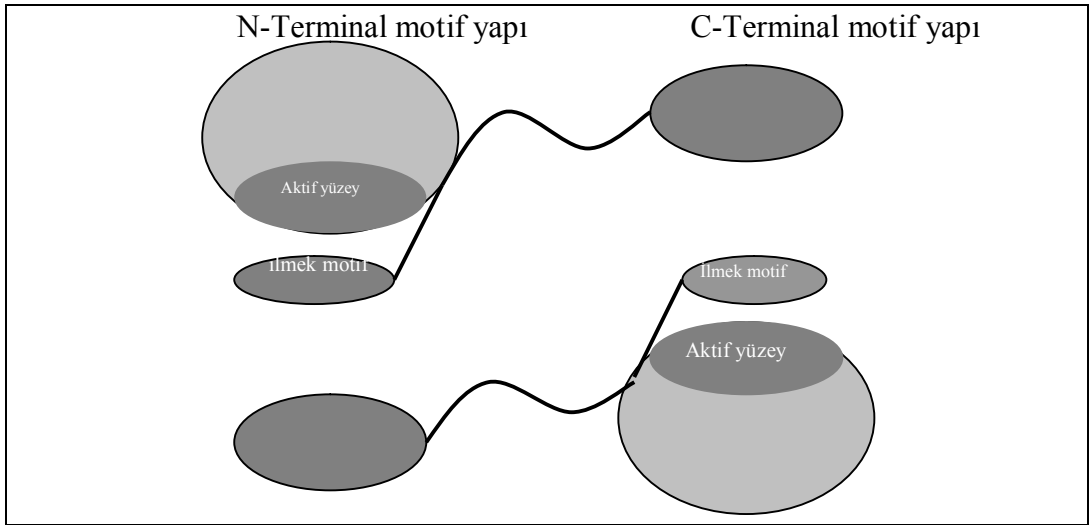


Şekil 1. Lipaz süper ailesinin filogenetik ilişkisi ve evrimsel süreçte ayrılma modelinin ağaç üzerinde gösterimi. Filogenetik dal üzerinde PL enziminin HL ve LPLden daha önce ayrıldığı, HL ve LPLnin birbirine daha yakın durduğu gözlenmektedir

1. 3.2. Hepatik Lipaz'ın Yapısı ve Fonksiyonu

Kristal yapısı bilinen HL ve LPL'nin PL ile homolojisi lipazların ortak protein katlanma yapısını paylaştığını göstermiştir (Hill ve Ark., 1996; Ben-Zeev ve Ark.,2004). X-ışığı kristallografisi sonucu her üç enzimim kristal yapısında enzimin iki özel motif yapıdan oluştuğunu, büyük N-terminal motif yapının Asp-

His-Ser katalitik üçlüsünü yanında **Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly** beşli peptidi içermektedir. Bu beşli amino asit motifin Serin amino asitini çeren asıl katalitik merkez olduğu, bununda daha kısa bir bölge olan küçük C-terminal bölgeye baş-kuyruk şeklinde bağlandığını göstermiştir. Heparin bağlayan yüzeyinde bu her iki motif bölge içerisinde olabileceği, fakat heparin-sefaroze kromatografi analizleri daha ziyade C-terminal bölgede olabileceğini işaret etmektedir (Connelly,1999). Kimerik protein çalışmaları Şekil 2de tasarlanan ve ilmek motif olarak gösterilen yapının lipit bağlama özelliğinde olup trigliserit ile fosfolipit dengesinin sağlanmasında önemli karakteristik unsur olduğunu ileri sürmektedir. Bu anlamda ilmek motif yapının sağlıklı işleyişi plazma kolesterol ve fosfolipit dengesinin sağlanmasında önemlidir. Ayrıca aminoasit dizi homolojisine dayanarak, disülfür bağlarının korunmuş olması ve benzer lipolitik fonksiyonlarının da olması HL ve LPL'nin, PL ile benzer üç boyutlu yapılarının olduğu ileri sürülmüştür. Katalitik



Şekil 2. Hepatik lipaz işlevi için monomerik yapının baş-kuyruk şeklinde düzenlenmesine bağlı dimerik yapı olarak önerilen modeli

bölge, yüzey ilmik bölgesi, heparin afinitesi, lipit-reseptör bağlanma özellikleri lipolitik aktivite için gerekli iki altünitenin olmasını gerektirmektedir (Hill ve Ark., 1998; Dugi ve Ark., 1995). Her ne kadar bu üç enzim yapısal ve fonksiyonel

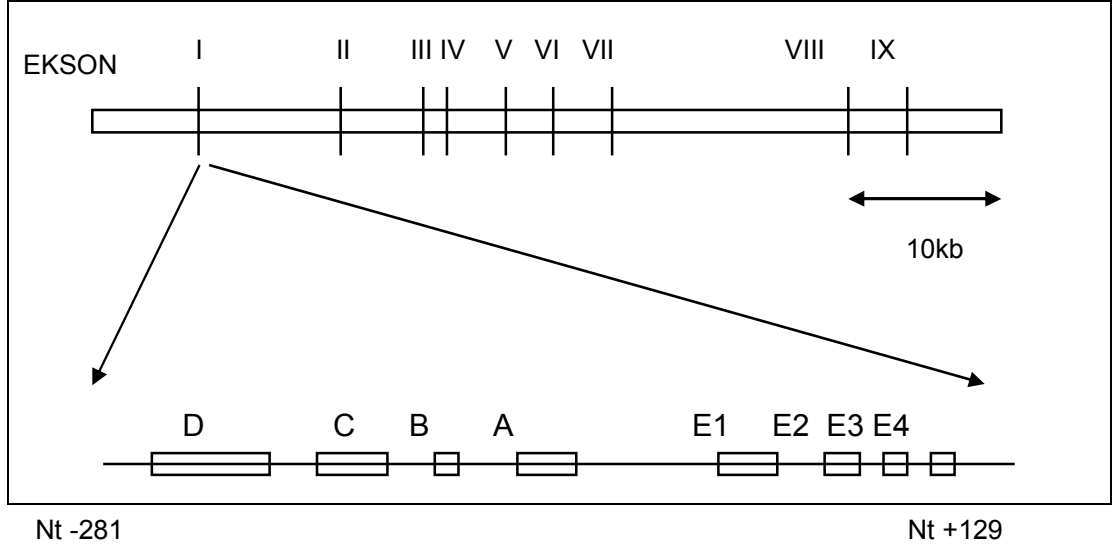
benzerlikler içerseler de, substrat özgüllüğü, kofaktör ihtiyacı, heparin afinitesi gibi özgül farklılıkları bulunmaktadır (Hill ve Ark.,1998).

HL aktivitesi ve salgılanması için Asp⁵⁶ pozisyonunda glikozilasyona ihtiyaç duyar (**Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly**). Heparin bağlanma bölgesi, C-terminal bölgededir. Bu bölge, başlıca lipoprotein bağlama bölgeleri içerir. İnsan HL'si monomerik ünitelerin baş-kuyruk şeklinde düzenlendiği bir dimer şeklindedir (**Şekil 2**). Dugi ve ark., (1995) kimerik enzimleri kullanarak varsayılan bir ilmik bölgesinin HL'nin aktif bölgesini sardığını göstermişlerdir. Bu bölgenin de trigliserit mi yoksa fosfolipitin mi hidroliz edileceği konusunda bir denge kurduğunu göstermişlerdir (Hill ve Ark., 1998; Dugi ve Ark.,1995).

1. 3.3. *Hepatik Lipaz (LIPC) Geni*

LIPC olarak adlandırılan *HL* geni; büyüklüğü 35 kb olup, insanda kromozom 15q-q21'de yerleşiktir. 8 intronu ve 9 eksondan oluşan ve 1.5 kb'lık bir mRNA'yı kodlanmasından sorumludur. Bu mRNA ise 476 aminoasitten oluşan ve molekül kütlesi yaklaşık 53. 431 Da olan bir protein kodlamaktadır. HL enzimi aktivite ve salınım için 56 sıradaki aspajin amino asiti üzerinde bir glikolizasyona maruz kalmaktadır (Perret ve Ark., 2002; Chang ve Ark., 1997; Zambon ve Ark.,2003; Connelly,1999; Ameis ve Ark., 1990).

