



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YAYGIN GELİŞİMSEL BOZUKLUKTA APOLİPROTEİN E GEN
POLİMORFİZMİNİN MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Yrd. Doç. Dr. Yeşim TANELİ

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2006



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

YAYGIN GELİŞİMSEL BOZUKLUKTA APOLİPOPROTEİN E GEN
POLİMORFİZMİNİN MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Yrd. Doç. Dr. Yeşim TANELİ

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS

Bursa-2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

‘Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Apolipoprotein E Gen Polimorfizminin Moleküler Genetik Yöntemle Araştırılması’ konulu bu tez, jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Adı ve Soyadı

İmza

Tez Danışmanı Prof. Dr. İ. Hakkı Ulus

Üye Prof. Dr. M. Sibel Gürün.....

Üye Prof. Dr. Kasım Özlük.....

Üye Prof. Dr. Lütfiye Eroğlu.....

Üye Prof. Dr. Vahide Savcı.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve
..... sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kasım Özlük
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
SUMMARY	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
Yaygın Gelişimsel Bozukluk ve Otizm.....	2
YGB, Otizm ve Genetik	8
YGB, Otizm ve kromozom 19.....	9
Sağlık, Hastalık ve ApoE	10
ApoE ve YGB / Otizm	12
Lipid Metabolizması ve Apolipoprotein E.....	16
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction):	29
Revers Hibridizasyon:	31
GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
Örneklem Grubu:.....	32
Kan örneklerinin toplanması ve örneklerin işlenmesi:	32
Kullanılan Kitler:.....	32
A- DNA İzolasyonu.....	33
B- In Vitro Amplifikasyon (PCR):	33
C- Revers Hibridizasyon :	34
D- Değerlendirme ve Sonuçların Yorumu	35
İstatistiksel Analiz:	39
BULGULAR	40
TARTIŞMA ve SONUÇ	46
EKLER	49
EK A: Olgu Sonuçları I	50
EK A: Olgu Sonuçları II.....	51
EK B: Allel dozu ve ApoE düzeyi ile lipid parametrelerinin non-parameterik korelasyonları	52
KAYNAKLAR.....	53
TEŞEKKÜR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÖZET

Yaygın Gelişimsel Bozuklukta Apolipoprotein E Gen Polimorfizminin Moleküler Genetik Yöntemle Araştırılması

Yrd. Doç. Dr. Yeşim Taneli

Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD

Yaygın Gelişimsel Bozukluk (YGB) için klinik uygulamada kullanılabilecek biyolojik belirteçler henüz saptanamamıştır. YGB’de, Apolipoprotein E’nin (ApoE’nin) de lokalize olduğu 19. kromozomda bir bozukluk düşündürecek bulgular bildirilmiş ise de, ApoE gen polimorfizminin rolü henüz belirlenmemiştir.

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında ‘YGB’ tanısı ile izlenen hastalarda Apolipoprotein E gen polimorfizmi DNA izolasyonu, polymerase chain reaction (PCR) ve revers hibridizasyon yoluyla incelenmiştir.

ApoE gen polimorfizmi 41 hastada (34 erkek, 7 kız) belirlenmiştir (%83 erkek, %17 kız; erkek/kız:4,9). En sık saptanan ApoE genotipi 3/3’dir (%68,3), bunu 2/3 (%17,1), 3/4 (%12,2) ve 2/4 (%2,4) izlemektedir. ApoE genotipi 2/2’ye ve 4/4’e rastlanmamıştır. En sık görülen allel e3’tür (%83), bunu e2 (%10) ve e4 (%7) izlemektedir. Cinsiyete göre ApoE e2, e3, e4 allel dozu, ApoA1, E, B düzeyleri ve lipid metabolizması parametrelerinin ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Kızlarda e4 frekansı hafif artmış bulunmuştur (p=0,059). Genotipe göre ApoE düzeyinin ve allel dozunun karşılaştırılmasında anlamlı bir fark görülmemiştir. ApoE gen polimorfizmi ile ilgili bu parametreler toplumda ve diğer toplumlarda sağlıklı bireylerde saptanan değerlerle uyumludur ve anlamlı bir fark görülmemiştir. ApoE düzeyi ile kolesterol düzeyi (p=0,007), HDL düzeyi (p=0,009) ve ApoA1 düzeyi (p=0,003) arasında anlamlı ve pozitif yönde ilişki bulunmuştur. Ayrıca yüksek Allel 2 dozu ile yüksek ApoE düzeyi (p=0.062); yüksek Allel 3 dozu ile yüksek VLDL düzeyi (p=0,089) ve yüksek Allel 4 dozu ile düşük lipoprotein (a) düzeyi (p=0,058) arasında anlamlı düzeye yaklaşan ilişki tespit edilmiştir.

Sonuç: Bulgular, YGB’de belirgin bir ApoE gen polimorfizmi etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apolipoprotein E, Yaygın Gelişimsel Bozukluk, Lipid Metabolizması, Otizm, Çocuk Psikiyatrisi.

SUMMARY

Molecular Genetic Investigation of Apolipoprotein E Gene Polymorphism in Pervasive Developmental Disorder

Assist. Prof. Dr. Yesim Taneli

Uludag University, Inst. of Health Sciences, Dept. Pharmacology & Clinical Pharmacology

Biological markers for clinical use in Pervasive Developmental Disorder (PDD) have not been identified. As much as the 19th chromosome which carries the Apolipoprotein E (ApoE) gene has been implicated in PDDs, the role of ApoE gene polymorphism is yet to be understood.

In this study, ApoE gene polymorphism was identified via DNA isolation, PCR and reverse hybridization in children with PDD admitted to the Uludag University Medical Faculty Child and Adolescent Psychiatry Department.

ApoE gene polymorphism was studied in 41 patients (34 males (83%), 7 females (17%), male-to-female ratio 4.9:1). The most common ApoE genotype was 3/3 (68.3%), followed by 2/3 (17.1%), 3/4 (12.2%), and 2/4 (2.4%). There were no 2/2 or 4/4 subjects. The most common allele was e3 (83%), followed by e2 (10%) and e4 (7%). Between males and females ApoE e2, e3, e4 allele dose, ApoA1, E, and B levels and mean values for lipid metabolism parameters did not differ significantly. In girls, e4 frequency was slightly elevated ($p=0.059$). ApoE levels and allelic dose did not differ by genotype. ApoE gene polymorphism parameters were in accordance with population data and no difference was found. ApoE levels correlated significantly with cholesterol levels ($p=0.007$), HDL levels ($p=0.009$), and ApoA1 levels ($p=0.003$). Correlations between high Allele 2 dose and high ApoE levels ($p=0.062$), high Allele 3 dose and high VLDL levels ($p=0.089$) and high Allele 4 dose and low lipoprotein(a) levels ($p=0.058$) approached statistical significance.

Conclusion: Data show no distinct ApoE gene polymorphism pattern in PDD.

Key Words: Apolipoprotein E, Pervasive Developmental Disorders, Lipid Metabolism, Autism, Child Psychiatry.

GİRİŞ

Yaygın Gelişimsel Bozukluk (YGB), özellikle sosyal ilişki zorluğu, sözel iletişim eksikliği ve stereotipilerle karakterize olup, başta Otizm ve Asperger Sendromu olmak üzere bir grup bozukluğu içermektedir. Erken yaşlarda başlayan bu bozuklukta erken tanı ve tedavinin önemi büyüktür. Çocuklukta otistik özellikleri olan, semptomları yoğun tedavi ve yakın aile desteği ile azalan bazı çocuklar, daha sonra durumları hakkında değerlendirmelerde bulunabilmiştir:

- *'Anne, yalnızlığa geri dönülmez değil mi?'* (Erkek, 12 yaşında, 5. sınıf öğrencisi) (1).
- *'...Sanki üzerimdeki cam fanus kaldırılmıştı: Beş yıldır kaçırdığım her şey, parfüm kokusu, kuş cıvıltısı, ve bir gülümsemenin ne olduğunu bilmek...'* (Tedavisine 5 yaşında başlanan bayan üniversite öğrencisi) (2).
- *'Gramofonu sevdim anne, müzik beni ormanın derinliklerinden çıkardı.'* (Otistik semptomları nedeniyle 10 yıl süreyle kaynaştırma eğitimine benzer eğitim alan 1947 doğumlu, 18 yaşında bayan hasta) (3).

YGB'de halen ayırıcı tanıda yol gösterebilecek, doğal gidişi öngörebilecek ya da tedaviye yanıtı ölçebilecek biyolojik belirteçler saptanamamıştır. Yaygın Gelişimsel Bozuklukların güçlü bir genetik komponenti olduğu kanısı ise giderek yaygınlaşmaktadır (2). Otizm için yatkınlık oluşturan bölgeleri moleküler genetik yöntemle inceleyen geniş ölçekli iki çalışmada (IMGSAC ve PARIS) (4, 5), başka bölgelerin yanı sıra 19. kromozomda da bir bozukluğa işaret edecek bulgular saptanmıştır (2). Tez konusunun belirlendiği dönemde, 19. kromozomda lokalize olan Apolipoprotein E'nin gen polimorfizminin YGB'deki olası rolünü inceleyen herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Son dönemde yayınlanan az sayıda çalışma ise konuyu daha fazla incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, Yaygın Gelişimsel Bozuklukta ApoE gen polimorfizminin (ApoE genotipi bağıl frekansları) moleküler yöntemle belirlenmesi ile saptanan dağılımın olası değerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Yaygın Gelişimsel Bozukluk ve Otizm

Yaygın Gelişimsel Bozukluk (YGB), başta Otizm ve Asperger Sendromu olmak üzere bir grup bozukluğu içermektedir. Erken yaşlarda başlayan, özellikle sosyal ilişki zorluğu, sözel iletişim eksikliği ve stereotiplerle karakterize olan bu bozukluk grubu, alt tipine göre % 40 ila %80 oranında kalıcı fonksiyon kaybına yol açmaktadır (Tablo 1) (6).

Tablo 1: YGB’de Özür Durumuna Göre Tüm Vücut Fonksiyon Kaybı Oranı*

YGB	Vücut Fonksiyon Kaybı Oranı	ICD-10 kodu**	DSM-IV-TR*** kodu
Otizm	%80	F84.0	299.00
Atipik Otizm	%40	F84.1	Karşılığı yok; öneri: 299.80
Rett Sendromu	%80	F84.2	299.80
Desintegratif Psikoz	%80	F84.3	299.10
Stereotipi, Zeka Geriliği, Hiperaktivite	Tanımlanmamış	F84.4	Karşılığı yok; öneri: 313.9
Asperger Sendromu	%40	F84.5	299.80
Diğer YGB	Tanımlanmamış	F84.8	Karşılığı yok; öneri: 313.9
Başka türlü tanımlanmamış YGB	Tanımlanmamış	F84.9	299.80

* Tablo bilgileri Devlet Bakanlığı, 2006; WHO, 1992; APA, 2001; Schulte ve arkadaşları, 2003. kaynakları esas alınarak hazırlanmıştır (6-9).

** ICD-10: International Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th revision.

***DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision

Bu bozukluğa sahip olan bireyler için erken tanı ve tedavinin önemi büyüktür. Halen ayırıcı tanıda yol gösterebilecek, tedaviye yanıtı öngörebilecek ya da ölçebilecek biyolojik belirteçler saptanamamıştır. Otizme yatkınlık oluşturan genlerin belirlenmesi, otistik çocukların semptomlarına yönelik ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunmanın yanı sıra, perinatal tanı ve erken tedavi imkanlarını da arttıracaktır (10).

Klinik Görünüm ve Epidemiyoloji

Yaygın Gelişimsel Bozukluklar, karşılıklı sosyal etkileşimde ve iletişim kalıplarında kalitatif kısıtlılıkların yanı sıra sınırlı, stereotipik, tekrarlayan ilgi ve aktivite repertuarı ile karakterizedir. Bu kalitatif farklılıklar her ortamda kişinin temel işlevsel özelliklerini belirler, ancak şiddeti kişiden kişiye değişir. Çoğu olgu erken çocukluk döneminden itibaren farklı bir gelişim gösterir. Taneli ve arkadaşları (11), ailelerin çocuklarının farklı olduğunu ortalama 28 aylıkken gözlemlediklerini belirtmiştir. Çok sayıda olguda kognitif fonksiyonlar kısıtlıdır ancak bozukluk tanısında, kişinin zeka yaşına uymayan davranışları temel alınır (7, 12). Bazı olgularda yaygın gelişimsel bozukluk, örneğin infantil serebral parezi, rubella embriyopatisi, tuberoskleroz, serebral lipidoz, fragil X sendromu gibi belirli somatik hastalıklarla birlikte görülür. Ancak bu durumda da ek somatik hastalığın olup olmamasına bakılmaksızın davranış patolojisine göre tanı konur (7, 12) .

Yaygın gelişimsel bozukluklar olarak ICD-10'da F84 kodu altında şunlar sayılmaktadır (12)

- F84.0 Erken Çocukluk Otizmi: Üç yaşından önce ortaya çıkar; sosyal etkileşim eksikliği, iletişim eksikliği ve davranış stereotipisi ile karakterizedir; yaşla birlikte semptomlar değişse de bu üç alandaki patoloji erişkin yaşta da devam eder. Değişik ağırlıklarda verbal defisit ve mental retardasyon görülür (13). Epidemiyolojik çalışmalarda prevalans 4-5/10.000 olarak saptanmıştır ve erkeklerde daha sık görülür (2:1 – 3:1) (14). Altı yaşına kadar konuşma becerisi gelişen ve IQ'su 80'den yüksek olan çocukların prognozu daha iyidir (14). Hastaların %1-2'si erişkin yaşta semptomsuzdur; %5-15'i sınırda semptom verir, %16-25'inde semptomlar devam eder ancak destek ile aile içi ve mesleki entegrasyon mümkündür; %60'ının prognozu kötüdür ve sürekli olarak yardıma ihtiyaç duyarlar (14). Yapılandırılmış çevre koşulları, davranışçı yöntemler ve farmakoterapinin semptomları azaltmada yararı görülmüştür, ancak zemindeki patoloji devam eder (14).

- F84.1 Atipik Otizm: Üç yaşında sonra ortaya çıkması ve/veya otizmin üç kardinal alanının sadece birinde veya ikisinde bozukluk sergilenmesi ile otizmden ayrılır. Genellikle zeka düzeyi çok düşüktür. Çok ağır düzeyde alıcı konuşma bozukluğu olan hastalarda da görülebilir (13). Erken çocukluk otizminden daha sık görülür, prevalans 11/10.000 olarak bildirilmiştir (14). Prognoz, eşlik eden ilerleyici nörolojik hastalıklara ya da mental retardasyon düzeyine bağlıdır (14). Takipte eşlik eden hastalıkların tedavisine ve davranış patolojisinin azaltılmasına odaklanılır (14).

- **F84.2 Rett Sendromu:** Sadece kızlarda tarif edilmiştir. Normale yakın bir gelişim sonrasında 7.-24. aylar arasında başlayan bir regresyon ile karakterizedir. Dil gelişimi ve ellerin kullanımı geriler, ince motor beceriler ve amaca yönelik el hareketleri tamamen kaybolur. Stereotipik el hareketleri ve hiperventilasyon görülür. İlerki yaşlarda sınırlı sosyal iletişim kurulabilir. Ağır zeka geriliği gelişir. Çoğu olguda, 8 yaşından önce epileptik nöbetler eklenir (13). Prevalans, onyediyen yaşından küçük kızlarda 1:10.000 olarak bildirilmiştir (14). Nedene yönelik ya da ilerlemeyi durdurabilen tedavi yoktur; ilerleyici verbal ve motor fonksiyon kaybı nedeniyle iletişim imkanlarını (örneğin göz kontağı yolu ile) erken dönemde arttırmak gerekir, epileptik nöbetler ve davranış bozuklukları tedavi edilir (14).

- **F84.3 Çocukluk Çağı Desentegratif Bozukluğu** (Desentegratif Psikoz; Heller Sendromu): Tamamen normal bir gelişimden sonra bir kaç ay içinde birçok alanda önceden edinilmiş beceriler kaybedilir ve sosyal, komunikatif, davranışsal patolojiler eklenir. Beceri kaybı bazı olgularda bir müddet sonra yavaşlar ve hatta nadiren bir miktar iyileşme görülebilir. Prognoz genellikle çok olumsuzdur. Beraber görülebilen nörolojik bozukluklar ayrıca tanı alır (14). Çok nadir bir bozukluktur; prevalans milyonda bir olarak tahmin edilmektedir ve literatürde 80 olgu bildirilmiştir (14). Bu hastaların, yaygın gelişimsel bozukluk olgularının %1'ini oluşturdukları düşünülür. Nedene yönelik tedavi yoktur. Yıkım durakladığında, agresif - otodestruktif davranışların azaltılmasına, iletişimin arttırılmasına ve mümkün olduğu ölçüde sosyal entegrasyona odaklanılır (14).

- **F84.4 Hareket Stereotipileri ve Zeka Geriliği ile birlikte Hiperaktif Bozukluk:** IQ 50'nin altındadır, hiperaktivite ve konsantrasyon güçlüğü'nün yanı sıra stereotipi görülür, Hiperaktivite Bozukluğu'nun aksine stimulanlardan fayda görülmez, aşırı hareketlilik ergenlikte hipoaktiviteye döner (13). Stereotipiler genellikle 4 yaşından önce ortaya çıkar. Prevalans bildirilmemiştir. Tedavide hiperaktivite ve stereotipilerin azaltılmasına odaklanılır (14).

- **F84.5 Asperger Sendromu:** Hans Asperger tarafından 1944'de ilk olarak tarif edilmiştir (14). Otizmdekine benzer şekilde sosyal etkileşim patolojisi ile sınırlı, stereotipik ilgi alanları ve aktiviler görülür. Otizmden farklı olarak kognitif ve sözel beceriler geri değildir, hatta özellikle gelişmiş de olabilir. Genellikle erkeklerde görülür (8:1) (13) ve babadan oğula geçtiği düşünülmektedir (14). Bazı hastalarda erken erişkin yaşlarda psikotik epizodlar görülebilir (13). Takipte semptomların azaltılmasına ve çevrenin hastaya uyumuna odaklanılır. Dar ilgi alanı giderek genişletilmeye çalışılır (14).

- **F84.8 Diğer Yaygın Gelişimsel Bozukluklar:** ICD-10’da detaylandırılmamıştır (7, 13). Bazı araştırmacılar tarafından ‘çoklu kompleks gelişim bozukluğu’ (*multiplex developmental disorder*) olarak adlandırılmış; semptomların, afekt regülasyonu bozukluğu / anksiyete regülasyonu bozukluğu; sosyal etkileşim bozukluğu ve bilişsel işlev bozukluğu (düşünce bozukluğu) üçlüsünden en az ikisini karşılması gerektiği önerilmiştir (14). Prognozun otizmden iyi, Asperger Sendromundan kötü olduğu belirtilmiştir (14).

- **F84.9 Başka Türü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk:** YGB tablosuna uymakla birlikte, genellikle anamnez bilgilerindeki eksiklik ya da tutarsızlık nedeniyle sınıflandırılmayan olgularda kullanılan şemsiye terimdir (7, 13).