İntron ve eksonların organizasyonu, LPL geni ile oldukça benzerdir. Translasyon başlama kodonunun 43. veya 77. nükleotid yukarısında iki tane transkripsiyon başlama bölgesi bulunmuştur (**Şekil 3**). HL nin 5' gen bölgesi, -1550 ve +129 nükleotid bölgesine karşılık gelmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, promotor bölgesinde (-281 ve +129 nükleotitleri arası) 8 tane zon olduğu gösterilmiştir. A zonunun (-28 ve -78 nükleotitleri arası), karaciğerden ifadelenen genlerde sık bulunan AGGTTAATTATTAAT motifini içerdiği ve pozitif transkripsiyonel faktör HNF1'e bağlandığı gösterilmiştir (Perret ve Ark., 2002; Chang ve Ark., 1997; Ameis ve Ark., 1990). HNF1 e ek olarak HNF3, HNF4 veya C/EBP de transkripsiyon faktörleri olarak rol oynamaktadır (Chang ve Ark., 1997; Ameis ve Ark., 1990) (**Şekil 3**).



Şekil 3. *Hepatik Lipaz* geni'nin yapısal düzeni

Buna karşılık, E2, E3 ve E4 bölgeleri 1. eksonda yer alıp negatif düzenleyici element içermektedir (Şekil 3). Ek olarak, 5' protein kodlamayan bölge dizilerinin de düzenleyici cevap elementlerine uyduğu bildirilmiştir (Perret ve Ark., 2002; Ameis ve Ark.,1990). 5' protein kodlamayan bölgede ve ekson 1'de (-281 ile +129 arası) negatif düzenleyici element'in HL gen ifadenmesinin karaciğerle sınırlı olmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Bu kısmı hedef alan bir çalışmada -222 pozisyonda gözlenen polimorfizmin HL aktivitesinde azalışa yol açtığı gözlemlendiğinden, karaciğere özgü HL ifadenmesinde protein kodlamayan bölgenin potansiyel bir fonksiyonu olduğu bildirilmiştir (Chang ve Ark.,1997).

İki yüz yirmi iki ile +27 nükleotidleri arasının HL promotor aktivitesi için bir temel oluşturduğu gösterilmiştir. İlginç olarak, bu parçadan TATA kutusu ve transkripsiyon başlangıç noktasını içeren bölgede herhangi bir 3' delesyonun promotor aktivitesini tamamen ortadan kaldırdığı saptanmıştır. Kraciğer hücre hatları olan *hepatoblastoma* ve *hepatoma* ile yapılan fonksiyonel analizler, -222 ile +27 arasında oluşturulan değişik mutasyonların gen ifadesi ve buna bağlı HL aktivitesi değiştirmedığı, oysa -281. pozisyonda yukarı bölge düzenleyicisi olarak

buluna nükleotid dizisinin birincil hepatositlerde kültürlerinde pozitif düzenleyici element olarak davrandığı bildirilmiştir (Chang ve Ark., 1997).

Üç *Alu* tekrar dizilerine bağlı olarak gözlenen alelik dizi varyasyonu, bir çok transkripsiyon başlangıç noktası, basit hepatosit-spesifik insan HL promotor aktivitesini düzenleyen pozitif ve negatif dizi elementlerinin yaygın olarak tanımlandığını gözlemekteyiz. Bir *Alu* tekrar dizisinin -905. pozisyonda, diğer iki tanesinin daha yukarıda bulunması ilginç bulunmuştur. *Alu* tekrarları genellikle DNA yeniden düzenlenmelerinin sonunda primat evrimi sırasında görülmektedir. Atasal genden, gen duplikasyonu ile ayrıldığı düşünülmektedir. *Alu* tekrarları HL geninin 5' ucuna yakındır. Hem sıçan hem de insan HL geninde transkripsiyon başlangıç noktası çok korunmuş dizilerdir. İlk *Alu* tekrar dizisinin -905. pozisyonda olması 5' düzenleyici dizilerin burada yerleşik olduğunu göstermektedir (Chang ve Ark., 1997; Ameis ve Ark.,1990).

Dört yüz doksan dokuz amino asit içeren insan HL proteini, 22 amino asitten oluşan bir lider peptit içermektedir. İşlenen protein salgılandığında 477 aminoasit içermektedir (Perret ve Ark.,2002; Ameis ve Ark.,1990). Aminoasit dizisi birçok fonksiyonel bölge içerir. Lipitlerle, 10 aminoasit içeren iki hidrofobik parça etkileşir. Bir parça, Serin birimi (Ser¹⁴⁶ ve Ser²⁶⁷) içerir. İnsanlarda Ser¹⁴⁶, **Ser-Asp-X-Ser-Gly** dizisinin ortasında yer alır. Bu da; EL, LPL, PL ve diğer esterazlarda bulunan klasik **Ser-Asp-His** üçlüsünün bir parçasıdır. İnsan HL'si, **BBBXXB** veya **BBXB** gibi 4 varsayılan heparin-bağlanma bölgesi içerir. B temel birim olup hücre yüzey heparan sülfatlara bağlanmada olduğu gibidir. Bu tarz diziler; apoB-100, apoE endotelial lipaz ve LPL gibi lipoprotein metabolizmasındaki diğer proteinlerde de bulunmuştur (Perret ve Ark.,2002).

1. 3.4. Polimorfizm

LIPC promotorunda birbiriyle tamamen bağlı hareket eden 4 polimorfizm -514 C/T, -763A/T, -710T/C, ve -250G/A iki haplotip olarak tanımlanmıştır (Guerra ve ark.,1997). Beyaz ırk kökenlilerde -514 T alelinin sıklığı 0.15-0.21 arasında iken, Afrika kökenli Amerikalılarda bu sıklık 0.45-0.53, Japon kökenli

Amerikalılarda 0.47 olarak bildirilmiştir (Jansen ve ark.,1997; Zambon ve ark.,1998). -514T alelinin erkeklerde, premenopozal kadınlara göre post-heparin plazma HL aktivitesini %30-40 azalttığı bildirilmiştir. - 514 C/T değişiminin iki potansiyel USF-1 (upstream stimulatory factor-1) bağlama bölgesinden birini ortadan kaldırdığı, -514 T alelinin varlığında USF1 bağlanmasında %50 azalma olduğu saptanmıştır (Zambon ve ark.,2003).

Bugüne kadar kapsamlı olarak araştırılmış olan -514C/T promotor polimorfizmi ile *LIPC* geni veya yakın genlerin diğer polimorfizmler ile bağlantılı dengesizliği lipit düzeyini dalgalandırabilmektedir. Farklı populasyonlar arasındaki -250G/A promotor alel frekans farklılığı etnik gruplardaki HDL varyasyonuna kısmi olarak açıklama getirmektedir. Ama yine de plazma lipit düzeyi ile *LIPC* polimorfizmi arasındaki mutlak ilişkiyi kanıtlamak için, *LIPC* alelinin daha kesin biyokimyasal mekanizmalarının açıklanmasına gerek duyulmaktadır (Song ve Ark., 2000).

Lipoprotein lipaz geninde gözlenen gene özgü polimorfizmlerin lipit alt fraksiyonları ve buna bağlı gözlenen koroner arter hastalıkları ile ilişkilendirildiği gözlenmektedir. Bu enzimi kodlayan gen kromozom 8q22 üzerinde olduğu belirtilmesine karşın, lipoprotein lipaz ve hepatik lipaz geninin bağlantı dengesi veya dengesizliği gözlenen fenotipik etkilerin ortaya çıkmasındaki etkinliğinin tam olarak ortaya konulması süregelen çalışmaların konusudur (Holmer ve Ark., 2000).

HL geninin bu alel formlarının serum lipoprotein yoğunluğu ve koroner kalp hastalığı ile ilgili araştırmalar populasyon düzeyinde sürmekte olup, Türk populasyonunun genelini temsil eden örnekleme ile ilgili çalışmalar ise yok denecek kadar azdır. Bunun yanında, aynı ailenin diğer bir üyesi olan *lipoprotein lipaz S447X* varyantının metabolik sendrom ve lipid düzey ilişkileri kapsamlı bir populasyon çalışması ile araştırılmış ve olası diğer dışsal faktörler ile değerlendirilmiştir. Sonuçta X 447 alel taşıyıcılığının kadınlarda metabolik sendrom ve erkeklerde de KKH için koruyucu olduğu saptandı. X 447 alelinin serum HDL-K ve apo AI seviyelerinin artışında, çevresel faktörlerin de etkisi dikkate alınarak önemli bir genetik faktör olduğu belirlendi (Kömürcü-Bayrak ve Ark, 2007).

Sonuç olarak *LIPC* geninde gözlenen polimorfizme bağlı olarak ortaya çıkan alelik varyantlar ile HL enzim aktivitesi arasındaki ilişki farklı populasyonlarda yoğun olarak çalışılırken, Türk populasyonunda da bu alanda yapılmış olan birkaç çalışmaya rastlamaktayız. Dünya genelinde *LIPC* geninin en yaygın alelik varyantı olan ve -514C/T değişimine bağlı ortaya çıkan T alel varyantın aktivite üzerinde değişime yol açan en etkin varyant olduğu ve bunun genel etkisinin ise temelde aktivitede bir azalışa yol açtığı ifade edilmektedir. Buna bağlı olarak koroner damar hastalıklarında bir azalmanın gözlemlendiği çelişkili de olsa belirtilmektedir. Türk populasyonunda *LIPC* geni -514 C/T polimorfizmi daha çok kan kolesterol ve lipit alt sınıf düzeyleri arasında ilişkiyi ortaya koymayı amaçlayan klinik esaslı çalışmalara rastlamaktayız. Fakat bu alelin tüm Türkiye'yi kapsayan varyasyon düzeyini ortaya koyacak olan "ortalama heterozigotluk düzeyi" veya "polimorfik lokus yüzdesi"ni açıklayan bir çalışma taramalarda gözlenmemektedir. Bu amaçla Türkiye'nin yedi coğrafik bölgesini kapsayan ve her bölgede belirli şehirlerden rastgele seçilen 700 bireylik bir örneklem grubundan elde edilen ve saflaştırılan DNA örnekleri PZR-RFLP uygulaması ile çalışılarak "ortalama heterozigotluk düzeyinin" saptanması amaçlanmıştır. Bu çalışmaların uzantısını oluşturacak enzim aktivitesini amaçlayan diğer çalışmalar belirlenen alelik varyant düzeyi ile enzim aktivitesinin genel olarak ortaya konulan sonuçlarla örtüşüp, örtüşmediği analiz edilecektir. Zira mevcut literatür verileri alelik varyasyon ile aktivite arasında güçlü bir korelasyon ortaya koymamaktadır.

1. 3.5. Hepatik Lipaz' ın Lipoprotein Metabolizmasındaki Rolü

HL, IDL'nin LDL'ye son dönüşümünü tamamlar. HDL₂'den trigliserit ve fosfolipit kaybı sonucu büyük, daha az yoğun HDL₂'nin küçük, yoğun HDL₃'e dönüşümüne iştirak eder. VLDL kalıntılarının LDL'ye çevrilmesinde de katkıda bulunur ve artık lipoproteinlerin alımını hızlandırır (Chang ve Ark., 1997; Ben-Zeev, 2004; Bensadoun and Berryman,1996; Santamarina-Fojo vd.,1998).

HL genindeki alelik değişimler plazma kolesterolündeki değişikliğin %25' ini açıklamaktadır. HL, lipoproteinlere katalitik olmayan şekli ile bağlanarak işlev yapar ve hepatik reseptörler tarafından kolesterol esterlerini veya tüm partikül

alınımını kolaylaştırır (Jones ve Ark.,2002). Katalitik aktivitesi VLDL artıklarının, LDL ve HDL'nin yeniden şekillendirilmesine katılır. Yüzey proteoglikanları ve LDL reseptör benzeri protein ile birlikte lipoproteinlerin hepatik alınımında bir ligand gibi davranır. Hem katalitik hem de ligand aktivitesi HDL kolesterol esterlerin çöpçü-reseptör B1 aracılı alınımında önemli bir rol oynamaktadır (Zambon ve Ark., 2003).

1. 3.6. Hepatik Lipaz'ın HDL Metabolizmasındaki Rolü

İnsan HDL₂ fosfolipit ve trigliseritleri, HL için tercih edilen substratlardır. Hem kolesterol veya plazma lipit transfer proteini (CETP) hem de HL, HDL partiküllerinin yeniden şekillenmesinde birlikte çalışır. CETP; HDL'deki kolesterol esterlerinin trigliseritçe zengin lipoproteinlerdeki trigliseritlerle yer değiştirmesini sağlar. Aktarılan HDL trigliseritleri, HL için iyi bir substrattır. HL, HDL trigliseritlerini hidrolize eder. HL; ApoA-I ile etkileşir ve HDL büyüklüğünde azalma olur.

Plazmada, lipoliz sırasında lipit içermeyen apoA-I' in hücre membranından salınan fosfolipitler ve kolesterol ile etkileştiği düşünülmektedir. ApoA-I'e lipit eklenmesi, plazmada ApoA-I fosfolipit komplekslerinin oluştuğunu ve tersinir kolesterol taşınmasına katıldığı ileri sürülmektedir (Jones ve Ark., 2002; Zambon ve Ark., 2003; Bensadoun ve Berryman,1996).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Populasyon Çalışması ve Örnekleme:

Çalışmada kullanılan bireyler Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden seçilmiştir. Bu amaçla daha önce Biyoloji ABD'inde Doç. Dr. Naci Değerli danışmanlığında yürütülmekte olan Doktora Tez çalışması kapsamında Arş. Gör. Sevgi Durna tarafından toplanan ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (07/ 04/ 2009 tarihli, 2009-04/17 No'lu Etik kurulu kararı ile) ve Türkiye'nin değişik bölgelerindeki Hastane Etik Kurulu Oluru alınmış derin dondurucuda saklı tutulan saflaştırılmış DNA örnekleri kullanılmıştır.

2.2. DNA İzolasyonu:

Hasta grubundan alınan periferik kandan lökosit DNA'sı aşağıda ayrıntıları verilen Lizis çözeltisi ile serbestlendirilerek, izopropanol çöktürme yöntemiyle izole edilmiştir.

2.2.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Protokol

1. 3 ml EDTA'lı kan falkon tüpüne aktarılır. Üzerine 12 ml (kan hacminin 3 katı olacak şekilde) Red Cell Lysis tamponu konular ve alt-üst edilir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

Red Cell Lysis Tamponu Solüsyon Bileşeni:

- 155 mM Amonyum Klorür (NH_4Cl)
- 10 mM Potasyum hidrojen karbonat (KHCO_3)
- 1 mM Etilen diamin Asetik Asit (EDTA)
- % 2'lik sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

2. Daha sonra 5000 g'de 12dk. santrifüjlenir. Üst sıvı atılır.
3. Dipte kalan lökosit pelleti iyice karıştırılır ve üzerine 1 hacim Cell lysis Solüsyonu eklenir. Yeniden karıştırıldıktan sonra 37°C'de homojenize olana

kadar bekletilir (örnekler homojenize olduktan sonra oda sıcaklığında 18 ay kalabilir).

Cell Lysis solüsyonu tamponu ~10ml kadar eklenir ve homojenize olması için 1 gece 37°C’de etüvde bekletilir (Cell Lysis Tamponu; 25 mM EDTA-%2 SDS).