Yaygın gelişimsel bozukluklar, aynı hastalığın farklı görünüşleri olduklarını düşünen yazarlar tarafından 1990’dan itibaren ‘*otizm spektrum bozuklukları*’ olarak da adlandırılmış, daha sonra aynı yazarlar arasında bulunan Gillberg, birbirine benzer bu klinik tabloları farklı hastalıkların benzer sonucu olarak kabul ederek 1990’ların ortalarında ‘*otistik sendromlar*’ terimini kullanmayı önermiştir (2). Her iki durumda da klinik prototip olarak otizm kabul edilmektedir. Sınıflandırma alt tip olarak sayılan Rett Sendromu’nun YGB’ye dahil edilip edilmemesi gerektiği halen tartışmalıdır (15). Yaygın gelişimsel bozukluklar konusundaki çalışmalar en çok Otizm ve Asperger Sendromu’na odaklanmıştır.

Birliktelik

Pek çok medikal durumun yaygın gelişimsel bozukluk ile birlikteliği gösterilmiştir. Steffenburg (16), toplum temelli bir çalışmada otistik çocuklarda %37 oranında medikal durum birlikteliği, %10’dan az bir oranda ‘pür’ herediter geçiş, ve geriye kalan çocukların neredeyse tümünde beyin disfonksiyonu saptamıştır. Nörokutanöz sendromların (tuberoskleroz, nörofibromatoz, Ito hipomelenoz) otistik olguların %10-15’ini oluşturduğu, ayrıca Frajil X sendromunun da %3-10’unu oluşturduğu görüşü ileri sürülmüştür (15).

Epidemiyolojik çalışmalarda otizm ile birlikteliği gösterilen hastalıklar arasında: Sitomegalo virüs enfeksiyonu, Duchenne kas distrofisi, ensefalit, Frajil X Sendromu, hemofilus influenza menenjiti, herpes simpleks ensefaliti, Ito hipomelenoz, hipotiroidi, laktik asidoz, konjenital rubella, Moebius sendromu, mukopolisakkaridoz, nörofibromatoz, otozomal kromozom anaomalileri, cinsiyet kromozomu anomalileri, kısmi tetrasomi 15 sendromu, fenilketonuri, pürin metabolizması bozuklukları, Rett sendromu (YGB’ye dahil edilip edilmemesi gerektiği tartışmalıdır), Sotos sendromu, tuberoskleroz, West Sendromu, Williams Sendromu sayılmaktadır (2).

Tedavi ve Prognoz

YGB tedavisinde hedef semptomlara yönelik olarak başta atipik nöroleptikler ve serotonin geri alım inhibitörleri olmak üzere psikofarmakoterapi ve buna ek olarak özel eğitim, davranışçı terapi, yapılandırılmış pedagojik bir yöntem olan TEACCH programı (Treatment and Education of Autistic and related Communication-handicapped CHildren), destekli iletişim, dokunulmayı reddeden çocuğu ‘tutma’ metodu, nörosensoryel yöntemler ve aile eğitimi hastaya özgü kombinasyonlarda uygulanabilmektedir (17). Halen nedene yönelik tedavi imkanı bulunmamaktadır (18). Günümüz imkanlarıyla bozukluğu tamamen iyileştirmek mümkün değildir, ancak çok yönlü tedavi stratejileri ile semptomlarda hafifleme görülebilir(17).

Yaygın gelişimsel bozuklukta prognoz, belirli klinik özelliklerden yola çıkılarak değerlendirilmeye çalışılır (Tablo 2).

Tablo 2: YGB’de klinik özelliklere göre prognozun öngörülmesi

Daha OLUMLU prognoz	Klinik Özellik	daha OLUMSUZ prognoz
düşük	Doğum riski	yüksek
> 70	IQ (motor)	< 70
atlayarak	Öğrenmede ilerleme	belirgin değil
< 5 yaş	Konuşma becerisi (min. gerekli IQ = 50)	> 5 yaş
< 8. yaş	Sfinkter kontrolü var	> 8. yaş
< 10. yaş	Taklit davranışı var	> 10. yaş
< 10. yaş	Stereotipilerin azalması	> 10. yaş
yok	Epilepsi	var
sosyal açıdan pasif veya aktif	Sosyal Etkileşim	sosyal açıdan geri çekilmiş

Tablo 2, Kusch ve arkadaşları 2002’den yararlanılarak hazırlanmıştır (19).

Etiyoloji

Çok sayıdaki araştırmalara rağmen, halen yaygın gelişimsel bozuklukların etiyoloji ve gelişimi ile ilgili tutarlı bir model oluşturulamamıştır. Günümüzde bu konudaki bilgi birikimi, özellikle erken çocukluk otizmi, atipik otizm ve Asperger Sendromu için şu faktörlerin rolünü işaret etmektedir (17):

- Genetik faktörler;
- Medikal hastalıklar;
- Beyin hasarı veya beyinin fonksiyon bozuklukları;
- Biyokimyasal anomaliler (özellikle dopaminerjik, serotonerjik ve ayrıca peptiderjik, noradrenerjik sistemler);
- Emosyonel gelişim anomalileri (empati bozuklukları, nörosensoriyel anomaliler);
- Kognitif süreçler ile dil ve konuşma gelişimi bozukluğu ('Theory of Mind' - hipotezi).

Gelişim Genetiği

Gelişim genetiği, gelişim biyolojisi ile genetik bilimlerinin kesişme alanını oluşturur. Bir yandan biyolojik gelişim süreçlerinin genetik yönü, diğer yandan kişinin gelişimi sırasında genetik yatkınlıkların ortaya çıkması veya belirginleşmesi ile ilgili konulara eğilir (20). Biyolojik ve biyomedikal araştırmaların giderek moleküler ağırlıklı olması ile gelişim genetiğinin önemi artmıştır (20).

Gelişim genetiğinde kullanılan yöntemlerden biri olan asosiyasyon çalışmalarında amaç, akrabalığı olmayan kişilerde belirli bir ortak özellik ile bir kromozomal DNA-belirteçi arasındaki ilişkiyi tespit etmektir. Yöntemin avantajlarından biri, belirli bir özelliğin ortaya çıkışında katkısı az olan genlerin de saptanabilmesidir ve bu konudaki klasik örneklerden biri, Alzheimer Hastalığı'nın etiyojisinde ApoE4 allelinin katkısının tespit edilmesidir (20).

Gelişim süreçleri genellikle birden fazla genin rol oynadığı (poligenik) ve çevre etkisinin de görüldüğü (multifaktoriyel) süreçlerdir. Bunları incelerken, psikiyatrik gelişim genetiğinde bir de fenotipleri belirlemenin zorlukları eklenir. Psikiyatrik bozukluklarda genelde minör nöroanatomik veya nörofonksiyonel değişiklikler görülür. Psikiyatrik bozukluklar için uygun hayvan modellerini oluşturmak da güçtür (20).

Gelişim psikiyatrisinde, genetik etkinin varlığı genel kabul görmektedir.

Yaygın Gelişimsel Bozukluk, Otizm ve Genetik

Otistik spektrumda yer alan bozuklukların, genetik geçiş özellikleri güçlü hastalıklar tarafından oluşturulduğu konusunda fikir birliği oluşmaktadır (2). Tıptaki gelişmelere paralel olarak, otizm etiyojisinde rol oynadığı düşünülen hastalık grupları için (enfeksiyöz ve toksik etmenler hariç) genetik bir komponent bulunacağı olasılığı yüksektir (2). Bu konuda Mendelian geçiş, 'çifte vuruş' (*double hit*; ek somatik mutasyon varlığında ekspresyon), moleküler düzeyde bozukluklar ve poligenik geçiş hipotezleri üzerinde çalışılmaktadır (2). Çok büyük olasılıkla, otizmden sorumlu olan tek bir kromozom değildir; nitekim kromozom 14 dışındaki tüm kromozomlar, en az birer olguda otizm ile ilişkili bulunmuştur (2). Moleküler genetik çalışmaları da otistik sendromlar konusundaki bilgilere ışık tutmuştur (2). Mitokondrial DNA'daki bozuklukların da otistik bozukluklarla ilişkili olabileceği yönünde bulgular vardır (2).

Genom taramaları yoluyla otizm için yatkınlık oluşturan bölgeleri incelemeyi amaçlayan değişik çalışmalar yürütülmüştür. Bunlar arasında öne çıkanlar şunlardır (2): International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC), genetik geçiş düşünülen 99 ailede kromozom 4, 10, 22'de bazı bölgeler ile 2q, 7q, 16p ve 19p'yi bildirmiştir (4). PARIS grubu, incelediği 51 multipleks (multiple-incidence) ailede benzer şekilde 2q, 7q, 16p, 19p'yi bildirmiş, ayrıca 4q, 5p, 6q, 10q, 18q ve Xp'yi bildirmiştir (5). South Carolina Autism Project 100 olguda bir ring 7, bir 20p delesyonu, bir kromozom 12 perisantrik inversiyonu ve dört 15q anomalisi saptamıştır (21). John Hopkins çalışmasında 7q31-33 ve kromozom 13 belirlenmiştir (22). Otizm spektrum bozukluklarında 7q32-35, 15q11-13 ve 2q, 16p, 19p bölgelerinin rolü olabileceğini bildirilmiş, genel populasyona oranla relatif risk tek yumurta ikizleri için 2000 kat, kardeşler için de 50-150 kat fazla olarak saptanmıştır (20, 23, 24). 'Özel yetenekleri' (*savant skills*) olan otistik hastalarda, 15q11-q13 bölgesi semptomlarla ilişkili bulunmuştur (25). Bartlett ve arkadaşları (26), otizm ve konuşma bozukluğu birlikteliği için kromozom 2, 7 ve 13'ü bağlantı çalışmalarında ilişkili bulmuşlardır. Polleux ve Lauder (27), otizm genetiği ile ilgili çalışmaları gözden geçirmiş ve kromozomlardan X, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 19 ve 20'nin aday gen olduklarını belirtmişlerdir. Autism Genetics Resource Exchange (AGRE) işbirliği ile 228 multiplex ailede nonverbal iletişimi olan hastalarda 1p13-q12, 4q21-25, 7q35, ve özellikle 8q23-24 ile 16p12-13 bölgelerinin otizm için yatkınlık yarattığı saptanmıştır (28).

Otistik bozukluklar için özellikle kromozom 2, 4, 7 (7q31-35), 10, 16, 19 ve 22 olmak üzere 7 gen lokusunun öne çıktığı görülmektedir (29). Aile içi görülme sıklığı değişik

kaynaklarda farklılıklar göstermektedir, örneğin genel topluma oranla 60-100 kat fazla olduğu, monozigotik ikizlerde 36-96 kat fazla ve dizigotik ikizlerde 0-24 kat fazla olduğu belirtilmektedir (29).

Bartlett ve arkadaşları (30), otizm aday genleri olarak reelin (REELN), serotonin transporter (5HTT) ve engrailed-2 (EN2)'yi saymaktadır.

YGB, Otizm ve Kromozom 19

Kromozom 19'un YGB'de etiopatogenezinde rol oynayabileceğine işaret eden bazı çalışmalar yayınlanmıştır:

- Buxbaum ve arkadaşları (31), otistik bozukluk ve obsesif-kompulsif bozukluk bulunan 62 hasta ve ailesini incelemiş, kromozom 1'de otizme yatkınlık geni bulunduğunu, ayrıca kromozom 6 ve 19'da da yatkınlık geni bulunabileceğini bildirmişlerdir.

- Kromozom 19q3.3'deki genden zengin bölgede CTG trinükleotit repeat sequence'in dinamik genişlemesi (dynamic expansion), myotonik distrofiye neden olmaktadır; bu tür olgulardan birinde otizm ve ikisinde de Asperger Sendromu saptanmıştır (2).

- IMGSAC ve PARIS çalışmalarının her ikisinde de, 19p üzerindeki bir bölge belirlenmiştir (2, 4, 5). Otizmde 19p bölgesinin rol oynayabileceği, NIH Genetics Workgroup tarafından da belirtilmiştir (23).

- Liu ve arkadaşları (32), 110 multiplex ailede 335 mikrosatelit belirteç açısından tüm genomu tarayarak, sonucu otizmin kromozom 19 ile bağlantılı olabileceği yönünde değerlendirmiş, ek olarak kromozom 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 20 için de otizm ile bağlantı bulunduğunu bildirmişlerdir.

- Asperger sendromu ve dengeli de novo translokasyon'u t(17;19) (p13.3; p11) bulunan bir erkek çocuk bildirilmiştir (33).

- Mc Cauley ve arkadaşları (34), 158 multiplex ailede yaptıkları genom taramasında, 19p13'da ve 17q11.2'de otizme yatkınlık bölgesi tespit ettiklerini; ayrıca kromozom 19'un 6q ve 17q ile ilişkisinin *Ordered-Subset Analysis* (OSA) ile gösterildiği durumlarda gelişim basamaklarının daha erken olgunlaştığını bildirmişlerdir.

- Kromozom 19p13.2'de lokalize olan RAS onkojen grubu RAB3A geninde mutasyon varlığının otizmde olası etkisi 47 kişide taranmış, bu yönde bir bulguya rastlanmamıştır (35).

Kromozom 19 ve ApoE

ApoE geni kromozom 19 üzerindeki 19q13.2 bölgesinde yer almaktadır ve apo-CI ve apo-CII'nin içinde olduğu gen kümesinin bir bölümünü oluşturur. (ApoE ile ilgili detaylı bilgi 'Lipid Metabolizması ve ApoE' bölümünde verilmektedir.)

Sağlık, Hastalık ve ApoE

Cinsiyet ve yaş faktörü

- İskoçya'da yapılan bir çalışmada, yenidoğanlarda orta yaşlılara göre ApoE 2/4 ve 4/4 genotipinin daha fazla, 2/3 ve 3/3 genotipinin ise daha az görüldüğü tespit edilmiştir (36).
- ApoE polimorfizmini 1748 kişilik toplum örneğinde inceleyen bir çalışmada, kadınlarda yaş gruplarına göre allel frekansı ve genotip açısından farklar bulunmuştur (37).

Coğrafi bölge

- ApoE için coğrafi dağılım farkı bildirilmiştir. Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ve toplum örneğinde ApoE4 frekansının Kuzey Avrupa'dan Güney Avrupa'ya doğru azaldığı, aynı yönde ApoE3 frekansının arttığı görülmüş; 100 yaşını aşmış kişilerde de ApoE4 frekansı kuzeyden güneye azalırken, ApoE2 frekansının arttığı saptanmıştır (38).
- ApoE4 frekansının Kuzeybatı Yunanistan'da, ülkenin diğer bölgelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (39).

Genel gelişim, nörogenezis

- ApoE polimorfizminin erken çocukluk gelişimindeki etkisini 2 yıllık izlem ile inceleyen prospektif bir çalışmada, allel 4'ün allel 2 ve allel 3'e göre erken dönem nöronal gelişimi daha olumlu etkilediği sonucuna varılmıştır (40).
- ApoE, ApoAI ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü (LDLR), periferik sinir rejenerasyonu ve remyelinizasyonu sırasında kolesterol transportunda görev yapar (41).

ApoE gen polimorfizmi ve lipid metabolizması

- Yaygın Otizmde ApoE gen polimorfizminin lipid metabolizmasına etkisini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.
- Türkiye'de ApoE allel 2 varlığı, allel 3 ve allel 4'e göre daha yüksek trigliserit düzeyleri ile ve ayrıca kadınlarda daha yüksek glukoz düzeyi ve daha yüksek vücut kitle endeksi ile ilişkili bulunmuştur (42).

- Yunanistan’da ApoE gen polimorfizmi ve etnik değişkenlerin serum lipidleri üzerine anlamlı etkisi olduğu belirtilmiştir: ApoE allel 2 varlığı trigliserid yüksekliği, ApoE düzeyi yüksekliği, total kolesterol dūşüklüęü, LDL dūşüklüęü ve apoB dūşüklüęü ile ilişkili bulunmuştur; ApoE allel 4 varlığında lipid parametreleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır (39).
- Kore’de 1900 kiřilik toplum örnekleminde ApoE allel 2’nin her iki cinste allel 3 ve allel 4’e göre daha dūřük total kolesterol ve daha dūřük LDL ile iliřkili olduęu, ayrıca kadınlarda allel 2 ve allel 4’ün daha yüksek HDL düzeyi ile iliřkili olduęu; bunun yanı sıra ApoE allel durumunun lipid düzeylerine etkisinin kadınlarda yař ile ve erkeklerde sigara içimi ile deęiřtięi belirtilmiştir (43).
- Slovenya’da ApoE 2/3 genotipi, 3/3 genotipine göre daha yüksek trigliserit düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (44).
- Tayvan’da 220 sağlıklı gönüllüde ApoE gen polimorfizminin lipid metabolizması parametreleri ve koroner arter hastalığı parametreleri ile anlamlı ilişkisi saptanmamıştır; ancak ApoA1/ApoB oranının ApoE allelleri ile ilişkili olduğu, e2>e4>e3 şeklinde fark bulunduğu belirtilmiştir (45).
- Kuveyt’te ApoE allel durumunun lipid parametreleri açısından anlamlı etkisi görülmemiştir (46).

Risk faktörü olarak ApoE gen polimorfizmi

ApoE allel 3, toplumda en sık görülen formdur ve ana form kabul edilir. Alzheimer Hastalığı’nın gelişimi açısından ApoE4 geni risk faktörü ve ApoE2 geni koruyucu faktör kabul edilmekte (47), allele göre artan risk e4>e3>e2 olarak belirtilmektedir (48). ApoE4 geni, demansı olmayan sağlıklı erişkinlerde uzaysal dikkat ve işlem belleği yetersizlikleri ile ilişkili bulunmuştur (47). şizofrenide ApoE 4/4’ün erken başlama yaşı ile, e3’ün de geç başlama yaşı ile ilişkili olduğu dūřünülmektedir (49). Kafa travmasından sonra kognitif prognoz açısından ApoE allel 4 risk faktörü olarak belirtilmiştir (50-52). Tardiv diskinezi açısından ApoE allel 2 risk faktörü olarak belirtilmiştir (53). Psoriasis için ApoE allel 4 risk faktörü olarak belirtilmiş, acitretin ile tedaviye yanıtı öngörmediği saptanmıştır (54). Açık açılı glokom için ApoE allel 2 koruyucu faktör; allel 3 ise risk faktörü olarak belirtilmektedir (55).

Ayrıca Türkiye’de ApoE allel frekansı açısından 112 diabet II hastası ve 94 sağlıklı kontrol arasında fark saptanmamıştır (42). Slovenya’da ApoE gen polimorfizmi kadınlarda koroner arter hastalığı ile ilişkili bulunmamıştır (44). Kuveyt’te ApoE allel frekansı

açısından 41 hiperlipidemi hastası ve 106 kişilik toplum örnekleme arasında fark saptanmamıştır (46).

ApoE ve Yaygın Gelişimsel Bozukluk / Otizm

Otizm ile ApoE allelleri arasındaki ilişkiyi 223 trioda inceleyen bir çalışmada, allel 2 genetik geçişinin artmış olarak saptanmış, bu durum allel 2 ile birlikte vulnerabilite artışı ya da allel 2'nin otizm için bildirilen abortus riskinden koruyucu fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir; ayrıca bir otistik olguda yeni bir allel 3r mutasyonu da saptanmıştır (56).