4. Homojenize olduktan sonra üzerine 1/3 hacim protein presipitasyon solüsyonu (3ml, 10 M Amonyum Asetat) eklenir. İyice vortekslenir ve 10.000 g’de 20dk. Santrifüj edilir.
5. Süpernatant kısmı temiz bir tüpteki 1 hacim izopropanol üzerine alınır. (8 ml izopropil alkol üzerine süpernatant eklenir ve alt üst edilir. Bu aşamada DNA iplikçığı gözlenir.
6. 12.000 g’de 8 dk. kısa bir santrifüjleme yapılır. DNA çöktürülürken süpernatant kısmı atılır. Alttaki DNA pelleti %70’lik Etanolle yıkanır.
7. 12.000 g’de 8 dk. santrifüj edilir, süpernatant atılır. Kapağı açık bir şekilde 1 gün oda sıcaklığında bekletilir.
8. DNA Örneği kuruduktan sonra üzerine 200µl 10 mM TE (Tris EDTA) tamponu veya distile su eklenir ve örnek eppendorf tüpe alınır.

2.3. DNA Derişiminin Belirlenmesi

Bu amaçla DNA’nın 260, proteinlerin 280 nm soğurumları alınarak, ölçülen değerin belirtilen indeks sınırının üstünde olmasına özen gösterilmiştir. İndeksin 1.8 katsayısına yakın olmasına özen gösterilerek DNA saflığı yani kalitesi kontrol edildi. Ayrıca PZR ortamında eşit DNA miktarı sağlamak için, derişimi yüksek olan DNA örneklerinin gerekli oranda seyreltilmesi sağlanmıştır.

2.4.1. PZR Koşulları ve PZR Karışımı

Çalışmamızda *LIPC* geni -514C/T varyantını kapsayan 285 bç’lik kısmı Couture ve Ark., (2000) ve Lahoz ve Ark., (2005) primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı.

- Primer 514F : 5’-TCT AGG ATC ACC TCT CAA TGG GTC A- 3’
- Primer 514R : 5’-GGT GGC TTC CAC GTG GCT GCC TAA G- 3’

2.4.2. PZR karışımının hazırlanışı:

PZR karışımını hazırlamak için;

Konsantrasyon	Hacim
▪ 0.2 mM dNPTs	3 µl
▪ 1.5 mM MgCl ₂	3 µl
▪ 1 xTaq DNA polimeraz ve tampon	5 µl
▪ 1.25 U Taq DNA polimeraz	0.25 µl
▪ 200 nmol Forward primer	2.5 µl
▪ 200 nmol Revers primer	2.5 µl
▪ 10 ng kalıp DNA örneği	4 µl
▪ distile su	29.75 µl

toplam deneysel hacim yukardaki değerlere karşılık gelecek şekilde 50 µl'lik karışım olarak hazırlandı.

Karışım 0.2 ml'lik eppendorf tüplere dağıtıldı ve PZR cihazına konuldu.

PZR Koşulları

▪ Denatürasyon	95 °C ' de 1 dk.
▪ Primer Bağlanması	63°C' de 30 sn.
▪ Uzama	72°C'de 30 sn.
▪ Final Uzama	72°C'de 2 dk.

Toplam 35 Döngü

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi Uygulaması

% 0.8'lik agaroz jelde DNA'nın çoğalıp çoğalmadığı ve saflığı ve son olarak % 2.5lik agorozda ise kesim ürünleri kontrol edilmiştir. Bu amaçla her PZR döngüsü sonrası 10 µl örnek tarak jellerine yerleştirilerek 50 kb moleküler DNA belirteç varlığında 80 Volt'ta 20-30 dk yürütülmüştür.

2.6. Endonükleaz Enzimi ile Kesim İşlemi

Bunun için ampfiliye edilen örnekler *NotI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yürütülerek *T* ve *C* alel sıklıkları, homozigot ve heterozigot band profilleri belirlendi.

Koşulları :

- PCR ürünü : 10 µl
- Distile su : 16.5 µl
- 10xBuffer G: 3 µl
- Enzim : 1,5µl

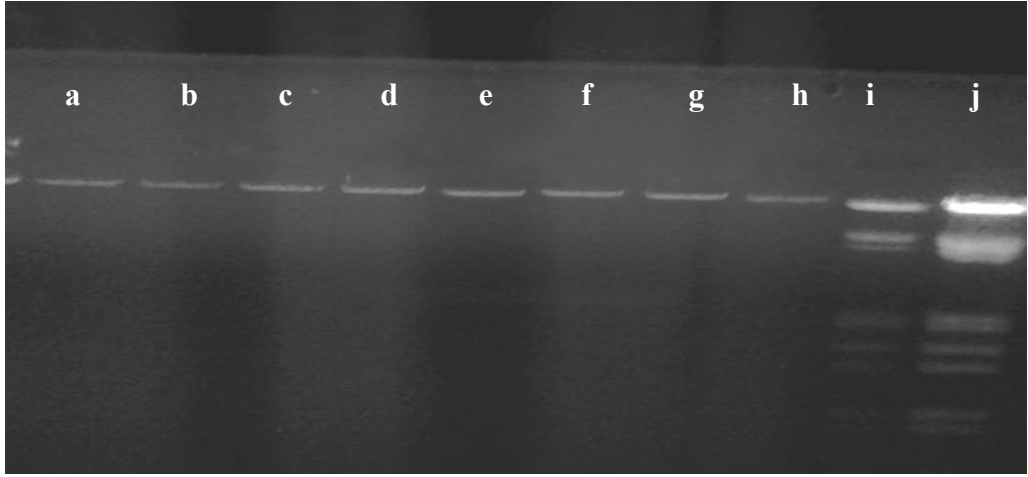
Karışım hazırlandı ve 37°C' de 16 saat inkübe edildi. Band görüntüleri, UV ışığı altında tespit edildi ve resim görüntüleri elde edildi.

2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler PopGene Version 1.31 (Yeh ve Ark., 1999) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilmiş olan alel ve genotip frekansları *Ki-kare* (χ^2) testi kullanılarak Hardy-Weinberg Denge analizi açısından karşılaştırılmış ve farklılıklar değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Tük popülasyonunda *Hepatik Lipaz Geni (LIPC) -514 C/T* alelinin sıklığını ve genel dağılımını belirlemek için Türkiye'nin 7 coğrafik bölgesinin her birini temsilen 100'er örnek olmak üzere toplam 700 rasgele seçilmiş bireyde analiz yapılmıştır. Öncelikle kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak, yeterli kalitede DNA saflaştırılmıştır (**Şekil 4**). Daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonundan (PZR) yararlanılarak *Hepatik lipaz gen* bölgesi çoğaltılmış ve *NlaIII* restriksiyon enzimiyle kesim işlemi yapılarak alel modelleri bulunmaya



Şekil 4. Saflaştırılmış DNA örneklerinin % 0.8'lik agaroz jel görüntüleri ve DNA kalitesinin genel görünümü (a-h: Saflaştırılmış bazı ham DNA görüntüleri, i: *Lambda/Hind III* Moleküler Markır, j: 50 bp'lik DNA ladder).

çalışılmıştır. Genel olarak DNA örneklerinin kalite ve derişimi oldukça iyi durumda olduğu gözlenmiştir. **Şekil 4**'teki jel örneklerinde görüldüğü üzere, izole edilen kalıp DNA örnekleri çok net, belirgin ve herhangi bir smear görüntüsü sergilememektedir. Bu durumda hem DNA kontaminasyon riski, hem de oluşabilecek DNA kırıklıklarının oldukça asgari düzeyde olduğu söylenebilir. Bütün DNA görüntülerinin kalitesi benzer şekilde % 0.8'lik jelde gözlenmiş olup bu sayede tüm PZR amplifikasyonunun daha başarılı çoğaltımına olanak sağlanmıştır.