ApoE gen polimorfizmini ve single nucleotide polimorfizmini (SNP) 322 otistik ailede inceleyen bir çalışmada ApoE gen polimorfizmi ile otizm arasında ilişki gösterilememiştir (57).

Reelin, ekstraselüler bir proteindir ve gelişmekte olan memeli beyninde hücre migrasyonu ve pozisyonunu yönlendirir (58). D'Arcangelo ve arkadaşları (59), reelinin doğrudan VLDL reseptörlerine ve APO E2 reseptörlerine bağlandığını göstermiştir. Reelinin bu reseptörlere bağlanması, Apo E varlığında inhibe olur. Bağlanma sonrası reelin veziküllerle nöron içine alınır ve Dab-1'in tirozin-fosforilasyonuna sebep olur. Fatemi ve arkadaşları(60), reelin sinyal mekanizmasının otizm'de bozulduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, özellikle frontal ve serebellar reelin otistiklerde anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Ayrıca yine frontal ve serebellar Reln ve Dab-1 mRNA düşük ve VLDLR (VLDL Receptor) mRNA yüksek bulunmuştur. Bu çalışma aynı yazar ve arkadaşlarının 2001 tarihli çalışmasını desteklemiştir (61). Ek olarak, Koch ve arkadaşları (62) Apo E reseptör 2'nin çözünür bir formunun reelin sinyalini inhibe ettiğini göstermiştir.

Otizm tedavisinde tetrahidrobiyopterin'in olumlu etkisi olabileceği belirtilmiş (63); ve ApoE'den yoksun farelerde vasküler tetrahidrobiyopterin biyosentezinin artmış olduğu gösterilmiştir (64).

Otizm / Steatore Sendromu: Otistik çocuklarda 'gaitanın çok miktarda ve yüzmeye meyilli olduğu' yönündeki anne-baba bildirimleri (65), steatoreyi, ve dolayısıyla da yağ metabolizması bozukluğunu düşündürmektedir. Otistik çocuklarda sindirim sistemi bozukluklarını inceleyen bir çalışmada normal popülasyondan anlamlı düzeyde fark bulunmamıştır (66), ancak bu çalışmada retrospektif dosya incelemesi uygulandığından, bazı özelliklerin gözden kaçmış olma olasılığı vardır. Günümüzde 'otizm / steatore sendromu' otizme eşlik eden karın ağrıları, kronik diare ve steatore üçlüsü ile tarif edilmektedir (2).

Klinik Önem: Belirteç olarak ApoE

Günümüzde ApoE allelik durumu, Alzheimer hastalığında riski belirlemede göz önünde bulundurulan faktörlerden birisi olmuştur. Aynı şekilde ApoE allellerinin, halen nedene yönelik tedavinin ve prognozu öngörecektir belirteçlerin bulunmadığı Yayın Gelişimsel Bozukluklar için de bir gün klinik kullanıma girebileceği düşünülmektedir.

Tablo 3. Literatür taraması.

Ülke	Kaynak	Örneklem	Apo E / Otizm / Allel frekansı						Allel frekansı (%)		
			Allel genotipi (%)						ε2	ε 3	ε 4
			2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4			
Türkiye	Taneli Y, 2006 Bu çalışma	Yaygın Gelişimsel Bozukluk n:41	-	17,1	2,4	68,3	12,2	-	9,8	82,9	7,3
Türkiye	Köseler A (67)	n:100	-	89	10	-	1	-	49,5	45,0	5,5
Türkiye	Duman BS (42)	Tip 2 Diabet n:112 Sağlıklı Ko. n: 94							10,1 13,2	74,3 68,1	15,6 18,7
Türkiye	Mahley (68)	Türk Lipid Araştırması n:8366	0,4	10,6	0,8	74,2	12,9	1,1	7,9	86,0	6,1
Türkiye	Aybek H ve Ark. (69)	Alzheimer's D. n:62 Sağlıklı Ko. n:56	-	13	3	48	33	3			
Japonya	Mabuchi F (55)	Glokom n: 310 Kontrol (başka göz hastalığı) n:179	-	4,5	0,7	83,5	11,3	-	2,6	91,4	6,0
Meksika	Wright RO (40)	Anne-çocuk çifti n:311							3	88	9
İngiltere	Turic D (70) Neurosci Let 2001	Kogn yüksek n:101 Kogn düşük n: 101	-	9,3	-	64,95	24,74	1,0	4,64	81,96	13,4
İngiltere	Campalani E (54)	Psoriasis ¹ n:306 Kontrol n:137 ¹ kron.plak/gut.pso.	2 1	13 12	2 1	52 65	28 21	3 -	10 8	72 81	18* 11
Almanya	Kieslich M (51)	20 erkek, 7 kadın ort.23 yaşında Kafa travmasından ort.17 yıl sonra	11	15	-	52	22	-			

A.B.D.	Payami H (37)	Tüm yaşlar n:1,748	0,6	13,0	2,2	59,6	22,6	1,9	8,2	77,4	14,4
		Yenidoğan n: 573	0,7	13,4	2,8	55,7	24,6	2,8	8,8	74,7	16,5
		20-49 yaş n: 279	0,7	10,8	0,7	61,3	24,4	2,2	6,5	78,9	14,7
		50-79 yaş n: 340	0,6	11,2	2,9	57,4	26,5	1,5	7,6	76,2	16,2
		80 yaş üstü n: 556	0,4	14,9	2,0	64,2	17,3	1,3	8,8	80,3	10,9
A.B.D.	Halford J (53)	Tardif Diskinezi									
		Afrikan-Am. n:57	-	8,8	5,3	50,9	26,3	8,8	7,0	68,4	24,6
		Beyaz ırk n:40	2,5	25,0	-	52,5	20,0	-	15,0	75,0	10,0
		Kontrol									
Slovenya	Letonja M (44)	Afrikan-Am. n:464	1,3	11,6	1,3	44,4	33,2	7,3	8,2	66,8	25,0
		Beyaz ırk n:4848	0,7	11,5	3,1	55,3	25,3	3,9	8,1	73,7	18,2
Slovenya	Letonja M (44)	Sadece Kadın:	-	9,5	0,7	71,4	18,4	-	5,1	85,4	9,5
		Koron.art.hst.n:147 sağlıklı ko. n:114	-	8,8	2,6	69,3	19,3	-	5,7	83,3	11,0
Yunanist.	Liberopoulos E (39)	Kuzeybatı Yunanistan n: 555							6,3	80,7	13,0
Finlandiya	Kontula (71)	Kardiak risk faktörleri çalışması n: 40	-	7,5	2,5	55	35	-	5	76	19

Lipid Metabolizması ve Apolipoprotein E

Plazma Lipoproteinleri

İnsanlarda en fazla bulunan lipidler; kolesterol, kolesterol esterleri, trigliseritler, fosfolipidler ve esterleşmemiş yağ asitleri (serbest yağ asidi)'dir (72). Lipidler suda neredeyse hiç çözünmediklerinden, taşınmaları için özelleşmiş taşıyıcılara gereksinim duyarlar. Hemen hemen tüm organizmalarda lipid taşıyıcı proteinler mevcuttur. İnsan plazması aracılığıyla en fazla taşınan lipid tipi trigliseritlerdir. Tüm plazma lipidleri benzer taşınma komponentleri içermekle birlikte, metabolik akibetleri farklıdır (72).

Lipoprotein Sınıfları

Lipoproteinleri sınıflamada kullanılan en yaygın özellik dengedeki ultrasantrifugal davranışlarıdır. Bu teknikle tanımlanmış dört ana lipoprotein sınıfı vardır: VLDL, IDL, LDL ve HDL. Şilomikronlar ve VLDL fizyolojik tuzlu suyun yoğunluğundan ($d = 1.006$ g/ml) daha düşük denge ultrasantrifugasyon yoğunluğuna sahiptir. Şilomikronlar normalde açlık durumunda bulunmazlar. Lipoprotein(a) (Lp(a)), LDL ve HDL arasında bir dansiteye sahiptir. Elektroforetik sınıflamada elektriksel alandaki hareket yeteneğine göre en negatif yüklü partiküller (α -göç edenler) en hızlı hareket ederler; buna göre VLDL pre- β olarak göç eder, IDL ise VLDL ve LDL arasında göç ederken, LDL β , HDL ise α pozisyonunda göçer. Şilomikronlar, kapiller ve nişasta elektroforezinde α göçme özelliği gösterir, ancak selüloz asetat veya agaroz elektroforezi gibi yoğun destekli alanlarda büyük boyutlarından dolayı başlangıç noktasında kalırlar. Lp(a)'nın ise pre- β şeklinde elektroforetik hareket yeteneği vardır. Lipoproteinler arasındaki dansite, elektroforetik hareketlilik ve büyüklük gibi yapısal ve metabolik benzerliklere rağmen, her bir partikül sınıfının lipid ve apoprotein içerikleri anlamlı farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar sıklıkla metabolik öneme sahiptir (72).

Lipoproteinlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Genellikle şilomikronlar ve VLDL gibi daha büyük lipoprotein partikülleri daha fazla trigliserit içerirler ve yüzen dansiteleri daha düşüktür. LDL ve HDL gibi daha küçük partiküller nispeten daha fazla protein ile kolesterol esterleri içerirler ve yüzen dansiteleri daha büyüktür. Trigliseritler, kolesterol esterleri, serbest kolesterol ve fosfolipidlerin dansiteleri sırasıyla 0.91, 0.96, 1.03 ve 1.03 g/ml'dir. Lipoproteinlerin lipid bileşenleri ile karşılaştırıldığında, apoproteinler çok daha yoğundur (dansite ~ 1.42 g/ml) (72).

Tablo 4: Plazma Lipoproteinlerinin Özellikleri

LİPOPROTEİN	DANSİTE ARALIĞI (G/ML)	YÜZME ÜNİTELERİ (S _f)	BAŞLICA LİPİDLER	ELEKTROFORETİK HAREKET YETENEĞİ*	BAŞLICA PROTEİNLERİ
Şilomikron	<0,94	S _f >400	Trigliserit	α	B48, AI, IV
Çok düşük-dansiteli (VLDL)	0,94-1.006	S _f 20-400	Trigliserit	Pre-β	B100, E, CI, II, III
Ara-dansiteli (IDL)	1.006-1.019	S _f 12-20	Trigliserit ve kolesterol esterleri	Pre-β-β	B100, E
Düşük dansiteli (LDL)	1.019-1.063	S _f 0-12	Kolesterol esterleri	β	B100
Lipoprotein (a)	1.05-1.09	-	Kolesterol esterleri	Pre-β	B100, apo(a)
Yüksek-dansiteli (HDL)	1.063-1.21	F _{1,20} 0-20	Fosfolipidler ve kolesterol	α	AI, II

S_f, 1.063 dansitedeki yüzme hızı; F_{1,20}, 1.20 dansitedeki yüzme hızı
* Şilomikronlar bazı yoğun desteklerde sıfır hareketliliğe sahiptir

Montgomery ve arkadaşları, 2000'den alınmıştır.

Tablo 5: Plazma Lipoproteinlerinin ortalama lipid ve protein bileşimi

BİLEŞEN	ŞİLOMİKRONLAR	VLDL	IDL	LDL	HDL
Protein	2	9	20	21	50
Trigliseritler	84	54	19	11	4
Kolesterol	2	7	8	8	2
Kolesterol esterleri	5	12	27	37	20
Fosfolipidler	7	18	21	22	24

Montgomery ve arkadaşları, 2000'den alınmıştır.

Şilomikronlar:

Şilomikronlar, en büyük ve trigliseritten en zengin lipoproteinleridir. Çapları 100-500 nm ve molekül ağırlıkları 100 milyon-1 milyar Dalton'dur. Kuru ağırlıklarının yaklaşık %98'i lipiddir ve bunun da %80'den fazlası trigliserittir. Dolayısıyla en az yoğunluğa

(<0.94 g/ml) ve hızlı ultrasantrifugal yüzme hızına sahiptirler. Şilomikronlar barsaklarda diyet yağlarından üretilir ve nispeten uzun ömürlüdür, açlık durumunda hemen hemen hiç bulunmazlar. Şilomikronlar barsak lenfatikleri ve plazmada çıplak gözle görülebilecek kadar çoktur. Şilomikron kalıntıları, trigliseritlerin LPL tarafından uzaklaştırılmasına bağlı olarak, daha küçük ve kolesterol esterlerinden nispeten daha zengindir. Normal koşullarda şilomikronlar ve şilomikron kalıntıları plazmanın $d > 1.006$ g/ml olan fraksiyonunda bulunmazlar. ApoB48 şilomikronların başlıca yapısal proteinidir. Şilomikronlar, barsak lenfatiklerine apoB ve apoAIV ile salınırlar ve plazmada bunları hızla kaybederek, apoE, CI, CII ve CIII edinirler (72).

Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler (VLDL):

VLDL büyük, trigliseritten zengin, karaciğerde üretilen, dansitesi < 1.006 g/ml olan bir partiküldür. Boyutu şilomikronlara yakın, ancak onlardan küçüktür (çapı 30-100 nm, moleküler ağırlığı 8-100 milyon Dalton). VLDL'nin boyutları hipertrigliseritemide artar. Çıplak gözle görülememesine rağmen, VLDL ışığı kırıp yansıtmaya ve plazmaya sütsü bir görüntü vermeye yetecek kadar büyüktür. Açlık sırasında VLDL, plazma trigliseritlerinin başlıca taşıyıcısı haline gelir. Şilomikronlar gibi VLDL de serbest yağ asitlerini serbestleştirmek üzere LPL tarafından etkilenir. VLDL düzeyleri ve partikül boyutları, lipolitik enzimler için şilomikronlarla yarışması sonucunda yağlı bir öğünden sonra artar. Lipoliz, daha küçük ve kolesterol esterlerinden daha zengin VLDL kalıntıları oluşturur. Küçük VLDL, daha büyük bir partikülün kalıntısı veya yeni salınmış karaciğer kaynaklı bir partikül olabilir ve daha fazla lipolitik değişime uğramaz. İnsanlarda, VLDL en büyük yapısal protein olarak apoB100 içerir. Dolaşımdaki VLDL apoE, CI, CII ve CIII içerir. Ayrıca VLDL'nin bir bölümünün apoE gereksinimi vardır (72).

Ara Dansiteli Lipoproteinler (IDL):

IDL, 1.006-1.009 g/ml arasındaki dengede yüzer. VLDL'nin %50 ve daha fazlası lipolitik yolla IDL'ye çevrilebilir. Bunun plazma IDL'nin başlıca kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden, ciddi hastalık durumlarında bozulan kalıntı temizliğine bağlı olarak apoB48 içerdikleri durumlar haricinde, IDL'nin hepsi apoB100 içerirler. Lipoliz sırasında trigliseritlerin seçici olarak kaybına bağlı olarak, IDL kolesterol esterlerinden zengindir. Aynı zamanda apoC'ler de kaybedilir, oysa apoE kalır. Bu durum, öncüsü olan VLDL ile karşılaştırıldığında apoC'si tükenmiş ve apoE'den zenginleşmiş IDL oluşumuna

neden olur. IDL, miktarının düşük olması nedeniyle dolaşımdaki trigliserit ve kolesterol kitlesinin küçük bir kısmını oluşturmaktadır (72).

Düşük Dansiteli Lipoproteinler (LDL):

LDL, kolesterolden zengin, dansitesi 1.019-1.063 g/ml olan bir lipoproteindir. Çapı 19-24 nm, moleküler ağırlığı 2-2.5 milyon Dalton arasındadır. İnsanlarda protein içeriğinin ~ %95'i apoB100'dür. LDL plazmadaki kolesterolün ~ %70'ini taşır ve bunu %17'sini taşıyan HDL izler. Hemen hemen tüm LDL, VLDL'den lipoliz ile türemektedir. LDL, kolesterolü arter duvarına taşıdığı için, yüksek plazma LDL veya apoB100 düzeyleri ateroskleroz için artmış riskin en iyi göstergesidir. LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunur. Son çalışmalar, en küçük ve en yoğun LDL'nin oksidatif hasara daha yatkın olduğunu göstermiştir (72).

Lipoprotein (a):

LP(a), apo(a)'ya disülfid bağı ile bağlı LDL partikülü içeren bir komplekstir. Apo(a) moleküler ağırlığı 300-800 kDa arasında olan bir glikoproteindir. ~ 114 aminoasidin disülfid çapraz bağlarının yapısal motiflerinin sayısındaki değişikliğe bağlı olarak büyük ölçüde polimorfizm gösterir. Bu motifler Danimarka tatlısına benzerliğinden dolayı 'kringle' olarak adlandırılır. Bunlar plazminojen gibi pıhtılaşmaya katılan birçok protein ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Normal kişilerin plazmasındaki Lp(a) düzeyleri, tespit edilemeyecek düzeyden 70 mg/dl'ye kadar olan ~1000 katlık bir aralıktadır. Lp(a)'nın fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Lp(a), insanlar ile eski Dünya Maymunlarından başka birçok hayvan türünde bulunmamaktadır. Lp(a)'nın plazminojen aktivasyonu ve daha sonra da fibrin pıhtısının eritilmesi için yarışması sonucunda aterosklerozu uyardığı düşünülmektedir. Ayrıca, apo(a), bağlı olduğu LDL'nin reseptör aracılı yıkımını da bozmaktadır. Araştırmacılar, uzunluk ve dizilimdeki polimorfizimleri gözönüne alarak, 100'den fazla değişik apo(a) alleli bulunduğunu tahmin etmektedir. Gerçekte toplumun %90'ından fazlası apo(a) bölgesinde heterozigottur ve insanlarda bilinen en fazla polimorfik bölgelerden birini oluşturmaktadır (72).

Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL):

HDL, en küçük lipoproteindir ve dansitesi 1.063-1.25 g/ml arasındadır. En az 5 farklı HDL partikül tipi bulunmaktadır. Çapı 6-12 nm ve moleküler ağırlığı 70-400 kDa arasındadır. En küçük HDL, lipidden nispeten fakirdir, sadece apoAI bir miktar fosfolipid

ve serbest kolesterol içerir. Daha büyük HDL, serbest ve esterleşmiş kolesterol ile fosfolipidleri taşıyan diskoid bir partiküldür; apoAI ve apoAII içerir. Daha büyük HDL, kolesterolden zengin merkezleri olan küresel partikülleridir. En büyük HDL ise apoAI, AII, E ve C gibi birçok apoprotein içerir. Yaygın olarak kullanılan isimlendirmede bunlar HDL₁ olarak adlandırılır ve plazma HDL' sine en az katkıda bulunan partiküllerdir. HDL₂ (d = 1.063-1.125 g/ml) ara boyutlardadır, fakat sıklıkla plazma HDL'nin büyük kısmını oluşturur. HDL₃ ise (d = 1.125-1.21 g/ml) daha küçük boyuttadır, ancak plazmadaki HDL'nin başlıca komponentidir. Bugün HDL'nin ultrasantrifugal izolasyonla etkilenebileceği düşünülmektedir. Anlaşılan, HDL₃'den daha küçük olan HDL ultrasantrifugal ayırım sırasında daha büyük partiküller ile beraber hareket etmektedir. Bu nedenle bu isimlendirme tam olarak geçerli olamamaktadır. Birçok minör apoprotein ve enzim, lesitin-kolesterol açıl transferaz (LCAT), kolesterol ester transfer protein (CETP) ve fosfolipid transfer protein, HDL ile ilişkilidir. Bu enzimler, ters kolesterol transportu ile ilişkilidir. HDL'nin arter duvarından kolesterolü uzaklaştırmadaki rolü nedeniyle HDL kolesterolün (veya HDL'deki başlıca apoprotein olan apoAI'in) yüksek düzeyleri ateroskleroz için azalmış riskin önemli bir göstergesidir (72).