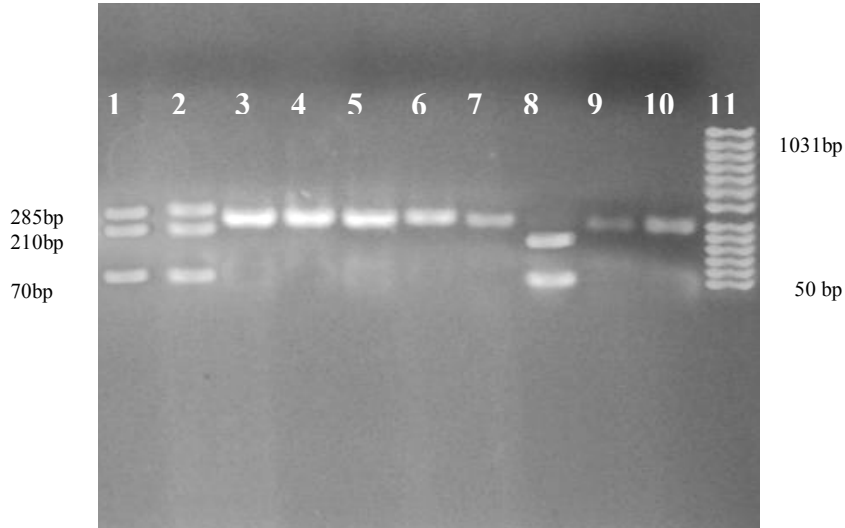
PZR çoğaltımı sonucunda seçilen DNA derişimine bağlı olarak hemen hemen tüm ürünler başarılı şekilde çoğaltılmıştır. Bu sonuçlara bakılarak yapılan DNA

izolasyon uygulamasının oldukça verimli olduğunu söylemek mümkündür. Sonrasında 285 bp'lik olan bu kısa parça *NlaIII* enzimi ile 5' G A T G 3'

3' G T A C 5'

bölgesinden kesime uğratılmış ve **Şekil 5**'teki görülen görüntüler elde edilmiştir. Belirtilen kesim enzimi ile homozigot *CC* aleli taşıyan birey örnekleri kesime uğramadığından 285 bp'lik ürün halinde kalırken, homozigot *TT* bireyleri 215 bp'lik büyük parça ve 70 bp'lik iki ürün şeklinde gözlenmiştir. Heterozigot *CT* aleli taşıyan bireyler ise 285 bp,'lik kesim içermeyen *C* alel ürününe ilaveten, 215 bp'lik ve 70 bp'lik ürünlerin oluşumunda sorumlu *T* alel kesim ürünlerini birlikte sergilemiştir.

Yapılan çalışma sonucunda 85 bireyin heterozigot durumda *LIPC -514CT* genotipine sahip olduğu, 42 bireyin homozigot *-514TT* genotipine sahip olduğu ve 573 bireyinde homozigot *-514 CC* genotipine sahip olduğu yürütülen jel üzerindeki kesim ürünlerine bakılarak tespit edilmiştir (**Şekil 5**).



Şekil 5. Restriksiyon kesimi sonucunda oluşan bant profillerinin görüntüleri: 1 ve 2; 285 bp, 210 bp ve 70 bp'lik heterozigot (*CT*) genotipi. 3, 4, 5, 6, 7, 9 ve 10: kesime uğramamış 285 bp'lik homozigot yabancıl (*CC*) genotipi 8: 210 ve 70 bp'lik polimorfik homozigot (*TT*) genotipini yansıtan band görüntüleri. 11: lik 50-1031 bp'lik dağılıma sahip 50 bp'lik DNA moleküler belirteci.

Genel anlamda *T* alel varyantını içeren homozigot bireylerin bölgesel dağılımının oldukça heterojen olduğu, heterozigot bireylerin az da olsa dengeli dağıldığı ilk göze çarpan veri olarak görülmektedir.

Populasyon hem genel olarak, hem de bölgelere göre ayrılarak genotip ve alel sıklıkları hesaplanmıştır (**Tablo 1 ve 2**). Buna göre tüm homozigot *TT* bireylere yani, genotipi *LIPC -514TT* olan bireylere Marmara bölgesinden ve İç Anadolu Bölgesinden alınan örneklerde rastlanırken, diğer bölgelerde homozigot *TT* genotipli bireyler tespit edilmemiştir. Yine Marmara Bölgesi örneklerinden 10 birey heterozigot iken, 79 birey homozigot *CC* alellere sahiptir. Karadeniz Bölgesi için 7 birey heterozigot genotipteyken, 93 birey homozigot *CC* alellere sahip bulunmuştur. Akdeniz Bölgesi örneklerinden 10 birey heterozigotken, 90 birey homozigot *CC* alellere sahiptir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi örneklerinden 12 birey heterozigotken, 88 birey homozigot *CC* alellere sahiptir. Doğu Anadolu Bölgesi örneklerinden 33 birey heterozigotken, 67 birey homozigot *CC* alellere sahiptir. Ege Bölgesi örneklerinden 12 birey heterozigotken, 88 birey homozigot *CC* alellere sahiptir. İç Anadolu Bölgesi örneklerinden 31 birey homozigot *TT* alellere sahipken 1 birey heterozigot ve 68 birey homozigot *CC* alellere sahiptir (Tablo 1).

Tablo 1'de sunulan verilere bakıldığında *TT* genotipli birey dağılımı açısından bir düzensizlik gözlenmektedir. Her ne kadar çalışılan örnek sayısı çok sınırlı olsa da, sadece 100 bireyi kapsayan bu görüntü oldukça ilginç durmaktadır. Bunun yapılan örneklem seçiminin bir sonucu mu, yoksa doğrudan bu durumu yansıtan genel bir hal olup olmadığı şu an için tartışmalıdır. Artırılan örneklem sayıları ile bu durumun aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. İç Anadolu, Ankara ve Sivas birey genotipleri *TT* genotipi için en yüksek iken (31 birey), heterozigot sayısı (1 birey) ise en düşük değerde bulunmuştur. Homozigot *TT* genotipli birey sayısı Marmara Bölgesinde en yüksek (10 birey), heterozigotların sayısı ise ortalama değerde yer almıştır (10 birey).

Elde edilen veriler ışığında *T* alelinin Türk populasyonu açısından Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edilmiştir. Buna göre populasyondaki *LIPC -514T/T* genotipine sahip formların sıklığı % 6 (42/700) olarak

hesaplanırken, *LIPC* -514C/C genotipine sahip formların sıklığı %81,90 (573/700) hesaplanmış ve heterozigot -514C/T genotipine sahip formların sıklığı da %12,10 (85/700) olarak tespit edilmiştir. Çalışılan popülasyondaki C alelinin sıklığı %87.90 (1231/1400) iken, T alelinin sıklığı ise %12.10 (169/1400) olarak tespit edilmiştir. (**Tablo 3**). Hardy Weinberg denge analiz sonucunda *Khi kare* (χ^2) testi için bulunan değer 0.736 iken, p:0.376 olarak gözlenmiş olması, bu alelin sıklığında bir değişme olmadığını belirtmektedir. Ayrıca **Tablo 4**'deki verilere bakıldığında popülasyonun gözlenen genotip frekansının, beklenen genotip frekansına yakın olması, popülasyonun bu alel açısından dengede olduğunu bir başka kanıttır. Varyasyonun bir ifadesi olan Ortalama Heterozigotluk değerine (0.1298) bakıldığında ise bu alelin polimorfik bir oluşum olarak popülasyonda temsil edildiğini ifade etmektedir (**Tablo 4**).

Tablo 1. Bölgelere göre 700 bireyin genotip dağılımları.