Apoproteinler

Plazma apoproteinleri mikromolar konsantrasyonlarda dolaşırlar ve buldukları lipoproteinlerin akibetine uğrarlar. Her bir lipoprotein sınıfının karakteristik içerikleri ve apoprotein dağılımları vardır. Sabit yapısal komponentler gibi davranan apoB100 ve apoB48 hariç diğer apoproteinler, lipoproteinler arasında değiş tokuş edilirler. Keşfedilen ilk apoproteinler apoA ve apoB olarak adlandırılmıştır çünkü sırasıyla α ve β bandında göç eden lipoproteinlerde bulunmaktadırlar. Daha sonra bugün kullanılmakta olan alfa-numerik isimlendirmeye geçilmiştir. ApoAI, α lipoproteinlerde (HDL) en fazla bulunan apoproteindir, bunu ApoAII izler. ApoB100, β lipoproteinlerdeki (LDL) hemen hemen tek proteindir, fakat pre- β -lipoproteinlerde (VLDL ve IDL) bulunan birçok apoproteinden biridir. ApoB48, ApoB100'ün kesilmiş şeklidir ve şilomikronlarda bulunur. ApoE ve ApoC'ler de şilomikronlar, VLDL, IDL, ve HDL'de bulunurlar. Ayrıca başka apoproteinler de bulunur (72).

Apoproteinlerin Genel Özellikleri

Apoproteinler, 57 aminoasitten (apoCI) 4356 aminoasite (apoB100) kadar değişik büyüklüklerde ve apoB100 dolaşımında bilinen en büyük tek zincirli polipeptitlerden

biridir. ApoB48, ApoB100, D, E ve CIII, sialik asit ile biten karbonhidrat zincirleri ile değişik şekillerde glikozile olurlar. Birçok apoprotein aminoasit dizilişlerinin bir veya iki pozisyonundaki farklılıklara bağlı olarak iki veya daha fazla izoforma sahiptir. Bunların belki de en önemlisi apoE'dir, bu apoprotein plazma kolesterol düzeylerini etkileyen 3 izoformu mevcuttur (72).

Amfipatik Heliks:

Birçok apoprotein, bir yada daha fazla sayıda α -heliksler denilen lipid bağlayıcı yapılar içerir. ApoAI, AII, AIV, B100, CI, CII, CIII ve E ortak ata genden geliştirilen, bazıları benzerlik gösteren 22 aminoasitli amfipatik helikslere sahiptir. Bir amfipatik heliksin iki yüzü vardır: Bir yüzü yüklü aminoasitler nedeniyle hidrofiliktir, diğer yüzü ise nötral aminoasitler nedeniyle hidrofobiktir. Apoproteinlerdeki helikal yapıların birçok tipi vardır ve bunların yüklü aminoasit dağılımları, hidrofobik özellikleri ve hidrofobik önemleri farklıdır. Bu özellikler, lipid bağlama seçicilikleri ve apoproteinlerin lipoprotein lipid merkezine nüfus etme derecesi ile tanımlanabilir. ApoE kolesterolden zengin lipoproteinlere apoCI, CII, ve CIII'e göre daha yüksek bir afiniteye sahiptir. ApoE'nin seçici olarak birikimi ve VLDL'nin LDL'ye dönüşmesi sırasında apoC'lerin kaybedilmesi bunun göstergesidir (72).

Reseptör Tanıma:

Birçok apoprotein, lipoproteinlerin değişik hücre yüzey reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmasında rol oynar. Bunlardan en iyi tanımlanmış olanı LDL reseptörü ve ilişkili reseptör ailesidir. Apoproteinler, ya reseptör ligandları ya da ligand bağlayıcıların modülatörleri ile etkileşirler. ApoB100, lipoproteine yani LDL reseptörüne bağlandığı gösterilen ilk apoproteindir. ApoE ile yapılan benzer çalışmalar, bunun reseptör bağlanma bölgesinin 140. ile 160. aminoasitler arasında olduğunu göstermiştir. İlginç olarak, ApoE ile ApoB100'deki reseptör bağlanma bölgeleri bazı kısmi benzerlikler gösterir. ApoCI ve CIII, ApoE aracılı reseptör bağlanmasını antagonize edebilmektedir. Bu durum, ApoE'nin lipoprotein yüzeyinde yerinin değişmesi ile meydana gelebilmektedir (72).

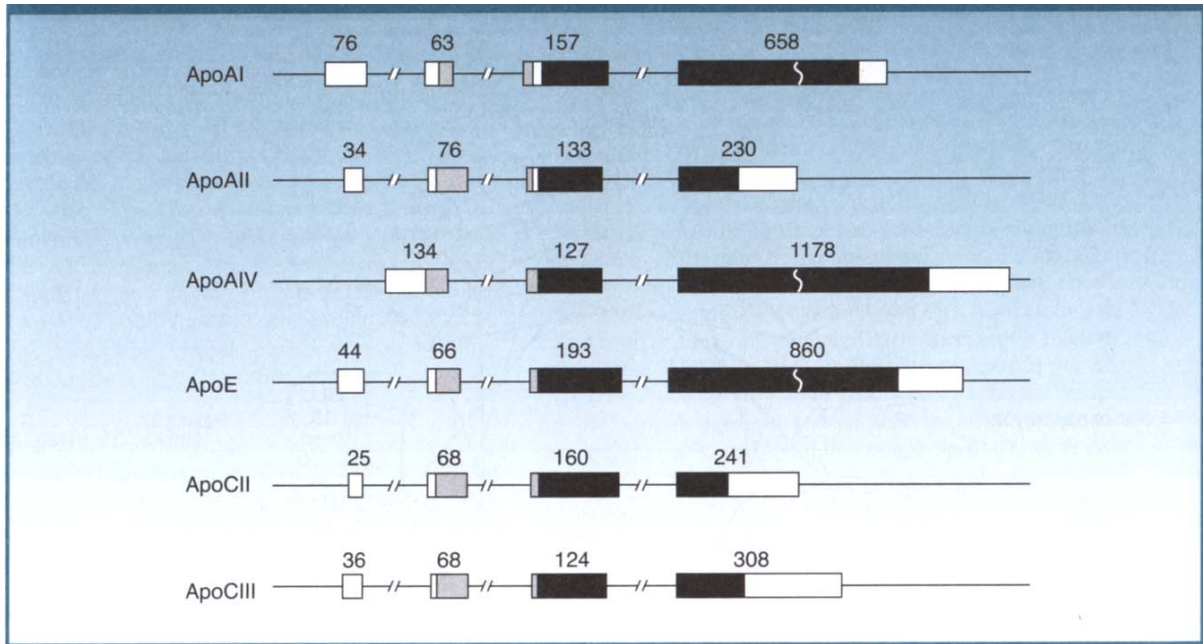
Enzim Aktivasyonu:

Belirli apoproteinlerin bir başka farklı özelliği enzim aktivasyonudur. Örneğin ApoCII, LPL aktivasyon için gereklidir. LPL'nin normal aktivasyonunu önleyen ApoCII'deki insan mutasyonları, enzimin kendisinin mutlak yokluğunun yol açtığı şiddetli

hipertrigliseritemi ile aynı fenotipe sahiptir. ApoAI ise LCAT aktivasyonundan sorumludur, ancak bu fonksiyona hizmet eden tek apoprotein değildir (72).

Apoprotein Gen Yapısı ve Translasyonu:

ApoAI, AII, AIV, CI, CII, CIII ve E'nin ortak ata genden köken aldığı ve sonuç olarak benzer gen yapıları olduğu gözlenmektedir (Şekil 1). ApoCI, CII ve E, 19. kromozom üzerindeyken, apoAI, AIV ve CIII'ü kodlayan genler 11. kromozom ile yakından ilişkilidir. ApoB ise yapısal ve fonksiyonel olarak diğer apoprotein genlerinden farklıdır ve 2. kromozom üzerinde yer almaktadır (72).



Şekil 1: Bazı Apoproteinlerin Genlerinin Yapısı

Montgomery ve arkadaşları, 2000'den alınmıştır.

Apoprotein Sentezi:

Dolaşımdaki plazma proteinlerinin yaklaşık dörtte üçü karaciğer tarafından sentezlenir. ApoAI ve ApoAIV buna dahil değildir ve büyük oranda barsaklarda üretilirler.

Birçok apoprotein dalak, böbrek, adrenaller, testisler, overler, akciğerler ve beyni kapsayan diğer dokulardan da düşük miktarda açığa çıkmaktadır. Örneğin ApoE makrofajlar ve santral sinir sisteminde özelleşmiş hücreler olan astrositlerde de üretilmektedir ve bu durum, hücre içi lipid transportunu destekleyebilmektedir. Apoprotein sentezinin moleküler mekanizması ve düzenlenmesi diğer proteinlerinkine benzer. Birçok

apoprotein için, dokuya özgü diziler ve transkripsiyon faktörleri için tepki elementlerinde değişiklikler belirlenmiştir.

Tablo 6: Plazma Lipoproteinlerinin Apoproteinleri

APOPROTEİN	MOLEKÜLER AĞIRLIĞI	PLAZMA KONSAN-TRASYONU (µM)	ÖLÇÜLEBİLİR MİKTARDA BULUNDUKLARI PLAZMA LİPOPROTEİN(LER)İ	BAŞLICA SENTEZ YER(LER)İ	FONKSİYONU
AI	28,300	35	HDL, Şilomikronlar	Barsak, karaciğer	LCAT aktivasyonu HDL reseptörüne bağlanma
AII	17,400	23	HDL	Karaciğer, barsak	HDL reseptörüne bağlanma, Apo-E bağlanmasının engelleme
AIV	44,500	3.6	Şilomikronlar	Barsak, karaciğer	Kolesterolün hücre dışına çıkışı, LCAT aktivasyonu
B100*	513,000	1.7	LDL, VLDL, IDL	Karaciğer	LDL reseptörü tarafından tanınmak
B48	264,000	-	Şilomikronlar, şilomikron kalıntıları	Barsak	Şilomikron oluşumu
CI	6630	7.5	VLDL, HDL	Karaciğer	Karaciğer tarafından şilomikron ve VLDL alımını baskılamak, LCAT aktivasyonu
CII	8840	4.5	VLDL, HDL	Karaciğer	Lipoprotein lipaz aktivasyonu
CIII	8760	14	VLDL, HDL	Karaciğer	Karaciğer tarafından şilomikron ve VLDL alımını baskılamak
D*	22,100	2.7	HDL	Karaciğer, barsak	LCAT aktivatörü?
E	34,100	1.0	VLDL, şilomikron kalıntıları, IDL	Karaciğer, beyin, makrofajlar, deri testis, dalak	LDL reseptörü ve LDL reseptör-ilişkili protein tarafından tanınmak, lokal lipid dağılımı, kolesterolün ters yönde taşınması

LCAT, lesitin kolesterol açıl transferaz

*B100 ve D moleküler ağırlıklarını artıran önemli karbohidrat değişiklikleri içerir.

† Bilinmemektedir.

Montgomery ve arkadaşları, 2000'den ve Mahley 1993'den değiştirilerek alınmıştır.

Çok çeşitli kromozomlardaki yakınlıklarına rağmen apoproteinler sıklıkla düzenli bir şekilde açığa çıkmazlar. ApoB100 ve apoB48'in sentezleri özellikle ilginçtir, çünkü bunlar posttranskripsiyonel mesajcı ribonükleik asit (mRNA) yazılımını içeren, alışılmamış bir mekanizma ile aynı genden üretilirler. ApoB100'ü kodlayan gen 29 ekson içerir. Ekdon 26, apoB100'de bulunan 4536 aminoasidin 2500'ünden fazlasını kodlar, bu insanlarda bilinen en büyük eksondur. ApoB48, apoB100'ün amino terminalindeki 2152 aminoasidi içerir ve apoB100'ün büyüklüğünün %48'i kadar olduğu için apoB48 olarak adlandırılır. İnsanlarda

apoB48, mRNA yazıcı enzim (editaz) aktivitesinin dokuya özgü etkisi sonucunda barsaklar tarafından üretilir (72).

Apoproteinlerin Posttranslasyonel Modifikasyonu

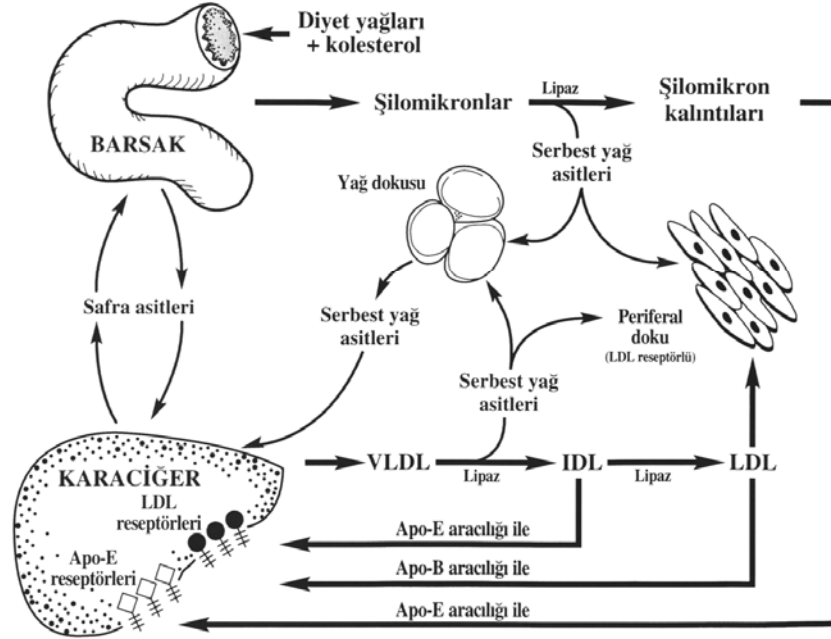
Salınan diğer proteinlere benzer olarak, apoproteinler de çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilirler. Bunlar, sinyal peptidleri veya polipeptidlerin uzaklaştırılması ya da sialik asit residüleri ile sonlanan karbonhidrat grupları eklenmesi şeklinde olabilmektedir. Örneğin; preproAI (267 aminoasitli) amino terminalindeki 18 aminoasiti uzaklaştıran hücre içi sinyal peptidaz ile proAI'e (249 aminoasitli) çevrilir, bu durum yeni sentezlenen AI'in endoplazmik retikulum boyunca nakline aracılık etmektedir. Bir kez salındıktan sonra, proAI hücre dışı proteaz ile hızla olgun plazma apoAI'ine dönüştürülür. Diğer yandan yeni sentezlenen apoE golgi cisimciğinde sialik asit ile sonlanan karbonhidrat zinciri içeren şekle değişir. Bu proteinler plazmadaki yıkımları süresince kısmi değişime uğrarlar. Spesifik olarak asialoglikoproteinleri bağlayan ve içeri alan bir hepatik reseptör bulunmaktadır, ancak bunun lipoprotein katabolizması üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu görülmemiştir (72).

Apolipoprotein E İle İlgili Genel Bilgiler

Üzerinde en fazla araştırma yapılan apolipoproteinlerden biri ApoE'dir. Bu apolipoprotein; apoE içeren lipoproteinlerin, düşük dansiteli lipoprotein reseptörü, apoE reseptörü ve LDL-reseptörü ilişkili protein ile olan etkileşimlerine aracılık eder; böylelikle plazma lipoprotein metabolizmasında kritik bir rol oynar ve dolayısıyla kolesterol metabolizmasının merkezini oluşturur (73).

Apolipoprotein E, 299 aminoasitten oluşur, molekül ağırlığı 34,100'dür ve normal plazma konsantrasyonu 30-70 µg/ml arasında değişmektedir (73) ApoE, barsakta türetilen şilomikronların ve şilomikron artıklarının ve karaciğerde türetilen çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) ve orta dansiteli lipoproteinlerin (IDL) protein yapı taşı olarak ölçülebilir miktarda plazmada dolaşır (Şekil 2) (72, 73) Buna ek olarak HDL1 veya apoE'li-HDL adı verilen yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) bir alt sınıfının parçasıdır (73)

Şilomikron Metabolizması



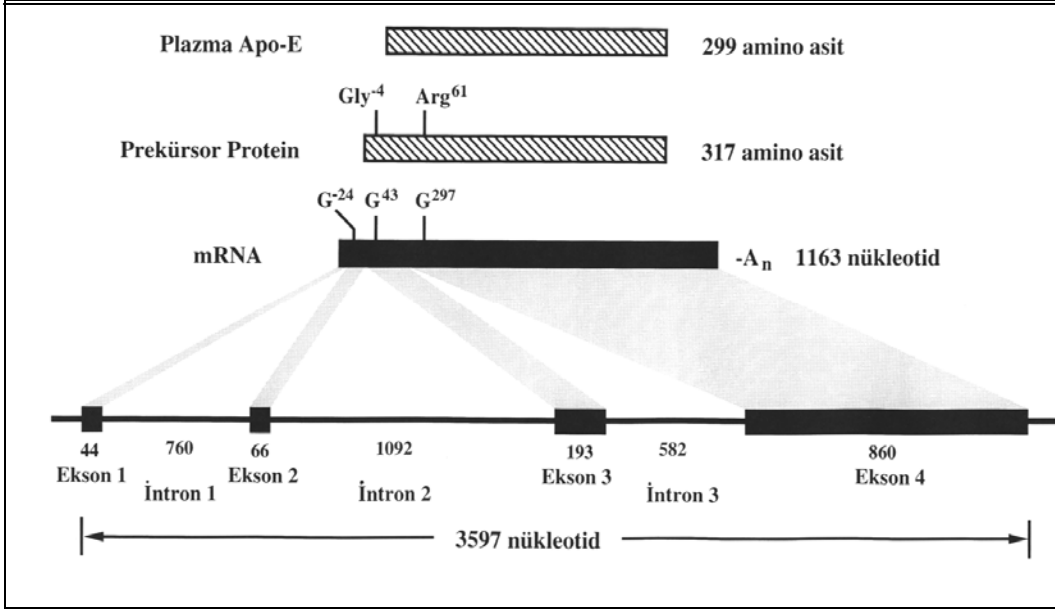
Şekil 2: ApoE ve Şilomikron Metabolizması

Mahley 1993'den alınmıştır.