Örneklerin Alındığı Bölge ve İl Adları	-514 C/C	-514 T/T	-514 C/T	Toplam
İç Anadolu Bölgesi (Sivas-Ankara)	68	31	1	100
Marmara Bölgesi (İstanbul)	79	11	10	100
Akdeniz Bölgesi (Mersin-Hatay)	90	0	10	100
Karadeniz Bölgesi (Trabzon)	93	0	7	100
Ege Bölgesi (İzmir-Manisa-Kütahya)	88	0	12	100
Güney Doğu Anadolu Bölgesi (Urfa-Diyarbakır)	88	0	12	100
Doğu Anadolu Bölgesi (Van-Kars)	67	0	33	100
Toplam	573	42	85	700

Tablo 2. Genotip sıklıklarının genel dağılımı: 700 bireyden oluşan ve farklı coğrafik bölgelerden elde edilen DNA

verilerine göre *LIPC* geninin -514C/T promotor varyasyonunu kapsayan bireylerin homozigot yabanıl (*CC*), heterozigot (*C/T*) ve homozigot varyant (*T/T*) genotip değerlerinin sayısal ve % dağılım verileri.

Genotip	N	%
<i>CC</i>	573	81,90 (573/700)
<i>TT</i>	42	6,0 (42/700)
<i>CT</i>	85	12,10 (85/700)

Tablo 3. *LIPC* geninin -514 *C/T* promotor varyasyonuna bağlı ortaya çıkan alelik varyasyon ve bu alel sıklıklarının genel dağılımı: **Tablo 2’de** elde edilen genotip değerlerine bağlı olarak elde edilen *C* ve *T* aleli taşıyan birey sayısı ve yüzdeler değerler dağılımı.

Alel	N	% Dağılım
<i>C</i>	1231	87,90 (1231/1400)
<i>T</i>	169	12,10 (169/1400)

Tablo 4. Örnekleme yapılan istatistiksel analiz sonuçları: Seçilen populasyon büyüklüğüne bağlı olarak gözlenen ve beklenen

homozigot/ heterozigot değerlerinin aynı olması, populasyonun Hardy-Weinberg Denge analizi açısından dengede olduğunu ortaya koymaktadır. Ortalama heterozigot değerine bakıldığında tek baz değişimine bağlı ortaya çıkan varyasyon düzeyinin 0.1298 olarak tespit edildiği görülmektedir.

lokus	Örn büyüklüğü	Göz. Hom.	Göz het.	Bek. Hom.*	Bek. Het.*	Nei**	Ort. Het.
<i>LIPC</i>	1400	0.8665	0.1335	0.8698	0.1302	0.1298	0.1298
Ort.	1400	0.8665	0.1335	0.8698	0.1302	0.1298	0.1298
Std. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Örn.Büyüklüğü: Örneklem büyüklüğü, Göz. Hom.: Gözlenen Homozigot Değeri, Göz. Het. : Gözlenen Heterozigot Değeri

Bek. Hom.:Beklenen Homozigot Değeri, Bek. Het: Beklenen Heterozigot Değeri, St.Sap.: Standart Sapma

* Beklenen Homozigot ve Heterozigot verileri Levene(1949) kullanılarak elde edilmiştir.

** Nei'nin (1973) beklenen heterozigot değeri.

Ki-kare (χ^2): 0736, p değeri: 0.396

4. TARTIŞMA

Çalışmanın temel amacı mümkün olduğu ölçüde çok sayıda birey kullanarak Türk popülasyonunda *LIPC* geninin promotor bölgesindeki polimorfizme bağlı olarak ortaya çıkan ve *T* aleli olarak adlandırılan bu varyant'ın rasgele sıklığının ne düzeyde olduğunu saptamaktır. Ayrıca diğer popülasyonlarla bir kıyaslama yapmak ve en azından bazı lipit metabolizma bozuklukları ile gözlenen dağılımın ilgisinin olup olamayacağı ile ilgili bilgiler elde etmek amaçlanmıştır. Dağılım bilgileri yanında verilerine paralel olarak bireylerle ilgili sınırlı sayıda bir anket veya anemnez bilgisi alınarak gözlenen varyasyon ile bu veriler ışığında bazı kaba değerlendirmeler yapılması istenmiş, bu konuda örnek almaya yardımcı olan bireylerin gerekli desteği sağlamaması nedeniyle, bu hususun yeterince üzerinde durulamamıştır.

Türk Popülasyonunun genelini amaçlayan bu çalışma ile hepatik lipaz geni promotor bölge -514 *C/T* tek nükleotit polimorfizme ait varyant formunun genel dağılımı belirlenmeye çalışılmıştır. Hatta rasgele seçilen bazı bölge illerden alınan örnekler ile bu varyant alelin frekansı bazı şehirler üzerinden tespit edilmiştir. Literatür bilgileri esas alınarak kesim ürünü içermeyen yaygın bulunan temel birey gruplarının *CC* genotipli bireyler olduğu ve bu genotipi taşıyan bireylerin diğer popülasyonlarda olduğu gibi yüksek sıklıkta olduğu saptanmıştır. *LIPC* geni'nin, promotor bölgesindeki -514 *C/T* değişimine bağlı olarak ortaya çıkan ve *T* aleli olarak adlandırdığımız varyantın sıklığı ise gerek heterozigot gerekse homozigot genotipli bireylerden elde edilen toplam değere bağlı bulunuş oranı % 12.1 olarak tespit edilmiştir. Bu oran *T* aleli açısından diğer popülasyonlar için ön görülen % 15- 30 arasındaki değerden düşük gözükmektedir (Lahoz et al 2005; Gomez et al. 2005). Genel olarak *CC* genotipli olma veya *C* aleli taşıyor olmak lipaz ativitiesinde *T* alelini taşıyan bireylere göre % 20-30 daha yüksek enzim aktiviteli olmakla ilişkilendirildiği bir olgu olarak sunulmuş ve bu genel bilgilerde belirtilmiş bulunmaktadır. Yüksek enzim aktiviteli genotipe sahip olmak, yüksek LDL ve düşük HDL₂ düzeyi ile ilişkilendirildiğinden ve bununda koroner arter hastalığına yol açıyor olması nedeniyle, Türk popülasyonunun bu

anlamda bu tür kalp hastalıklarına daha açık olduğunu ön görmek mümkündür. Ancak hastalığın çoklu gen ürünleri tarafından yönlendiriliyor olması nedeniyle bunun tek başına bu sonuca yol açtığını söylemek şu an için mümkün gözükmemektedir.

Mısırlıoğlu (2004) tarafından koroner hasta grubunda *Hepatik Lipaz Geninin* farklı varyant formları ve koroner hastalık ile ilgili yapılan ilişkilendirme amaçlı çalışmalar dizi analizi esaslı olması nedeniyle, bu çalışma dikkate alındığında izlenen yaklaşıma bağlı olarak elde edilen sonuçlar doğru gözükmemektedir. Buna göre yaptığımız çalışma ile **Tablo 2'de** belirtildiği gibi, 700 bireylik genel populasyonu temsilen rasgele seçilen populasyon grubunda 573 bireyin *CC* genotipli olduğu (% 81.90), 85 bireyin *CT* heterozigot genotipli (% 12,10) olduğu ve 42 bireyin ise *TT* genotipli varyant bireyler (% 6) olduğu saptanmıştır. Alelik dağılımın ise *C* aleli için % 87.90, *T* aleli için ise % 12. 10 olarak saptanmıştır. Alel sıklıklarının sayısal dağılımı ise **Tablo 3'te** gösterilmiştir.

Bu veriler ışığında populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığını saptamak amacıyla yapılan analizlerde bir sapma gözlenmemektedir. Gözlenen ve beklenen heterozigot frekansları benzer bulunduğu için, populasyonun *-514 C/T* promotor bölgesinin 285'lik bç açısından H-W dengesinde olduğu ve gözlenmektedir (**Tablo 4**).

Azalmış plazma HDL-C konsantrasyonları, abdominal obezite v.b. gibi değişkenlerle de açıkça ilgilidir. Yaşam tarzı, sigara içmek ve kalıtsal faktörler de azalmış HDL-C konsantrasyonunda önemli rol oynar. Aslında, aile ve tek yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalar yüksek plazma HDL konsantrasyonunun bu tür bireyler arasında değişiminin %60 kadar olduğunu göstermiştir.(Pe'russe ve Ark.,1997; Heller ve Ark.,1994; Cohen ve Ark.,1994).