Başlıca sentez yeri karaciğer, beyin ve makrofajlardır. ApoE-mRNA düzeyinin en yüksek olduğu ikinci organ beyindir (en yüksek düzey karaciğerdedir). Beyinde ApoE sentezinden sorumlu olan asıl hücreler astrositlerdir. Serebrospinal sıvı beyinden türetilen yüksek düzeyde ApoE içerir. ApoE'nin gerek merkezi gerek se periferik sinir sistemindeki kolesterolün taşınmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (73)

Apolipoprotein E'nin Gen Regülasyonu Ve Biyosentezi

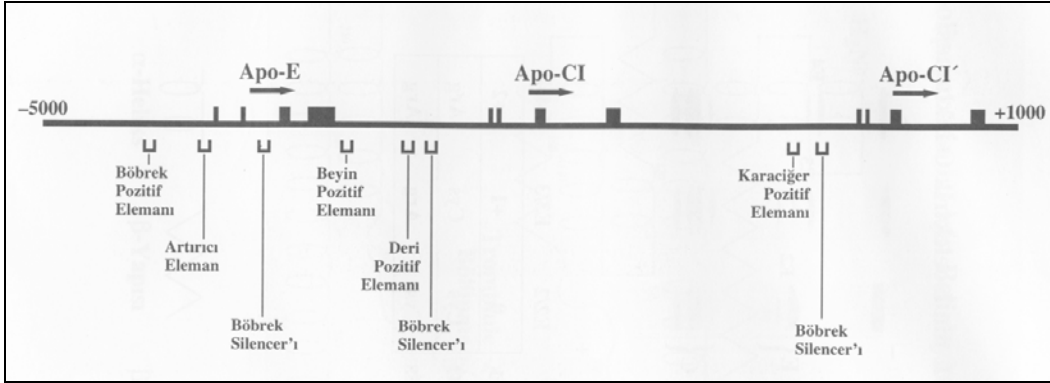
ApoE geni kromozom 19 üzerindeki 19q13.2 bölgesinde yer almaktadır ve Apo-CI ile Apo-CII'nin de içinde bulunduğu gen kümesinin bir bölümünü oluşturur. ApoE geni dört exon ve üç introndan oluşur, 3,6 kb uzunluğundadır ve 1163 nükleotidden oluşan bir mRNA'yı oluşturur. Burada ortaya çıkan primer translasyon ürünü, co-translasyonel olarak bölünen 18 amino asitli sinyal peptidi içeren 317 aminoasitli bir proteindir. Olgun protein plazmaya salgılandığında 299 amino asitten meydana gelir (73). ApoE'nin gen yapısı ve sentez bölgeleri Şekil 3 ve Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 3: İnsan Apolipoprotein E genin yapısı. Mahley 1993'ten alınmıştır (73).

Apolipoprotein E'nin Sentez Bölgeleri

ApoE geninin düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Çeşitli organların değişik hücre türlerindeki ApoE oluşumunu özgül olarak düzenleyen 5' ve 3' bölgeler bulunmaktadır (73).



Şekil 4: ApoE Doku özgün kontrol elemanları. Mahley 1993'ten alınmıştır (73).

Apolipoprotein E'nin Moleküler Yapısı

ApoE'nin başlıca üç çeşidi vardır: ApoE2, ApoE3 ve ApoE4 adı verilen bu şekiller izoelektrik odaklamada elektrik yüklerine göre ayrılırlar. Bunlar e2, e3 ve e4 adı verilen ve toplumda genelde %8, %77 ve %15 oranında görülen üç gen çiftinden kaynaklanır.

Çiftlerin kombinasyonuna göre üç homozigot (e2/2, e3/3, e4/4) ve üç heterozigot (e2/3, e2/4, e3/4) meydana gelir. Bireylerin yaklaşık %60'ı ApoE3 homozigottur. ApoE 2 ve ApoE4, ApoE3'den sadece birer aminoasitin yer değiştirmesi ile ayrılırlar: ApoE2'de, normalde var olan argininin (arg) yerine sisteinin (sistein) geçtiği artık 158'dir. ApoE4'de ise normalde var olan sisteinin yerine argininin geçtiği artık 112'dir (73).

Tablo 7: Kodon 112 ve Kodon 158 Genotipine Göre ApoE Allellik Oluşumları

Genotipine Göre ApoE Allelleri		
Kodon 112 Genotipi	Kodon 158 Genotipi	Allellik Oluşumu
TGC (Cys)	TGC (Cys)	E2/E2
TGC (Cys)	CGC (Arg)	E3/E3
CGC (Arg)	CGC (Arg)	E4/E4
TGC (Cys)	TGC (Cys) / Arg	E2/E3
TGC (Cys) / CGC (Arg)	TGC (Cys) / CGC (Arg)	E2/E4
TGC (Cys) / CGC (Arg)	CGC (Arg)	E3/E4

Apolipoprotein E'nin Yapısı ile Fonksiyon İlişkisi

ApoE'nin bütün şekilleri lipidlere bağlanır. Ancak, reseptöre bağlanma açısından başlıca izoformlar arasında farklar bulunmaktadır. ApoE3 ve ApoE4, LDL reseptörlerine eşit afinetelidir. Ancak, ApoE2'nin LDL reseptörüne bağlanmasında belirgin bir fonksiyon bozukluğu vardır (73).

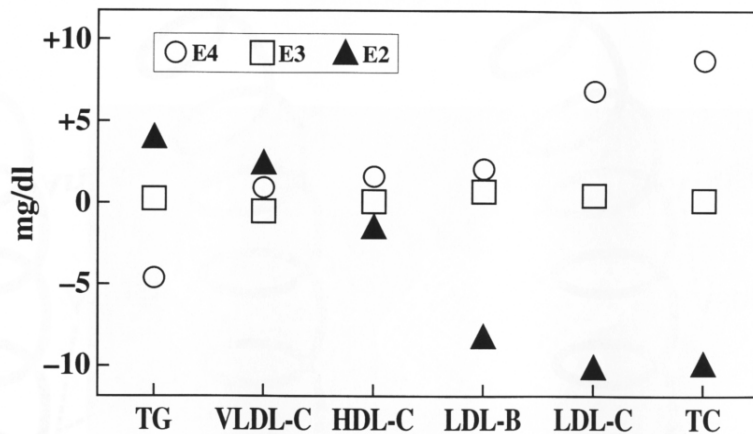
ApoE molekülü çeşitli işlevler gören iki bölgede organize olmuştur. Amino asit zincirinin 165 ile 200 arası artıklarını içeren kısmı, iki görev alanını birbirinden ayıran dayanak bölgesi olarak görev yapmaktadır. Amino terminal ucu (1-191) tipik globüler proteine özgü fiziksel özellikleri ile çok dengeli bir yapıya sahiptir ve reseptör bağlanma bölgesini içerir. Karboksiterminal ucu (192-299) daha az dengelidir ve diğer apolipoproteinlere daha çok benzer. Bu alanda bir yüzü hidrofil ve diğer yüzü hidrofob olma özelliğine sahip üç amfipatik α -heliks bulunduğu sanılmaktadır ve bu yapı apolipoprotein-lipid bağlanma bölgelerinin temelini oluşturmaktadır. Aslında karboksil-terminal ApoE'nin başlıca lipid bağlanma bölgesini içerir. ApoE molekülü trombin enzimi ile 191. kalıntıdan bölünebilir ve bu şekilde bu işlevsel alanlara yaklaşan iki ana parça ortaya çıkar (73).

ApoE'nin temel aminoasitler bakımından zengin (pozitif yüklü artıkların bulunduğu) ve 134-160. amino asit artıkları tarafından kuşatılan kritik bir bölgesi, LDL reseptöründeki asidik (negatif yüklü) artıklarla reaksiyona girer. Daha özgül olarak, 136-150 yakınındaki temel artıklar da LDL reseptörünün bağlanma bölgesi ile doğrudan reaksiyona girebilir. Pozitif yüklü arginin ve lizin artıkları normal bir reseptör bağlama fonksiyonu için önemlidir. Reseptör bağlamaları kusurlu değişik mutantlar içinde en yaygın olanı ApoE2'dir (73).

Reseptör bağlama bakımından kusurlu olan ApoE, şilomikron artıklarının ve VLDL artıklarının birikmesine neden olur. Bu lipid bozukluğuna Tip III hiperlipoproteinemi denir. Ancak ApoE2 homozigozite varlığında bile bütün bireylerde hiperlipidemi meydana gelmez, bunun için birçok olguda ikinci bir genetik ya da çevresel faktör gerekmektedir (73).

Apolipoprotein E Gen Polimorfizminin Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi

ApoE'nin başlıca üç izoformunun plazma lipid ve lipid türevleri üzerine önemli etkileri vardır. ApoE3 ile karşılaştırıldığında, ApoE4 daha yüksek plazma kolesterol düzeyleri, daha yüksek LDL kolesterol düzeyleri ve daha düşük ApoE düzeyleri ile ilişkilidir. Diğer yandan, ApoE2 daha düşük total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri ve daha yüksek ApoE düzeyleri ile ilişkilidir (Şekil 5). Plazma kolesterol düzeylerinin önemli bir belirleyicisi olan ApoE gen çiftlerinin, plazma kolesterolü bakımından bireyler arası değişimlerin %10'undan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (73).



Şekil 5: ApoE polimorfizminin lipid ve lipoproteinler üzerine etkisi. Mahley, 1993'ten alınmıştır (73).

ApoE'nin lipidlerin ve kolesterolün hücrelere taşınmasında iki önemli görevi vardır: Bir yandan lipidlerin çeşitli organların hücreleri arasında taşınmasını yönetir, diğer yandan bir doku veya organ içindeki hücrelere yeniden dağıtım ile ilgilidir. Yerel taşımada, çeşitli hücreler tarafından sentezlenip interstisiyel sıvıya salgılanan ApoE görev alır. Kolesterol gereksinim duyan hücrelerde LDL reseptör upregülasyonu meydana gelir; ApoE varlığı, ApoE içeren HDL ve lipid komplekslerini gerekli lipidlerden yoksun hücrelere yönlendirir (73).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction):

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR) adı verilen teknik 1986 yılında geliştirilmiştir ve DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin hücreden arındırılmış olarak doğrudan çoğaltılmasına dayanır. PCR ile yok denecek kadar az miktarda DNA'dan bile klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA fragmentleri elde edilir. Konakçı hücre ile yapıldığında haftalar sürece klonlama işlemi PCR ile bir kaç saatte tamamlanır. PCR'da kullanılacak primerler bilgisayar destekli aletlerde sentezlenebilmektedir. DNA klonlamasını kolaylaştıran PCR, günümüzde değişik alanlarda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır.

PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır.

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA, temiz olmak zorunda değildir ve genomik DNA, kurumuş kan ya da semen gibi adli örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, tek bir saç teli, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır; bu işlem 90-95°C'de yaklaşık 5 dakika sürer.

İkinci adımda, sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-30 nükleotit uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

Üçüncü adımda, DNA polimeraz'ın ısıya dayanıklı şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, *Taq polimeraz*) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzim,

nükleotitleri 5' den 3' e doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu üç basamaktan oluşan reaksiyon seti – çift zincirli ürününün tek zincirli hale getirilmesi (*denaturation*), primerlerin bağlanması (*annealing*) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (*extension*) – ‘bir döngü’ olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. Yirmibeş-otuz döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1,000,000 kat artma olur. İşlem *thermocycler* (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir.

PCR'in avantajları olarak: hızlı olmasının yanı sıra, çok hassas olması (örneğin tek bir hücrenin içindeki DNA ile uygulanabilmesi) sayılabilir. PCR'in bu özelliği, onun genetik testler, adli vakalar, ve moleküler paleontoloji gibi pek çok alanda kullanılmasının önemini arttırmaktadır. Ayrıca, PCR, kısmen parçalanmış, başka maddelerle bulaşmış ya da klasik metotlarla elde edilerek klonlanması zor hatta olanaksız olan bir ortamdaki DNA örnekleri için de kullanılabilir. PCR'in sınırlılıkları olarak: hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekmesi, nispeten kısa bir ürün elde edilebilmesi ve diğer DNA kaynaklarından çok küçük miktarda bir bulaşmanın bile doğru sonuç alınmasını engelleyebilmesi sayılabilir (74).

PCR, klonlamada kullanılabileceği gibi, bunun yanı sıra genetik belirteç olarak DNA tekrar dizilerindeki ve restriksiyon kesim bölgelerindeki farklılıkların kısa sürede tanımlanmasında da kullanılır. Gen yapılarına özgül primerler kullanılarak, genetik bozukluklardaki mutasyonların yerinin ve mutasyonun tipinin hızlı olarak belirlenmesinde kullanılır. Primerler diğer dizilerden sadece bir tek nükleotit farklı olsa bile, o diziyi saptayacak şekilde düzenlenir ve böylece allele özgü primerler kullanılarak, genetik testlerin yapılmasını mümkün kılar.

Özellikle tek bir hücrenin, tükrük bulaşmış posta pulunun, fosillerin ya da suç bölgesindeki bir saç telinin DNA kaynağı olarak kullanıldığı örneklerle yapılan çalışmalarda, DNA'nın gelişigüzel primerler kullanılarak, özgül olmayan amplifikasyonu çok yararlıdır. PCR, dizisi bilinen bir bölgeye komşu olan tanımlanmamış bir bölgenin incelenmesinde, hatta baz dizi analizinde bile kullanılabilir. Kısaca, PCR, çok geniş kullanım alanı olan ve modern genetikte çok yönlü kullanılabilen tekniklerden biridir (74).

Revers Hibridizasyon:

Revers hibridizasyonda, PCR işlemiyle amplifiye edilmiş olan gen segmentlerinin birlikte karakterizasyonu, nitroselüloz stripler üzerinde immobilize edilmiş olan Sekans-Spesifik Oligonükleotid Problar (SSOP) kullanılarak hazır kitlerle gerçekleştirilir. Nitroselüloz striplerde, ilgili gen bölgelerinin wild type ve mutant allelleri için gen problemleri ve ayrıca bir konjugat kontrolü, bir spesifite kontrol ve gerekli sayıda sensitivite kontrolü alanları bulunur. Hibridizasyon sırasında, denatüre amplifiye DNA striplere sabitlenmiş gen problemlerine bağlanır. Çok spesifik bir yıkama süreci, hibridlerin sadece problemlerin sekansının amplifiye DNA ile %100 komplementer olması durumunda sağlam kalmasını temin eder. Streptavidine-bağlı alkalın fosfataz gen problemleri ve biotin-işaretli amplifiye DNA hibridlerine bağlanır. Bu kompleks ardından BCIP/NBT'nin alkalın fosfataz ile renk reaksiyonu sonucunda saptanır ve stripler üzerinde oluşan band paterni, her kitin kendine özgü kalıbı ile değerlendirilir. Bu amaçla, kite özgü decoder kalıpdaki reaksiyon bölgeleri ile birebir örtüşen strip reaksiyon alanları yorumlanır. Test sırasında konjugat alanı ve doğru amplifikasyonu gösteren sensitivite alanı tamamen gelişmelidir. Bu alanların reaksiyona girmemesi durumunda, yanlış negatif sonuç alınacağından, test tekrarlanmalıdır. Spesifite alanı, non-spesifik hibridizasyonda reaksiyona girer ve bu durumda yanlış pozitif sonuç alınacağından testin tekrarı gerekir. Bir prob sinyalinin değerlendirilebilmesi için, en az ilgili sensitivite kontrolü şiddetinde olması gerekir.

Revers Hibridizasyonun avantajları şu şekilde sayılabilir:

1. Bu yöntem ile, bir seferde hem genin kendisi (örn. ApoE geni), hem de allellik durumu belirlenir.
2. Zaman kazandırır: PCR sonrası elektroforezde yürütme, ardından allel tespiti için restriksiyon ve tekrar elektroforez işlemi safhalarına gerek kalmamaktadır.
3. Kitler, kendi kontrollerini içermektedir.
4. Seri çalışmaya uygundur.
5. Otomatizasyona uygundur.

Revers Hibridizasyonun Kısıtlılıkları şu şekilde sayılabilir:

- 1- Bu testte, sadece biotin ile işaretlenmiş nükleik asitler içeren ampliconlar kullanılabilir.
- 2- Amplifikasyon öncesinde beşeri genomik DNA (örneğin kandan), DNA izolasyonu yöntemleri ile izole edilmelidir.
- 3- Bu test, sadece stripte tanımlanmış genlerin yine önceden tanımlanmış mutasyonları (örn. ApoE e2, e3, e4) hakkında bilgi vermektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklem Grubu:

Çalışmaya, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda 'Yaygın Gelişim Bozukluk' tanısı ile takip edilen velisinin aydınlatılmış onamı bulunan 42 hasta katılmıştır (34 erkek, 8 kız; %82,9 erkek, %17,1 kız; erkek/kız oranı: 4,9 ; yaş ortalaması 115 ay \pm 35 ve yaş range'i 39-185 ay). İleri değerlendirmede bir kız eksik veri nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır ve toplam 41 hastada ApoE polimorfizmi DNA izolasyonu ve ardından PCR ve revers hibridizasyon işlemleri ile incelenmiştir, ApoE allellerinin örneklem içindeki dağılımı belirlenmiştir.

Çalışma protokolü, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 11.02.2004 tarih ve 2004-3/9 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

Kan örneklerinin toplanması ve örneklerin işlenmesi:

Hastaların ön kolundan (antekubital fossa'dan) 2 ml venöz kan EDTA'lı tüpe alınmıştır. Kan örnekleri oda sıcaklığında 20-30 dakika tutulmuş, ardından örneklerde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole DNA, PCR ve revers hibridizasyon işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Hastaların kan örnekleri tamamlandıktan ve DNA izolasyonları yapıldıktan sonra, PCR ve revers hibridizasyon işlemi tüm örneklerde aynı gün gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında ApoE allelik durumunun tespiti için her bir örnekte ve kitin kontrol DNA'sında önce ApoE2 ve ApoE4 için paralel olarak ayrı iki PCR gerçekleştirilmiş ve ardından bu ikişer PCR ürünü mutasyonun saptanması amacıyla revers hibridizasyon işlemi için tekrar örnek bazında birleştirilmiştir. Revers hibridizasyon tüm örneklerde ve kitin kontrol DNA'sında ProfiBlot48 kullanılarak otomatize şekilde tek inkubasyon tepsisinde toplu olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nın teknik imkanları ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Kitler:

A- DNA İzolasyonunda; Invisorb® Spin Blood Mini Kit for DNA Extraction (Invitek, Berlin/Almanya) kullanılmıştır. DNA manuel olarak izole edilmiştir.

B- PCR:

b.1) PCR için 'Amplification of Three Fragments of the Human Apolipoprotein E and B Genes' kiti (GenID® Strassberg / Almanya; Art.no.RDB2051) kullanılmıştır.

b.2) PCR için ayrıca ‘*Taq* DNA Polymerase (recombinant) 5u/μl’ enzimi kullanılmıştır (Fermentas #EP0402:500u).

C- Revers Hybridizasyon için ‘Apolipoprotein E and B (ApoE and ApoB) Risk Alleles for Alzheimer’s Disease, Familial Hyperlipoproteinaemie and Arteriosclerosis’ Revers Hybridization kiti (GenID® Strassberg / Almanya; Art.no.RDB2050E) kullanılmıştır.