Son çalışmalar hepatic lipaz genindeki polimorfizmlerin apolipoprotein *AI/CIII/AIV,11* ve *Kolesterol Ester Protein* lokuslarının genetik olarak belirlenen HDL plazma yoğunluk varyasyonlarının önemli bir nedeni olduğunu göstermiştir (Pe'russe ve Ark.,1997).

Düşük HDL'ye yol açan birçok genetik neden tanımlanmıştır. Bunlardan doğrudan HDL'yi etkileyenler *apoA-I* ve *ApoA-ICII* mutasyonları, *ABCA1* gen

mutasyonları, HL ve LPL enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sıralanabilir. HDL metabolizmasında HL'nin enzim düzeyleri ile yapılan çalışmalarda, bazı Türk populasyonlarında Batı ülkelerine göre HL düzeyinin %25-30 daha yüksek olduğu bulunmuştur (Bersot ve Ark.,1999; Bersot ve Ark.,2002; Mahley ve Ark., 2000).

Hepatik lipaz geninde şüana kadar birkaç polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler seyrek Hepatik lipaz yetmezliği ile ilişkili değişik sayıda varyasyonları içermektedir (Hegele ve Ark.,1992; Hegele ve Ark.,1993; Brand ve Ark.,1996; Knudsen ve Ark.,1996). Ayrıca *Hepatik lipaz gen* promotor varyasyonları ve Hepatik Lipaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi rapor eden birkaç çalışma vardır. Bu çalışmalardan biri *Hepatik lipaz geninin* promotorundaki -480 C/T polimorfizmin seyrek bir alelinin yüksek LDL fenotipiyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Böylelikle *LIPC gen* promotor polimorfizmi ve HL aktivitesi ve plazma lipoprotein konsantrasyonları arasında bir ilişkinin olduğuna dair kaydadeğer kanıtlar elde edilmiştir. (Jansen ve Ark.,1997; Vega ve Ark.,1998; Zambon ve Ark.,1998).

Carr ve ve Ark (2004), Japon ve Siyahî populasyonda *LIPC* promoter polimorfizminin yüksek alel frekansı plazma HDL-C düzeyindeki etnik farklılığın, HL aktivitesiyle açıklanabileceğini bildirmişlerdir. Siyah erkek bireylerde aynı yaştaki beyaz erkeklere göre plazma HDL-C düzeyinin yaklaşık % 20 daha yüksek olduğunu ama nedeninin tam açıklanamadığına dikkat çekilmiştir (Carr ve Ark.,2004).

Populasyon düzeyinde, *LIPC promotor* polimorfizmlerinin sık olduğunu, -514C/T polimorfizmi T alel sıklığının yaklaşık olarak Beyaz Irk'ın bazı populasyonlarını kapsayan çalışmalarda %20, Kore, Çin, Çek ve İspanyollarda %35, Afrika Populasyonunda ve Japonlarda %50, Kanada populasyonunu oluşturan akraba topluluklarda %21 ila %38 arasında değiştiği bildirilmiştir (Hegele Ark.,1999; Park ve Ark.,2003; Carr ve Ark.,2004). Bu durumda Türk Populasyonunun geneline yönelik bu çalışma ile T alelinin genel sıklığının Beyaz Irk için (% 20 -21) belirtilen değerinin altında olduğu (% 12.10) görülmektedir. Fakat literatürde yer alan bilgiler daha çok hastalık grubu yani koroner arter

hastalığını kapsayan bireyler olması, bizim örneklerin ise hastanelere başvuran ve koroner hastalığı dikkate alınmayan rasgele seçilmiş bireyler olması nedeniyle ortaya çıktığını ön görmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ameis, D., Stahnke, G., Kobayashi, J., McLean, J., Lee, G., Buscher, M., Schotz, M.C., Will, H., 1990.** Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene. *J Biol Chem.*; 265:6552– 6555.
- Baynes, J. and Dominiczah, M.H. 1999.** Medical Biochemistry. Mosby Ben-Zeev, O. Doolittle, M,H., 2004. Maturation of hepatic lipase. Formation of functional enzyme in the endoplasmic reticulum is the rate-limiting step in its secretion. *J Biol Chem*, 279 (7): 6171-81.
- Bensadoun, A. and Berryman, D.E, 1996.** Genetics and molecular biology of hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol*, 7(2):77-81.
- Ben-Zeev, O., Doolittle, M,H.,2004.** Maturation of hepatic lipase. Formation of functional enzyme in the endoplasmic reticulum is the rate-limiting step in ts secretion. *J Biol Chem*, 279(7):6171-81.
- Bersot, T.P., Vega, G.L., Grundy, S.M., Palaoglu, K.E., Atagunduz, P., Ozbayrakci, S., Gokdemir, O., Mahley, R.W., 1999.** Elevated Hepatic Lipase Activity and Low Levels Of High Density Lipoprotein İn A Normotriglyceridemic, *Nonobese Turkish Population*. *J Lipid Res*. 40(3):432-8.
- Bersot, T.P., Palaoglu, K.E., Mahley, R.W.,2002.** Menaging dyslipidemia in Turkey: suggested guidelines for a population characterized by low levels of high density lipoprotein cholesterol. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2(4):315-22.
- Bhagavan N.V.,1992.** Medical Biochemistry, Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Brand, K., Dugi K.A., Brunzell J.D, Nevin D.N., Santamarina-Fojo, S.,1996.** A novel A-G mutation in intron I of the hepatic lipase gene leads to alternative splicing resulting in enzyme deficiency. *J Lipid Res*. 37: 1213–1223.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1996.** Fundamentals of clinical Chemistry, In Stein

EA, Myers GL, eds. *Lipids, Apolipoproteins and lipoproteins*, 4th ed, Saunders Company:375-401.

Carr, M.C., Brunzell J.D., Deeb S.S., 2004. Ethnic differences in hepatic lipase and HDL in Japanese, Black and White Americans: Role of central obesity and LIPC polymorphisms. *J Lipid Res*, 45(3):466-73.

Chang, S.F., Scharf, J.G., Will, H., 1997. Structural and functional analysis of the promoter of the hepatic lipase gene. *Eur J Biochem*, 247 (1):148-59.

Cohen, J. C., Wang, Z., Grundy, S.M., Stoesz. M.R., Guerra, R., 1994. Variation at the hepatic lipase and apolipoprotein AI/CIII/AIV loci is a major cause of genetically determined variation in plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Invest.*;94:2377–2384.

Connelly, P.W., 1999. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta*, 286(1-2):243-55.

Data, S., Luo, C-C, Li, W-H., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Brown, M.A., Chen, S-H, Liu, S.W., Chan, L., 1988. Human hepatic lipase: cloned cDNA sequence, restriction fragment length polymorphisms, chromosomal location, and evolutionary relationships with lipoprotein lipase and pancreatic lipase. *J Biol Chem*, 263:1107–1110.

Davidson MH., 2002. The Mobile Lipid. *Clinic. A . Companion Handbook*. Lippincott Williams Wilkins, Chapter 2, Philadelphia, USA.

Davis, R. C., Diep, A., Hunziker, W., Klisak, I., Mohandas, T., Schotz, M.C., Sparkes, R S., Lusic, A.J. 1991. Assignment of human pancreatic lipase gene (*PNLIP*) to chromosome 10q24-q26. *Genomics* 11: 1164-1166.

Despres, J.P., Ferland, M. ve Moonarji, S., 1989. Role of the hepatic triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Atherosclerosis*, 9: 485-92.

Dugi, K.A., Dichek, H.L., Santamarina-Fojo, S., 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J Biol Chem*, 270(43):25396-401.

Guerra, R., Wang, J., Grundy, S.M., Cohen, J.C., 1997. A hepatic lipase

(LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 4532–4537.

- Hegele, R.A., Tu, L. and Connelly, P.W., 1992.** Human hepatic lipase mutations and polymorphisms. *Hum Mutat.*;1:320–324.
- Hegele, R.A., Little, J.A., Vezina, C., Maguire, G.F., Tu, L., Wolever, T.S., Jenkins, D.J.A, and Connelly, P.W., 1993.** Hepatic lipase deficiency: clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler Thromb.*;13:720–728.
- Hegele, R.A., Harris, S.B., Brunt, J.H., Young, T.K., Hanley, A.J., Zinman, B., Connelly, P.W.,1999.** Absence of association between genetic variation in the LIPC gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis*,146(1):153-60.
- Heler, D.A., Pedersen, N.L, DeFaire, U., and McClearn, G.E., 1994.** Genetic and environmental correlations among serum lipids and apolipoproteins in elderly twins reared together and apart. *Am J Hum Genet*. 55: 1255–1267.
- Hill, J.S., Davis, R.C., Yang, D., Wen, J., Philo, J.S., Poon, P.H., Phillips, M.L., Kempner, E.S., Wong, H.,1996.** Human hepatic lipase subunit structure determination. *J Biol Chem*, 271(37):22931-6.
- Hill, J.S., Yang, D., Nikazy, J., Curtiss, L.K., Sparrow, J.T, Wong, H.,1998.** Subdomain chimeras of hepatic lipase and lipoprotein lipase. Localization of heparin and cofactor binding. *J Biol Chem*, 273 (47):30979-84.
- Holmer, S.R., Hengstenberg C., Mayer,B. and et al.,2000.** Lipoprotein lipase gene polymorphism, cholesterol sub fractions and myocardial infarction in large samples of the general population. *Cardiovascular Research*. 47:806-812.
- Jackson R.C., and Gotto A.M.,1974.** Phospholipids in biology and medicine, *N.Eng. J. Med*, 290: 24-9.
- Jansen, H., Verhoeven, A.J.M., Weeks, L., Kastelein, J.J.P., Halley, D.J.J, van der Ouwehand, A., Jukema, J.W., Seidell, J.C, and Birkenhager, J.C., 1997.** Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic

lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2837–2842.

Jones, D. R., Schmidt, R. J., Pickard, R.T., Foxworthy, P.S., Eacho, P.I., 2002.

Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J lipid Res*, 43: 383-391.

Karackattu, S.L, Trigatti, B. And Krieger M., 2006. Hepatic lipase deficiency delays atherosclerosis, myocardial infarction, and cardiac dysfunction and extends lifespan in SR-BI/apolipoprotein E double knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (3): 548–54.

Kathiresan, S.; Melander, O.; Anevski, D.; Guiducci, C.; Burt, N. P.; Roos, C.; Hirschhorn, J. N.; Berglund, G.; Hedblad, B.; Groop, L.; Altshuler, D. M.; Newton-Cheh, C.; Orho-Melander, M., , 2008. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *New Eng. J. Med.* 358: 1240-1249.

Knudsen, P., Antikainen ,M., Ehnholm, S., Uusi-Oukari, M., Tenkanen, H., Lahdenpera, S., Kahri, J., Tilly-Kiesi, M., Bensadoun, A., Taskinen, M-R., Ehnholm, C., 1996. A compound heterozygote for hepatic lipase gene mutations Leu334-Phe and Thr383-Met: correlation between hepatic lipase activity and phenotypic expression. *J Lipid Res.* 37: 825–834.

Kömürcü-Bayrak.,E., Onat, A., Poda, M., and et al.,2007. The S447X variant of lipoprotein lipase gene is associated with metabolic syndrome and lipid levels among Turks. *Clinica Chemica Acta.*383:110-115).

Lahoz, C., Pena, R., Mostaza, J. M., Laguna, F., Garcia-Iglesias, M.F., Taboada, M. and Pinto, X. 2005. The -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene significantly modulates the HDL-cholesterol response to statin treatment. *Arteriosclerosis.* 182: 129-134.

Liao, Y.C., Lin, H.F., Rundek, T., Cheng, R., Hsi, E., Sacco, R.L.and Hank Juo, S.H. 2008. Multiple genetic determinants of plasma lipid levels in Caribbean Hispanics. *Clinical Biochemistry.* 41: 306-312.

Mahley, R.W., Pepin, J., Palaoglu, K.E., Malloy, M.J., Kane, J.P., Bersot,

T.P.,2000. Low levels of high density lipoproteins in Turks, a population with elevated hepatic lipase. High density lipoprotein characterization and gender-specific effects of apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res*, 41(8):1290-301.

Mısırhoğlu, M, 2004. Koroner Arter Hastalarında Hepatik Lipaz Gen Polimorfizm Sıklığının Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Murray, R.K., Mayes, P. A., Granner, D.K., and Rodwell, V.W., 1990. Harper's Biochemistry. Large Medical Publications, Twenty second edition.

Murray, R. K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.,1993. Harper'in Biyokimyası 1. Baskı, Lipid Taşınması Ve Depolanması, Barış Kitabevi (Çeviri:Menteş, G., Ersöz, B.), İstanbul, 292-303.

Momsen, W. E. and Brockman, H. L., 1976. Inhibition of pancreatic lipase B and hepatic lipase activity by taurodeoxycholate and its reversal by colipase. *J. Biol. Chem* 251: 384-388.

Park, K.W., Choi, J.H., Chae, I.H., Cho, H.J., Oh, S., Kim, H.S., Lee, M.M., Park, Y.B., Choi Y.S.,2003. Hepatic lipase C514T polymorphism and its relationship with plasma HDL-C levels and coronary artery disease in Koreans. *J Biochem Mol Biol*, 31;36(2):237-42.

Perret, B., Mabile, L., Martinez, L., Terce, F., Barbaras, R., and Collet, X, 2002. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J lipid Res*, 43: 1163-1169.

Persson, B., G. Bengtsson-Olivecrona, S. Enerbftck, T., Olivecrona, K. and Jamvall, H. 1989. Structural features of lipoprotein lipase. *Eur. J. Biochem.* 179: 39-45.

Pe´russe, L., Rice, T., Despre´s, J.P., Bergeron, J., Province, M.A., Gagnon, J., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S, Wilmore, J.H, Bouchard, C.,

1997. Familial resemblance of plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipoprotein and hepatic lipases in the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;17:3263–3269.

Santamarina-Fojo, S., Haudenschield, C. and Amar, M., 1998. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 9(3):211-9.

Song, J., Hong S.H, Kim JQ, Genetic variations of the Hepatic Lipase gene in Korean patients with coronary artery disease.2000. *Clinical Biochemistry*, Vol.33,No.4,291-296.

Steinmetz, J., Boerwinkle, E., Gueguen, R, et al.1992. Multivariant genetic analysis of high density lipoprotein particules. *Atherosclerosis*. 92 :219-227.

Terwilliger, J. D. ve Ott, J. 1994. Handbook of Human Genetic Linkage. First Ed. Terwilliger J.D., Ott, J., The John Hopkins University Press, Baltimore.

Vega, G.L., Clark, L.T., Tang, A., Marcovina, S., Grundy, S.M. and Cohen JC. 1998. Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of the 59 flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res*. 39:228 –232.

Wong, H., and Schotz, M.C.,2002. The lipase gene family. *J lipid Res*, 43: 993-99.

Zambon A, Deeb SS, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD.,1998. Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL2 cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18: 1723–1729.

Zambon, A., Bertocco, S., Vitturin, P.V., Vianello, D. and Crepaldi, G.,2003. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 5):1070-4.

Zubay G. 1993. Biochemistry, Third edition, Brown Publishers.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Didem Segah AKSÜT
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 23.02.1984
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Mimar Sinan Mah.16.sok. Özdemir Evler C Blok no:18 SİVAS
E-posta Adresi	aksutds@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Selçuk Anadolu Lisesi,2002
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2007
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2007-

İş Tecrübesi

Gürbüz Sağlık Ürünleri Ltd Şti.	Biyolog/Satış Temsilcisi, 2009-
---------------------------------	---------------------------------