A- DNA İzolasyonu

Kan örneklerinde DNA izolasyonu manuel yöntemle ve hazır kitler kullanılarak (Invisorb® Spin Blood Mini Kit for DNA Extraction; Invitex, Berlin/Almanya) yapılmış, kitin kendi tüpleri ve spin filtreleri kullanılmıştır. Yöntem adapte edilerek Proteinase K dilüsyonu için proteinase K buffer yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır. Ayrıca, yöntemde zor ekstraksiyonlar için önerilen ve bu amaçla kitte bulunan Buffer EL’nin kullanılmasına gerek kalmamıştır.

Buna göre kısaca; 200 μl kan 1,5 ml’lik tüplere aktarılmış ve üzerine 200 μl lizis buffer A ve 20 μl Proteinase K eklenmiştir. Örnekler vortekslendikten (Nüve Vortex NM110) sonra 56°C’de 10 dakika süre ile sürekli çalkalama ile inkübe (Eppendorf Thermomixer comfort) edilmiştir. Lizis sonrasında örnekler üzerine 400 μl bağlama buffer eklenmiş ve örnekler 3 kez pipetle alıp-verme ile karıştırılmıştır. Takiben örnekler ‘spin filter’e eklenip 1 dakika bekledikten sonra 12.000 rpm’de 2 dakika süreyle santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415D) edilmiştir. Spin filterler önce 500 μl ve ardından 800 μl yıkama buffer ile iki kez yıkanmış ve her yıkamada 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. İkinci yıkama sonrası spin filterler 13.000 rpm’de 4 dakika süreyle santrifüj edilerek alkolün tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Takiben spin filterlere önceden 56°C’ye ısıtılmış ‘elution buffer’ eklenip 1 dakika inkubasyonun ardından 10.000 rpm ile 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplayıcı tüplerde toplanan örnek DNA’sı, PCR ve revers hibridizasyon işleminde kullanılmak üzere, -20°C’de muhafaza edilmiştir.

B- In Vitro Amplifikasyon (PCR):

İzole edilmiş DNA örneklerinde PCR, manuel yöntemle ve hazır kitler kullanılarak (‘Amplification of Three Fragments of the Human Apolipoprotein E and B Genes’, GenID® Strassberg / Almanya; Art.no.RDB2051, PN1 lot.51116 ve PN2 lot.51116) yapılmış, bununla birlikte kitinin önermesinde değişiklik yapılarak, *Taq* DNA polimeraz 1u (0,2 μl) yerine 2u (0,4 μl) olarak uygulanmıştır. Her bir örnekte iki paralel PCR

gerçekleştirilerek, ApoE geninin E2 ve E4'e spesifik iki fragmanı biotinle işaretlenmiş primerlerle ayrı ayrı amplifiye edilmiştir.

Buna göre kısaca; her bir örnek için ApoE allel 2 fragmanı için 15 µl Amplifikasyon miksi ApoE-PN1, 2,5 µl 10x Taq Polymerase Buffer, 2,5 µl MgCl₂ solüsyonu 25 mM ve 0,4 µl Taq DNA polimeraz 5u/µl (= 2u) aktarılmış, takiben 5,0 µl örnek (ya da kontrol) DNA'sı eklenmiştir (toplam reaksiyon volümü 25,4 µl). Paralel olarak her bir örnekte ApoE allel 4 fragmanı için aynı işlem tekrarlanmış, ancak 15 µl Amplifikasyon miksi ApoE-PN1 yerine aynı miktarda Amplifikasyon miksi ApoE-PN2 uygulanmıştır. Takiben kit için önerilen PCR döngüleri uyarlama yapılmaksızın aynen uygulanmış ve bu yolla ApoE-PN1 için 113bp; ApoE-PN2 için de 238 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Uygulanan PCR Programı Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8: ApoE allelleri için uygulanan PCR Programı

PCR Programı (AB 2720 Thermocycler)		
Süre	Isı	Döngü Sayısı
5 dk.	95°C	1 döngü
30 sn.	95°C	10 döngü
2 dk.	63°C	
10 sn.	95°C	20 döngü
30 sn.	60°C	
30 sn.	72°C	
8 dk.	72°C	1 döngü
-	4°C	-

C- Revers Hibridizasyon :

PCR ile elde edilmiş olan amplifikasyon ürünlerinin revers hibridizasyonu hazır kitler ile ('Apolipoprotein E and B (ApoE and ApoB) Risk Alleles for Alzheimer's Disease, Familial Hyperlipoproteinaemie and Arteriosclerosis' Revers Hybridization kit; GenID® Strassberg / Almanya; Art.no.RDB2050E, lot.603-3) yapılmış, işlemde Tecan ProfiBlot 48 ve Tecan A-5082 tray kullanılarak otomatizasyon sağlanmıştır.

Bu amaçla, önce inkubasyon tepsi örnek sayısına göre hazırlanmış ve kit solüsyonları ProfiBlot 48 kanallarına sırasıyla 1) Hybridization Buffer (47°C), 2) Stringent

Wash Solution A (47°C), 3) Rinse I, 4) Rinse II, 5) Conjugate Solution (1:100 taze dilusyon) ve 6) Substrat olmak üzere yerleştirilmiştir.

İşlem Safhasında kısaca her bir tepsi çukuruna 40 µl denatürasyon solüsyonu ile bunun üzerine gelecek şekilde örnekten elde edilmiş olan 20 µl amplicon PN-1 ve 20 µl amplicon PN-2 eklenip iyice karıştırılmış ve 5 dakikla süreyle oda ısısında inkübe edilmiştir. Tepsi ProfiBlot 48'e yerleştirilip Step-2/Pause'da stripler çukurlara yerleştirilmiş, her bir çukura 1 ml Hibridization solution (47°C) eklenmiş, ardından 30 dakika süreyle 47°C'de shaker ile inkübe edilip hibridizasyon solüsyonu dökülmüştür. Takiben stripler 47°C'de iki kere 1 ml stringent wash solution (47°C) eklenerek birer dakika süreyle hafif çalkalayarak yıkanmış ve ardından 1 ml stringent wash solution (47°C) eklenerek 15 dakika süreyle 47°C'de hafif çalkalayarak inkübe edilmiş ve yıkama solüsyonu dökülmüştür. Bu noktadan sonra işlemlere oda ısısında devam edilerek, önce stripler iki kere 1 ml Rinse-I eklenerek birer dakika süreyle hafif çalkalayarak yıkanmış, ardından 1 ml conjugate solution (1:100) eklenip 30 dakika süreyle oda ısısında hafif çalkalayarak inkübe edilmiş, solüsyon dökülerek üç kere 1 ml Rinse-II eklenerek birer dakika süreyle hafif çalkalayarak yıkanmıştır. Son olarak oda ısısındaki substrattan 1 ml eklenerek 10 dakika süreyle oda ısısında inkübe edilmiş ve ardından reaksiyonu durdurmak için stripler iki kere 1 ml distile su ile yıkanmıştır. İşlem bitiminde stripler forceps ile çukurlardan alınarak karanlıkta absorban kağıt üzerinde kurutulmuş, ardından stripler ışıktan korunarak saklanmıştır.

D- Değerlendirme ve Sonuçların Yorumu

Değerlendirmede, kuru stripler beyaz kağıt üzerine alınarak kite özgü decoder kalıp alt kenarıyla stripdeki işarete denk gelecek şekilde strip üzerine yerleştirilmiş ve kalıpdaki reaksiyon bölgeleri ile birebir örtüşen strip reaksiyon alanları okunmuştur.

Strip üzerinde reaksiyona girebilecek toplam 11 reaksiyon alanı bulunmaktadır (Şekil 6). Bunlar:

1- Konjugat Kontrolü: Bu reaksiyon alanı, konjugat bağlanmasının etkinliğini gösterir. Her zaman reaksiyona girmiş olmalıdır.

2- Spesifite Kontrolü: Bu reaksiyon alanı, sadece yıkama ısısı gereğinden düşük ise reaksiyona girer. Hibridizasyonun non-spesifik olduğunu gösterir.

3- Sensitivite Kontrolü A: Bu reaksiyon alanı, hibridizasyonun optimal sensitivitede gerçekleştiğini gösterir. PN miks ApoE-PN1'in amplifikasyon kontrolü görevini görür.

4- ApoE alanı A-cys: Bu reaksiyon alanı, ApoE geni 'A' alanında cystein (cys) kodluyorsa reaksiyona girer.

5- ApoE alanı A-arg: Bu reaksiyon alanı, ApoE geni 'A' alanında arginin (arg) kodluyorsa reaksiyona girer.

6- Sensitivite Kontrolü B: Bu reaksiyon alanı, hibridizasyonun optimal sensitivitede gerçekleştiğini gösterir. PN miks ApoE-PN2'nin amplifikasyon kontrolü görevini görür.

7- ApoE alanı B-cys: Bu reaksiyon alanı, ApoE geni 'B' alanında cystein (cys) kodluyorsa reaksiyona girer.

8- ApoE alanı B-arg: Bu reaksiyon alanı, ApoE geni 'B' alanında arginin (arg) kodluyorsa reaksiyona girer.

9- Sensitivite Kontrolü ApoB: Bu reaksiyon alanı, hibridizasyonun optimal sensitivitede gerçekleştiğini gösterir. PN miks ApoB'nin amplifikasyon kontrolü görevini görür. (Bu çalışmada kullanılmamıştır.)

10- ApoB-Arg: Bu reaksiyon alanı, ApoB geni '3500' pozisyonunda arginin kodluyorsa reaksiyona girer. (Bu çalışmada kullanılmamıştır.)

11- ApoB-Gln: Bu reaksiyon alanı, ApoB geni '3500' pozisyonunda glutamin (gln) kodluyorsa reaksiyona girer. (Bu çalışmada kullanılmamıştır.)

1- Konjugat Kontrolü	---
2- Spesifite Kontrolü	---
3- Sensitivite Kontrolü A	---
4- ApoE alanı A-cys	---
5- ApoE alanı A-arg	---
6- Sensitivite Kontrolü B	---
7- ApoE alanı B-cys	---
8- ApoE alanı B-arg	---
9- Sensitivite Kontrolü ApoB	---
11- ApoB-Arg	---
12- ApoB-Gln	---

Şekil 6: Nitroselüloz strip üzerindeki kontrol alanları ve gen problemleri. GenID GmbH, 'ApoE ve ApoB reverse hybridization kit'ten alınmıştır (75).

Allelik Oluşumlarının Belirlenmesi

Allelik durumunun belirlenmesinde, revers hibridizasyon sonrasında her bir örneğe ait stripte band paterni decoder kalıp yardımıyla yorumlanmıştır.

Bu amaçla, öncelikle stripte tanımlanmış olan konjugat kontrolünün pozitif, spesifite kontrolünün negatif ve her iki ApoE sensitivite kontrollerinin (ApoE alanı A ve B) pozitif olmasına dikkat edilmiştir. Ardından her bir stripte ApoE alanı A’da tanımlanmış olan kodon 112’ye ait arginin ve sistein reaksiyon alanları ile ApoE alanı B’de tanımlanmış olan kodon 158’e ait arginin ve sistein reaksiyon alanları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve ardından dört reaksiyon alanı birlikte yorumlanmıştır.

Bilindiği gibi, ApoE e3 ana form kabul edilip, e2’de kodon 158’de bulunması gereken arginin, sistein ile yer değiştirmiştir; e4’de ise kodon 112’de bulunması gereken sistein, arginin ile yer değiştirmiştir.

Buna göre, band paterni Tablo 9’de gösterildiği şekilde okunmuştur.

Tablo 9: ApoE allelik durumunun strip paterni üzerinden belirlenmesi

Allelik durumu belirleyecek sistein / arginin varlığı	e2		e3		e4	
	A	B	A	B	A	B
	kodon	kodon	kodon	kodon	kodon	kodon
	112	158	112	158	112	158
sistein varlığı	X	X	X			
arginin varlığı				X	X	X

Buna göre, ApoE alanı A ve B için tanımlanmış olan reaksiyon alanları Şekil 7’de gösterildiği şekilde yorumlanmıştır:

Reaksiyon Alanları	Strip No.	Yorum
	1	
1- Konjugat Kontrolü	---	Pozitif olmalı
2- Spesifite Kontrolü	---	Negatif olmalı
3- Sensitivite Kontrolü A	---	Pozitif olmalı
4- ApoE alanı A-cys	---	
5- ApoE alanı A-arg	---	
6- Sensitivite Kontrolü B	---	
7- ApoE alanı B-cys	---	
8- ApoE alanı B-arg	---	
9- Sensitivite Kontrolü ApoB		
11- ApoB-Arg		
12- ApoB-Gln		

e2	e3	e4
X	X	
		X

Pozitif olmalı

e2	e3	e4
X		
	X	X

Şekil 7: ApoE alanı A ve B’nin yorumlanması

ApoE allelik durumunun toplam 6 olasılığının band paterni ve yorumu, Şekil 8’de gösterilmiştir.

	Strip 1 e3/e3	Strip 2 e3/e2	Strip 3 e3/e4	Strip 4 e2/e2	Strip 5 e4/e4	Strip 6 e2/e4
1- Konjugat Kontrolü	---	---	---	---	---	---
2- Spesifite Kontrolü						
3- Sensitivite Kontrolü A	---	---	---	---	---	---
4- ApoE alanı A-cys	---	---	---	---	---	---
5- ApoE alanı A-arg			---		---	---
6- Sensitivite Kontrolü B	---	---	---	---	---	---
7- ApoE alanı B-cys		---		---		---
8- ApoE alanı B-arg	---	---	---		---	---
9- Sensitivite Kontrolü						
ApoB						
11- ApoB-Arg						
12- Apob-Gln						

Şekil 8: ApoE allelik durumunun toplam 6 olasılığının yorumu

İstatistiksel Analiz:

Veri analizlerinde ApoE gen polimorfizminin incelenen hastalardaki klinik değeri SPSS (SPSS Inc.) ve Statcalc (EpiInfo) istatistik paket programları ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki fark K.Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi ile araştırılmış, nonparametrik korelasyon yöntemi uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ alınmıştır.

Çocuk gelişiminin özellikleri nedeniyle, yaş ile ilgili tüm hesaplamalarda veriler ay olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Örneklem Grubu

Örneklem grubu toplam 42 kişiden oluşmaktadır. Bir kişi eksik veri nedeniyle çalışma dışı kalmıştır. Değerlendirmeye 41 kişi alınmıştır: 34'ü erkek (%82,9) ve 7 kızdır (%17,1); erkek/kız oranı 4,9'dur. Yaş ortalaması 115 ay \pm 35 olarak saptanmış, range 39-185 ay olarak tespit edilmiştir.

Örneklem hastalarının ApoE genotipleri

Olguların ApoE genotipleri Ek A'da gösterilmiştir.

ApoE genotiplerinin dağılımı

Görüldüğü gibi, en sık rastlanılan ApoE genotipi 3/3'dür (%68,3). Bunu sırasıyla 2/3 (%17,1), 3/4 (%12,2) ve 2/4 (%2,4) genotipleri izlemektedir. ApoE 2/2 ve 4/4 genotipleri ise çalışmamızda tespit edilmemiştir. Cinsiyete göre genotip dağılımı, gruplara düşen hasta sayısı azlığı nedeniyle hesaplanamamaktadır. Örneklemdeki genotip dağılımının özeti Tablo 10'da verilmiştir. Örneklem grubunun %68,3'ü homozigottur ve hepsinin genotipi 3/3'tür.

Tablo 10: Hastaların ApoE Genotip dağılımı

Genotip	Toplam (n:41)		Kız (n:7)		Erkek (n:34)	
	n	Dağılım (%)	n	%	n	%
2/2	-	-	-	-	-	-
2/3	7	17,1	-	-	7	20,6
2/4	1	2,4	1	14,3	-	-
3/3	28	68,3	4	57,1	24	70,6
3/4	5	12,2	2	28,6	3	8,8
4/4	-	-	-	-	-	-

Cinsiyete göre allel dağılımı:

Cinsiyete göre ele alındığında, erkeklerde en sık görülen allel e3'tür (%85,3), bunu e2 (%10,3) ve e4 (%4,4) izlemektedir. Kızlarda ise yine en sık görülen allel e3'tür (%71,4), bunu e2 (%7,1) ve e4 (%21,4) izlemektedir. Cinsiyete göre anlamlı fark yoktur ($p>0,05$), ancak kızlarda e4'ün erkeklere göre fazla oluşu anlamlılık düzeyine yaklaşmaktadır ($p = 0,059$).

Allel frekanslarının dağılımı

Örnekleme oluşturan 41 hastada bulunan toplam 82 allelin frekans (doz) dağılımı Tablo 11'de gösterilmektedir. En sık görülen allel e3 olarak saptanmış (%82,9), e2 oranı %9,8 ve e4 oranı %7,3 olarak belirlenmiştir.

Tablo 11: Hastalardaki ApoE Allel Frekanslarının Dağılımı

	Allel frekansı	Yüzde	Minimum frekans	Maksimum frekans
Allel 2	8	9,8	0	1
Allel 3	68	82,9	0	2
Allel 4	6	7,3	0	1
Toplam	82	100		

Apolipoprotein ApoE, A1 ve B düzeyleri ile A1/B oranı

Olgularda apolipoprotein düzeyleri incelenmiş, ayrıca her bir hasta için apolipoprotein A1/B oranları hesaplanmıştır. Genotiplere göre apolipoprotein düzeyleri ve apoA1/apoB oranları arasında fark bulunmamıştır (Tablo 12’de).

Tablo 12: Genotipe göre Apolipoprotein ApoE, A1 ve B düzeyleri ile A1/B oranı

		N	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	p
apo E mg/dL	2/4	0132
	3/2	6	3.17	.75	2	4	
	3/3	26	2.62	.57	1	3	
	3/4	4	2.25	.96	1	3	
	Total	36	2.67	.68	1	4	
Apo A1 mg/dL	2/4	1	158.00	.	158	158	.840
	3/2	7	179.29	29.14	148	229	
	3/3	28	170.46	34.30	110	271	
	3/4	5	174.60	21.62	145	197	
	Total	41	172.17	31.38	110	271	
Apo B mg/dL	2/4	1	69.00	.	69	69	.921
	3/2	7	61.86	14.39	40	80	
	3/3	28	63.82	16.95	36	103	
	3/4	5	75.20	37.32	49	140	
	Total	41	65.00	19.50	36	140	
apoA1 /apoB (mg/dL)	2/4	1	2.2899	.	2.29	2.29	.842
	3/2	7	3.1238	1.2866	2.08	5.73	
	3/3	28	2.7809	.6569	1.73	4.69	
	3/4	5	2.6501	.9454	1.39	3.65	
	Total	41	2.8115	.8104	1.39	5.73	

Genotipe göre serum lipid, glukoz ve insülin düzeyleri

Olgularda tespit edilen lipid, glukoz ve insülin düzeyleri genotipe göre karşılaştırıldıklarında, sadece Lipoprotein (a) açısından genotip grupları arasında fark bulunduğu görülmüştür ($p = 0.041$). Mann-Whitney Testi ile, lipoprotein(a) düzeyinin 2/3'de 3/3'e göre anlamlı düzeyde fazla olduğu tespit edilmiştir ($p = 0.035$). Genotipe göre serum lipid düzeyleri ve Kruskal-Wallis sonuçları Tablo 13'de gösterilmektedir.

Tablo 13: Genotipe göre serum lipid düzeyleri ve Kruskal-Wallis sonuçları

		N	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum	p
kolesterol mg/dL	2/4	1	155.00	.	155	155	
	3/2	7	167.14	27.01	143	221	
	3/3	28	154.29	30.38	101	219	
	3/4	5	171.00	48.38	134	256	
	Total	41	158.54	31.81	101	256	
HDL kolesterol mg/dL	2/4	1	45.00	.	45	45	
	3/2	7	56.00	7.77	46	70	
	3/3	28	52.89	14.36	34	107	
	3/4	5	56.20	5.02	53	65	
	Total	41	53.63	12.44	34	107	
trigliserid mg/dL	2/4	1	189.00	.	189	189	
	3/2	7	86.86	52.16	44	193	
	3/3	28	83.82	48.06	37	268	
	3/4	5	72.80	21.53	47	96	
	Total	41	85.56	48.00	37	268	
VLDL mg/dL	2/4	0	
	3/2	3	12.733	4.743	8.8	18.0	
	3/3	10	20.580	12.868	8.8	53.6	
	3/4	1	9.400	.	9.4	9.4	
	Total	14	18.100	11.632	8.8	53.6	
LDL kolesterol mg/dL	2/4	0	
	3/2	3	99.600	39.552	72.6	145.0	
	3/3	10	74.720	22.659	29.4	116.2	
	3/4	1	89.600	.	89.6	89.6	
	Total	14	81.114	26.683	29.4	145.0	
lipoprotein (a) mg/dL	2/4	1	2.00	.	2	2	
	3/2	7	29.71	27.41	7	79	
	3/3	28	13.57	14.82	2	57	
	3/4	5	8.40	8.79	2	23	
	Total	41	15.41	17.82	2	79	
alfa-1 % liporotein	2/4	1	39.100	.	39.1	39.1	
	3/2	6	41.467	4.889	35.5	47.3	
	3/3	28	39.957	8.819	21.8	60.9	
	3/4	5	43.420	7.437	32.6	52.3	
	Total	40	40.595	8.004	21.8	60.9	

pre-beta % lipoprotein	2/4	1	32.600	.	32.6	32.6	.327
	3/2	6	16.917	8.474	6.5	27.0	
	3/3	28	19.400	7.068	4.5	35.3	
	3/4	5	16.000	7.207	9.5	24.8	
	Total	40	18.933	7.469	4.5	35.3	
beta % lipoprotein	2/4	1	28.300	.	28.3	28.3	.379
	3/2	6	41.633	6.173	32.1	46.8	
	3/3	28	40.657	6.119	32.3	51.7	
	3/4	5	40.600	8.759	30.1	53.7	
	Total	40	40.487	6.535	28.3	53.7	
glukoz mg/dL	2/4	1	98.00	.	98	98	.449
	3/2	7	89.86	6.28	82	98	
	3/3	28	87.54	11.47	65	126	
	3/4	5	93.20	14.27	76	109	
	Total	41	88.88	11.00	65	126	
insulin mikroIU/ml	2/4	1	12.300	.	12.3	12.3	.309
	3/2	7	2.814	2.722	.2	7.4	
	3/3	24	6.308	13.160	.2	66.7	
	3/4	5	3.820	4.235	.3	9.1	
	Total	37	5.473	10.835	.2	66.7	

Cinsiyete göre ApoE allel dozları, ApoE, A1, B ve lipid parametreleri ortalamaları

Cinsiyete göre ApoE e2,e3,e4 allel dozu, ApoA1, E, B düzeyleri ve lipid parametrelerinin ortalama değerleri arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Genotipe göre ApoE düzeyi ve e2, e3, e4 dozunun karşılaştırılması

Genotipe göre ApoE düzeyinin ve allel dozunun karşılaştırılmasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Allele göre lipid düzeylerinin karşılaştırılması

Allele göre lipid parametrelerinin karşılaştırılmasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Yani e2 alleli taşıyan ve taşımayan hastalar arasında; aynı şekilde e3 ve e4 taşıyan ve taşımayan hastalar arasında serum lipid düzeyleri arasında fark saptanmamıştır.

Allel dozu ile lipid metabolizması parametrelerinin nonparametrik korelasyonu

Her bir allel için farklı birer parametre ile anlamlı düzeye yaklaşan bir korelasyon tespit edilmiştir. Buna göre: allel 2 dozu ile ApoE düzeyi ($p = 0.062$, $r = 0,315$), allel 3 dozu ile VLDL düzeyi ($p = 0,089$, $r = 0,472$). ve allel 4 dozu ile lipoprotein (a) düzeyi ($p =$

0,058, $r = -0.29$) arasında anlamlı düzeye yaklaşan bir ilişki saptanmıştır. Korelasyonlar Ek B'de gösterilmektedir.

ApoE düzeyi ile lipid metabolizması parametrelerinin nonparameterik korelasyonu

ApoE düzeyi ile kolesterol ($p = 0,007$; $r = 0,443$), HDL ($p = 0,009$; $r = 0,430$) ve ApoA1 ($p = 0,003$; $r = 0,482$) düzeyleri arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon saptanmıştır. Korelasyonlar Ek B'de gösterilmektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Yaygın Gelişimsel Bozukluk tanısı alan 41 çocuk ve ergen kişi değerlendirilmiştir: 34'ü erkek (%82,9) ve 7'si kızdır (%17,1); erkek / kız oranı 4,9'dur. Yaş ortalaması 115 ay \pm 35 olarak saptanmış, range 39-185 ay olarak tespit edilmiştir.

Çalışmadaki erkek/kız oranı, sıklıkla 3:1 – 4:1 oranların bildirildiği genel literatür ile (2) ve Taneli ve ark.'nın bildirdiği (11) bir yılda başvuran olguları kapsayan Bursa örnekleme ile uyumludur. Bununla birlikte, Kanner kriterlerine göre tanı konduğunda 13:1 gibi daha yüksek oranların bildirildiği, İskandinav ülkelerinde yapılan çalışmalarda oranların 1,5:1 gibi daha düşük bildirildiği görülmektedir (2).

ApoE genotipi dağılımına göre YGB tanılı 41 kişide en sık saptanan genotip 3/3'dür (%68,3) ve bunu 3/2 (17,1), 3/4 (%12,2) ve 2/4 (%2,4) izlemiştir; ApoE genotipi 2/2 ve 4/4'e rastlanmamıştır. Cinsiyete göre genotip dağılımı incelenmesi için örnek sayısı yeterli değildir. Hasta grubunun genotip dağılımı genel literatür bulguları ile uyumludur (68), ancak çocuk yaş grubu için normlar bildirilmemektedir. Yaygın Gelişimsel Bozukluk ile ilgili olabilecek özgün bir dağılım saptanmamıştır.

Örnekleme grubunun %68,3'ü homozigottur ve hepsi 3/3 genotipindedir. Bu durum, bireylerin yaklaşık %60'mının ApoE3 homozigot olduğunu bildiren genel literatür ile uyumludur (73).

ApoE allel dağılımına göre en sık görülen allel e3'tür (%82,9), bunu e2 (%9,8) ve e4 (%7,3) izlemektedir. Cinsiyete göre ise erkeklerde en sık görülen allel e3'tür (%85,3), bunu e2 (%10,3) ve e4 (%4,4) izlemektedir. Kızlarda ise yine en sık görülen allel e3'tür (%71,4), bunu e2 (%7,1) ve e4 (%21,4) izlemektedir. Cinsiyete göre anlamlı fark yoktur ($p>0,05$), ancak kızlarda e4'ün erkeklere göre fazla oluşu anlamlılık düzeyine yaklaşmaktadır ($p = 0,059$). Hasta grubunun allel frekansı genel literatür ile uyumludur (44), ancak çocuk yaş grubu için normlar bildirilmemektedir. Yaygın Gelişimsel Bozukluk ile ilgili olabilecek özgün bir dağılım saptanmamıştır. Bununla birlikte, kızlarda erkeklere göre e4'ün anlamlı düzeye yakın şekilde fazla görülmesi; YGB'nin genelde erkeklerde daha sık görülmesi (2, 11) ve e4'ün Alzheimer Hastalığı gibi değişik hastalıklarda risk

faktörü oluşturmaları (47, 48, 49, 50-52, 54) nedeniyle, e4'ün YGB için kızlara özgü bir risk faktörü olup olmadığı konusunda ek incelemeleri gerektirmektedir.

Cinsiyete göre ApoE e2,e3,e4 allel dozu, ApoA1, E, B düzeyleri ve lipid parametrelerinin ortalama değerleri arasında fark yoktur ($p>0,05$). Daha önce YGB'de ApoE ile lipid parametrelerini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Genotipe göre ApoE düzeyinin karşılaştırılmasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Daha önce YGB'de genotipe göre ApoE düzeyini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Genel literatürde, allel 2 ile ApoE düzeyi yüksekliği arasında ilişki bildirilmiştir (39); bizim çalışmamızda allel 2 ile ApoE düzeyi korelasyonu anlamlılık düzeyine yaklaşmaktadır ($p = 0.062$, $r = 0,315$).

Genotipe göre ApoA1 ve ApoB düzeyleri ile ApoA1/ApoB oranının karşılaştırılmasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Daha önce YGB'de ApoA1, ApoB ve ApoA1/B oranını inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Tayvan'da 220 sağlıklı gönüllüde ApoA1/ApoB oranının E2>E4>E3 olarak azaldığını (sırasıyla 1,9; 1,5; 1,4; $p = 0.0001$) bildiren bir çalışmada ise çalışmamızın aksine ApoE alleleri ile lipid parametreleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (45).

Her bir allel için farklı birer parametre ile anlamlı düzeye yaklaşan bir korelasyon tespit edilmiştir. Buna göre: yüksek allel 2 dozu ile yüksek ApoE düzeyi ($p = 0.062$, $r = 0,315$), yüksek allel 3 dozu ile yüksek VLDL düzeyi ($p = 0,089$, $r = 0,472$) ve yüksek allel 4 dozu ile düşük lipoprotein (a) düzeyi ($p = 0,058$, $r = -0.29$) ile anlamlı düzeye yaklaşan ilişki tespit edilmiştir. Daha önce YGB'de ApoE alleleri ile lipid parametrelerinin korelasyonunu inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Genel literatürde, allel 2 ile ApoE düzeyi yüksekliği arasında ilişki bildirilmiştir (39); bununla birlikte allel 3'ün VLDL ile ve allel 4'ün lp(a) ile korelasyonu hakkında bir bilgiye rastlanmamıştır.

ApoE düzeyi ile kolesterol düzeyi ($p = 0,007$, $r = 0,443$), HDL düzeyi ($p = 0,009$, $r = 0,430$) ve ApoA1 düzeyi ($p = 0,003$, $r = 0,482$) arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon saptanmıştır. Daha önce YGB'de ApoE düzeyi ile lipid parametrelerinin korelasyonu ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında YGB’de ApoE polimorfizmi, ApoE genotipi dağılımı, ApoE allel bağıl frekansı ve ek olarak ApoE düzeyi ve ApoE polimorfizmi ile serum lipid parameterleri arasındaki ilişki incelenmiştir. YGB’de ApoE polimorfizmi bakımından genel toplumdan farklı bir dağılım saptanmamıştır. Çalışmada kısmen sınırlı sayıda hasta bulunuşu, çalışmaya yalnız hastaların alınması ve aile bireylerinin alınmayışı, Türkiye için ApoE polimorfizminin çocuk dağılım normunun olmayışı çalışmanın kısıtlılıkları arasında sayılabilir. İleriki çalışmalarda 0-18 yaş çocuk-ergen grubunda ApoE polimorfizminin bağıl frekansı toplumda belirlenebilir, hasta sayısı arttırılabilir, çalışmaya aile bireyleri eklenebilir. İzleyen çalışmalarda, özellikle kızlarda allel e4’ün Yaygın Gelişimsel Bozukluk riskini arttırıp arttırmadığının incelenmesi ve YGB hastaların ApoE polimorfizmine göre gelişim / tedavi yanıtı açısından prospektif takibi yararlı olabilir.

EKLER

EK A: Olgu Sonuçları I



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G-810	U-102	K-378	E-5	E-799	Z-417	M-6	E-300	B-772	E-9	B-8	M-10	A-11	B-785
3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/2	3/4	3/3	3/4	3/3	3/3	3/2	3/3	3/3



15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
S-583	Y-13	S-12	M-797	F-805	Ş-804	K-813	B-800	E-807	İ-15	S-809	Y-14	M-17	S-811
3/3	3/3	3/2	3/2	3/3	3/3	3/3	3/2	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

EK A: Olgu Sonuçları II



29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
A-16	Ü-18	U-19	B-783	A-465	M-382	M-242	K-443	H-205	O-238	G-206	S-303	H-198	B-733
3/3	3/2	3/3	3/4	3/3	3/4	3/3	3/3	3/4	3/2	2/4	3/2	3/3	3/3



Kontrol													
---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

EK B: Allel dozu ve ApoE düzeyi ile lipid parametrelerinin non-parametrik korelasyonları

Correlations

		Allel 2 frekansı (dozu)	allel 3 frekansı (dozu)	allel 4 frekansı (dozu)	apoA1 /apoB1 (mg/dL)	kolesterol mg/dL	HDL kolesterol mg/dL	trigliserid mg/dL	VLDL mg/dL	LDL kolesterol mg/dL	apo E mg/dL	Apo A1 mg/dL	Apo B1 mg/dL	lipoprotein (a) mg/dL	alfa-1 % lipoprotein	pre-beta % lipoprotein	beta % lipoprotein	glukoz mg/dL	insulin mikrolU/ml	
Spearman's rho	Allel 2 frekansı (dozu)	1.000																		
	Correlation Coefficient		-.735**	-.030	.036	.164	.086	.115	-.325	.108	.315	.042	.039	.251	.009	.014	-.023	.169	-.068	
	Sig. (2-tailed)		.000	.854	.821	.306	.593	.476	.258	.713	.062	.796	.808	.114	.958	.930	.889	.290	.691	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
allel 3 frekansı (dozu)	Correlation Coefficient	-.735**	1.000	-.630**	-.013	-.167	-.165	-.094	.472	-.275	-.138	-.055	-.069	-.039	-.113	.052	.050	-.232	.056	
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.935	.296	.303	.559	.089	.342	.423	.730	.670	.806	.489	.751	.757	.145	.743	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
allel 4 frekansı (dozu)	Correlation Coefficient	-.030	-.630**	1.000	-.058	.041	.076	.070	-.310	.310	-.177	-.003	.079	-.299	.133	-.006	-.124	.178	.076	
	Sig. (2-tailed)	.854	.000		.717	.800	.637	.663	.280	.281	.302	.986	.624	.058	.412	.970	.445	.265	.657	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
apoA1 /apoB1 (mg/dL)	Correlation Coefficient	.036	-.013	-.058	1.000	-.311*	.435**	-.439**	-.059	-.398	.048	.369*	-.692**	-.233	.585**	-.375*	-.253	-.104	-.304	
	Sig. (2-tailed)	.821	.935	.717		.047	.005	.004	.840	.159	.780	.018	.000	.142	.000	.017	.115	.516	.068	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
kolesterol mg/dL	Correlation Coefficient	.164	-.167	.041	-.311*	1.000	.556**	.262	-.054	.687**	.443**	.610**	.815**	.243	-.152	-.064	.226	.163	-.037	
	Sig. (2-tailed)	.306	.296	.800	.047		.000	.098	.854	.007	.007	.000	.000	.126	.348	.693	.160	.309	.830	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
HDL kolesterol mg/dL	Correlation Coefficient	.086	-.165	.076	.435**	.556**	1.000	-.259	-.085	.323	.430**	.762**	.153	-.063	.322*	-.434**	.111	-.031	-.336*	
	Sig. (2-tailed)	.593	.303	.637	.005	.000		.102	.772	.261	.009	.000	.340	.698	.043	.005	.497	.847	.042	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
trigliserid mg/dL	Correlation Coefficient	.115	-.094	.070	-.439**	.262	-.259	1.000	1.000**	-.341	.149	-.032	.322*	.172	-.505**	.635**	-.136	.243	.345*	
	Sig. (2-tailed)	.476	.559	.663	.004	.098	.102			.232	.385	.843	.040	.283	.001	.000	.403	.126	.036	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
VLDL mg/dL	Correlation Coefficient	-.325	.472	-.310	-.059	-.054	-.085	1.000**	1.000	-.341	-.031	-.044	-.098	.238	-.469	.716**	-.623*	.054	.635*	
	Sig. (2-tailed)	.258	.089	.280	.840	.854	.772			.232	.917	.881	.738	.412	.106	.006	.023	.854	.026	
	N	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	14	12	
LDL kolesterol mg/dL	Correlation Coefficient	-.108	-.275	-.310	-.398	.687**	.323	-.341	-.341	1.000	.154	.152	.727**	.088	.316	-.346	.490	.330	-.021	
	Sig. (2-tailed)	.713	.342	.281	.159	.007	.261	.232	.232		.598	.605	.003	.764	.292	.247	.089	.249	.948	
	N	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13	13	13	14	12	
apo E mg/dL	Correlation Coefficient	.315	-.138	-.177	.048	.443**	.430**	.149	-.031	.154	1.000	.482**	.189	.193	-.093	.147	.009	.266	-.245	
	Sig. (2-tailed)	.062	.423	.302	.780	.007	.009	.385	.917	.598		.003	.269	.259	.596	.401	.957	.117	.177	
	N	36	36	36	36	36	36	36	14	14	36	36	36	36	35	35	35	36	32	
Apo A1 mg/dL	Correlation Coefficient	.042	-.055	-.003	.369*	.610**	.762**	-.032	-.044	.152	.482**	1.000	.306	-.002	.127	-.225	.127	.005	-.425**	
	Sig. (2-tailed)	.796	.730	.986	.018	.000	.000	.843	.881	.605	.003		.051	.989	.435	.162	.436	.975	.009	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
Apo B1 mg/dL	Correlation Coefficient	.039	-.069	.079	-.692**	.815**	.153	.322*	-.098	.727**	.189	.306	1.000	.258	-.346*	.099	.273	.109	.067	
	Sig. (2-tailed)	.808	.670	.624	.000	.000	.340	.040	.738	.003	.269	.051		.103	.029	.542	.088	.499	.693	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
lipoprotein (a) mg/dL	Correlation Coefficient	.251	-.039	-.299	-.233	.243	-.063	.172	.238	.088	.193	-.002	.258	1.000	-.249	.136	.100	-.220	-.187	
	Sig. (2-tailed)	.114	.806	.058	.142	.126	.698	.412	.764	.259	.989	.103	.121		.121	.404	.538	.168	.268	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
alfa-1 % lipoprotein	Correlation Coefficient	-.009	-.113	.133	.585**	-.152	.322*	-.505**	-.469	-.316	-.093	.127	-.346*	-.249	1.000	-.602**	-.482**	.094	-.073	
	Sig. (2-tailed)	.958	.489	.412	.000	.348	.043	.001	.106	.292	.596	.435	.029	.121		.000	.002	.564	.674	
	N	40	40	40	40	40	40	40	13	13	35	40	40	40	40	40	40	40	36	
pre-beta % lipoprotein	Correlation Coefficient	.014	.052	-.006	-.375*	-.064	-.434**	.635**	.716**	-.346	.147	-.225	.099	.136	-.602**	1.000	-.359*	.024	.222	
	Sig. (2-tailed)	.930	.751	.970	.017	.693	.005	.000	.006	.247	.401	.162	.542	.404	.000		.023	.885	.194	
	N	40	40	40	40	40	40	40	13	13	35	40	40	40	40	40	40	40	36	
beta % lipoprotein	Correlation Coefficient	-.023	.050	-.124	-.253	.226	.111	-.136	-.623*	.490	.009	.127	.273	.100	-.482**	-.359*	1.000	-.074	-.202	
	Sig. (2-tailed)	.889	.757	.445	.115	.160	.497	.403	.023	.089	.957	.436	.088	.538	.002	.023		.648	.238	
	N	40	40	40	40	40	40	40	13	13	35	40	40	40	40	40	40	40	36	
glukoz mg/dL	Correlation Coefficient	.169	-.232	.178	-.104	.163	-.031	.243	.054	.330	.266	.005	.109	-.220	.094	.024	-.074	1.000	.582**	
	Sig. (2-tailed)	.290	.145	.265	.516	.309	.847	.126	.854	.249	.117	.975	.499	.168	.564	.885	.648		.000	
	N	41	41	41	41	41	41	41	14	14	36	41	41	41	40	40	40	41	37	
insulin mikrolU/ml	Correlation Coefficient	-.068	.056	.076	-.304	-.037	-.336*	.345*	.635*	-.021	-.245	-.425**	.067	-.187	-.073	.222	-.202	.582**	1.000	
	Sig. (2-tailed)	.691	.743	.657	.068	.830	.042	.036	.026	.948	.177	.009	.693	.268	.674	.194	.238	.000		
	N	37	37	37	37	37	37	37	12	12	32	37	37	37	36	36	36	37	37	

** Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the .05 level (2-tailed).

KAYNAKLAR

1. YÖRÜKOĞLU A. Değişik yönleriyle erken çocukluk otizmi, Editör: KERİMOĞLU E. Otizm, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1993.
2. GILLBERG C, COLEMAN M. The Biology of Autistic Syndromes, 3rd edition, Cambridge University Press - Mac Keith Press, London, 2000.
3. LAUDER M. An autistic child. Editor: Wing JK. Early childhood autism: Clinical, educational and social aspects, Pergamon Press Ltd., Exeter, page 299-307, 1966.
4. IMGSAC (International Molecular Genetic Study Group of Autism Consortium). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. Human Molecular Genetics, 7: 571-578, 1998.
5. PHILIPPE A, MARTINEZ M, GUILLOUD-BATAILLE M, GILLBERG C, RASTAM M, SPONHEIM E, COLEMAN M, ZAPPELLA M, ACHAUER H, VAN MALLDERGERME L, PENET C, FEINGOLD J, BRICE A, LEBOYER M. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Human Molecular Genetics, 8: 805-812, 1999.
6. Devlet Bakanlığı. Özürlülük ölçütü, sınıflandırması ve özürlülere verilecek sağlık kurulu raporları hakkında yönetmelik. Resmi Gazete: 16 Temmuz, 2006.
7. WHO; World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines. WHO, Geneva, page 252-259, 1992.
8. APA; American Psychiatric Association (2000). Quick reference to the diagnostic criteria from DSM-IV-TR Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV) Text Revision. (DSM-IV-TR Tanı Ölçütleri Başvuru Elkitabı, Yeniden gözden geçirilmiş baskı). Çeviren: KÖROĞLU E, Hekimler Yayın Birliği, Ankara, sayfa 50-55, 2001.
9. SCHULTE-MARKWORT M, MARUTT K, RIEDESSER P. Cross-walks : ICD-10 – DSM-IV-TR : A synopsis of classifications of mental disorders, Hogrefe & Huber Publishers, Göttingen, 2003.
10. HU-LINCE D, CRAIG DW, HUENTELMAN MJ, STEPHAN DA. The Autism Genome Project: goals and strategies. Am J Pharmacogenomics, 5(4): 233-246, 2005.
11. TANELİ Y, BAYRAK A, HASTÜRK O, RÜZGAR H, TANELİ S. Bir yıl içinde başvuran otizm öntanılı bir grup çocuğun tanı ve psikososyal açıdan değerlendirilmesi. Özet Kitapçığı. Gelişimsel Nöropsikiyatri Toplantıları - 1: Otizm Sempozyumu (29.Eylül - 01.Ekim 2003) İstanbul, Artı Organizasyon, sayfa 53, 2003.
12. REMSCHMIDT H, SCHMIDT M, POUSTKA F. Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO, 4th edition, Verlag Hans Huber, Bern, page 21-32, 2001.
13. REMSCHMIDT H SM, POUSTKA F. Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO, 4th edition, Verlag Hans Huber, Bern, page 21-32, 2001.
14. BLANZ B, REMSCHMIDT H, SCHMIDT MH, WARNKE A. Psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter: Ein entwicklungs-psychopathologisches Lehrbuch, Schattauer GmbH, Stuttgart, page 65-131, 2006.
15. GILLBERG C. Clinical Child Neuropsychiatry, Cambridge University Press, Cambridge, 2003.

16. STEFFENBURG S. Neuropsychiatric assessment of children with autism: a population-based study. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 33: 495-511, 1991.
17. REMSCHMIDT H. Autismus, Editörler: HERPERTZ-DAHLMANN B, RESCH F, SCHULTE-MARKWORT M, WARNKE A. *Entwicklungspsychiatrie - Biopsychologische Grundlagen und die Entwicklung psychischer Störungen*, Schattauer, Stuttgart, page 373-396, 2003.
18. MEHLER-WEX C, SEIFERT J. Autistische Störung, Editörler: GERLACH M, WARNKE A, WEWETZER C. *Neuro-Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter; Grundlagen und Therapie*, Springer Verlag, Wien, page 229-235, 2004.
19. KUSCH M, PETERMANN F. Tiefgreifende Entwicklungsstörungen, Editör: PETERMANN F. *Lehrbuch der Klinischen Kinderpsychologie und -psychotherapie*, 5th revised edition, Hogrefe, Göttingen, page 431-452, 2002.
20. WEGNER M. *Entwicklungsgenetik*, Editörler: HERPERTZ-DAHLMANN B, RESCH F, SCHULTE-MARKWORT M, WARNKE A. *Entwicklungspsychiatrie – Biopsychologische Grundlagen und die Entwicklung psychischer Störungen*, Schattauer, Stuttgart, 14-20, 2003.
21. SCHROER RJ, PHELAN MC, MICHAELIS RC, CRAWFORD EC, SKINNER SA, CUCCARO M, SIMENSEN RJ, BISHOP J, SKINNER C, FENDER D, STEVENSON RE. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *American Journal of Human Genetics*. 76: 327-336, 1998.
22. BARRETT S, BECK JC, BERNIER R, BISSON E, BRAUN TA, CASAVANT TL, CHILDRESS D, FOLSTEIN SE, GARCIA M, GARDINER MB, GILMAN S, HAINES JL, HOPKINS K, LANDA R, MEYER NH, MULLANE JA, NISHIMURA DY, PALMER P, PIVEN J, PURDY J, SANTANGELO SL, SEARBY C, SHEFFIELD V, SINGLETON J, SLAGER S, STRUCHEN T. An autosomal genomic screen for autism. *American Journal of Medical Genetics*, 88: 609-615, 1999.
23. Genetics Workgroup. Report of the National Institute of Mental Health's Genetics Workgroup. *Biol Psychiatry*, 45: 559-602, 1999.
24. LORD C, COOK EH, LEVENTHAL BL, AMARAL DG. Autism spectrum disorders. *Neuron*, 28: 355-363, 2000.
25. NURMI EL, DOWD M, TADEVOSYAN-LEYFER O, HAINES JL, FOLSTEIN SE, SUTCLIFFE JS. Exploratory subsetting of autism families based on savant skills improves evidence of genetic linkage to 15q11-q13. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 42(7): 856-863, 2003.
26. BARTLETT CW, FLAX JF, LOGUE MW, SMITH BJ, VIELAND VJ, TALLAL P, BRZUSTOWICS LM. Examination of potential overlap in autism and language loci on chromosomes 2, 7, and 13 in two independent samples ascertained for specific language impairment. *Hum Hered*, 57(1): 10-20, 2004.
27. POLLEUX F, LAUDER JM. Toward a developmental neurology of autism. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 10: 303-317, 2004.
28. CHEN GK, KONO N, GESCHWIND DH, CANTOR RM. Quantitative trait locus analysis of nonverbal communication in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 11(2): 214-220, 2006.
29. REMSCHMIDT H. Die Bedeutung von Entwicklungsprozessen für die Manifestation psychischer Störungen, Editörler: HERPERTZ-DAHLMANN B, RESCH F, SCHULTE-MARKWORT M, WARNKE A. *Entwicklungspsychiatrie -*

- Biopsychologische Grundlagen und die Entwicklung psychischer Störungen, Schattauer, Stuttgart, page 221-233, 2003.
30. BARTLETT CW, GHARANI N, MILLONIG JH, BRZUSTOWICS LM. Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J dev Neurosci*, 23(2-3): 221-234, 2005.
 31. BUXBAUM JD, SILVERMAN J, KEDDACHE M, SMITH CJ, HOLLANDER E, RAMOZ N, REICHERT JG. Linkage analysis for autism in a subset families with obsessive-compulsive behaviors: evidence for an autism susceptibility gene on chromosome 1 and further support for susceptibility genes on chromosome 6 and 19. *Mol Psychiatry*, 9(2): 144-150, 2004.
 32. LIU J, NYHOLT DR, MAGNUSSEN P, PARANO E, PAVONE P, GESCHWIND D, LORD C, IVERSEN P, HOH J, THE AUTISM GENETIC RESOURCE EXCHANGE CONSORTIUM, OTT J, GILLIAM TC. A Genomewide Screen for Autism Susceptibility Loci. *Am J. Hum. Genet.*, 69: 327-340, 2001.
 33. ANNEREN G, DAHL N, UDDENFELDT U, JANOLS LO. Asperger syndrome in a boy with a balanced de novo translocation: t(17;19) (p13.3;p11). *Am J Med Genet*, 56(3): 330-331, 1995.
 34. MCCAULEY JL, LI C, JIANG L, OLSON LM, CROCKETT G, GAINER K, FOLSTEIN SE, HAINES JL, SUTCLIFFE JS. Genome-wide and Ordered-Subset linkage analyses provide support for autism loci on 17q and 19p with evidence of phenotypic and interlocus genetic correlates. *BMC Medical Genetics*, 6: 1, 2005.
 35. D'ADAMO P, BACCHELLI E, BLASI F, LIPP H-P, TONIOLO D, MAESTRINI E, THE INTERNATIONAL MOLECULAR GENETIC STUDY OF AUTISM CONSORTIUM (IMGSAC). DNA variants in the human *RAB3A* gene are not associated with autism. *Genes, Brain and Behavior*, 3: 123-124, 2004.
 36. BECHER JC, BELL JE, MCINTOSH N, KEELING JW. Distribution of apolipoprotein E alleles in a Scottish healthy newborn population. *Biol Neonate*, 88(3): 164-7, 2005.
 37. PAYAMI H, ZHU M, MONTIMURRO J, KEEFE R, MCCULLOCH CC, MOSES L. One step closer to fixing association studies: evidence for age-and gender-specific allele frequency variations and deviations from Hardy-Weinberg expectations in controls. *Human Genetics*, 118(3): 322-330, 2005.
 38. PANZA F, SOLFRIZZI V, TORRES F, MASTROIANNI F, DEL PARIGI A, COLACICCO AM, BASILE AM, CAPURSO C, NOYA R, CAPURSO A. Decreased frequency of apolipoprotein E epsilon4 allele from Northern to Southern Europe in Alzheimer's disease patients and centenarians. *Neurosci Lett*, 277(1): 53-6, 1999.
 39. LIBEROPOULOS E, MILTIADOUS G, HATZIVASSILIOU M, AYRTON N, BAIRAKTARI E, CARIOLOU M, ELISAF M. Apolipoprotein E polymorphism in northwestern Greece: frequency and effect on lipid parameters. *Ann Clin Lab Sci*, 34(3): 347-354, 2004.
 40. WRIGHT RO, HU H, SILVERMAN EK, TSAIH SW, SCHWARTZ J, BELLINGER D, PALAZUELOS E, WEISS ST, HERNANDEZ-AVILA M. Apolipoprotein E genotype predicts 24-month bayley scales infant development score. *Pediatr Res*, 54(6): 819-825, 2003.
 41. BOYLES JK, ZOELLNER CD, ANDERSON LJ, KOSIK LM, PITAS RE, WEISBERGER KH, HUI DY, MAHLEY RW, GEBICKE-HAERTER PJ, IGNATIUS MJ. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-1, and low density lipoprotein receptors, in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve *J Clin Invest*: 1015-1031, 1989.

42. DUMAN BS, OZTURK M, YILMAZER S, HATEMI H. Apolipoprotein E polymorphism in Turkish subjects with Type 2 diabetes mellitus: allele frequency and relation to serum lipid concentrations. *Diabetes Nutr Metab*, 17(5): 267-274, 2004.
43. SHIN MH, KIM HN, CUI LH, KWEON SS, PARK KS, HEO H, NAM HS, JEONG SK, CHUNG EK, CHOI JS. The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *J Korean Med Sci*, 20(3): 361-366, 2005.
44. LETONJA M, GUZIC-SALOBIR B, PETERLIN B, PETROVIC D. Apolipoprotein E gene polymorphism effects triglycerides but not CAD risk in Caucasian women younger than 65 years. *Ann Genet*, 47(2): 147-53, 2004.
45. LIN SK, KAO JT, TSAI SM, TSAI LY, LIN MN, LAI CJ, ZHONG WL. Association of apolipoprotein E genotypes with serum lipid profiles in a healthy population of Taiwan. *Ann Clin Lab Sci*, 34(4): 443-8, 2004.
46. AL-SHAMMARI S, FATANIA H, AL-RADWAN R, AKANJI AO. Apolipoprotein E polymorphism and lipoprotein levels in a Gulf Arab population in Kuwait: a pilot study. *Ann Saudi Med*, 24(5): 361-4, 2004.
47. PARASURAMAN R, GREENWOOD PM, SUNDERLAND T. The Apolipoprotein E Gene, Attention, and Brain Function. *Neuropsychology*, 16(2): 254-274, 2002.
48. LAHIRI DK, SAMBAMURTI K, BENNETT DA. Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25(5): 651-660, 2004.
49. KAMPMAN O, ANTTILA S, ILLI A, MATTILA KM, RONTU R, LEINONEN E, LEHTIMÄKI T. Apolipoprotein E polymorphism is associated with age of onset in schizophrenia. *Journal of Human Genetics*, 49(7): 355-359, 2004.
50. ARIZA M, PUEYO R, MATARIN MD, JUNQUE C, MATARO M, CLEMENTE I, MORAL P, POCA MA, GARNACHO A, SAHUQUILLO J. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006.
51. KIESLICH M. Einfluss des Apolipoprotein E-Polymorphismus auf das Outcome nach Schaedel-Hirnverletzungen im Kindesalter. *Neuropaediatric in Klinik und Praxis*, 4: 138-142, 2003.
52. TEASDALE GM, MURRAY GD, NICOLL JA. The association between APOE epsilon4, age and outcome after head injury: a prospective cohort study. *Brain*, 128(Pt 11): 2556-61, 2005.
53. HALFORD J, MAZEIKA G, SLIFER S, SPEER M, SAUNDERS AM, STRITTMATTER WJ, MORGENLANDER JC. APOE2 allele increased in tardive dyskinesia. *Mov Disord*, 21(4): 540-542, 2006.
54. CAMPALANI E, ALLEN MH, FAIRHURST D, YOUNG HS, MENDONCA CO, BURDEN AD, GRIFFITHS CE, CROOK MA, BARKER JN, SMITH CH. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *Br J Dermatol*, 154(2): 345-352, 2006.
55. MABUCHI F, TANG S, ANDO D, YAMAKITA M, WANG J, KASHIWAGI K, YAMAGATA Z, IJIMA H, TSUKAHARA S. The apolipoprotein E gene polymorphism is associated with open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis*, 11: 609-612, 2005.
56. PERSICO AM, D'AGRUMA L, ZELANTE L, MILITERNI R, BRAVACCIO C, SCHNEIDER C, MELMED R, TRILLO S, MONTECCHI F, ELIA M, PALERMO M, RABINOWITZ D, PASCUCCI T, PUGLISI-ALLEGRA S, REICHELTL KL,

- MUSCARELLA L, GUARNIERI V, MELGARI JM, CONCIATORI M, KELLER F. Enhanced APOE2 transmission rates in families with autistic probands. *Psychiatr Genet*, 14(2): 73-82, 2004.
57. RAIFORD KL, SHAO Y, ALLEN IC, MARTIN ER, MENOLD MM, WRIGHT HH, ABRAMSON RK, WORLEY G, DELONG GR, VANCE JM. Brief Research Communication: No Association Between the APOE Gene and Autism. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 125: 57-60, 2004.
58. TROMMSDORFF M, GOTTHARDT M, HIESBERGER T, SHELTON J, STOCKINGER W, NIMPF J, HAMMER RE, RICHARDSON JA, HERZ J. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 97(6): 689-701, 1999.
59. D'ARCANGELO G, HOMAYOUNI R, KESHVARA L, RICE DS, SHELDON M, CURRAN T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*, 24(2): 471-9, 1999.
60. FATEMI SH, SNOW AV, STARY JM, ARAGHI-NIKNAM M, REUTIMAN TJ, LEE S, BROOKS AI, PEARCE DA. Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry*, 57(7): 777-87, 2005.
61. FATEMI SH, STARY JM, HALT AR, REALMUTO GR. Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord*, 31(6): 529-35, 2001.
62. KOCH S, STRASSER V, HAUSER C, FASCHING D, BRANDES C, BAJARI TM, SCHNEIDER WJ, NIMPF J. A secreted soluble form of ApoE receptor 2 acts as a dominant-negative receptor and inhibits Reelin signaling. *Embo J*, 21(22): 5996-6004, 2002.
63. DANFORS T, VON KNORRING AL, HARTVIG P, LANGSTROM B, MOULDER R, STROMBERG B, TORSTENSON R, WESTER U, WATANABE Y, EEG-OLOFSSON O. Tetrahydrobiopterin in the treatment of children with autistic disorder: a double-blind placebo-controlled crossover study. *J Clin Psychopharmacol*, 25(5): 485-489, 2005.
64. D'USCIO LV, KATUSIC ZS. Increased vascular biosynthesis of tetrahydrobiopterin in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(6): H2466-2471, 2006.
65. SHATTOCK P. Autism: Possible clues to the underlying pathology – 2. A parent view, Editör: WING L. *Aspects of Autism: Biological Research*, The Royal College of Psychiatrists, London, page: 11-18, 1988.
66. BLACK C, KAYE JA, JICK H. Relation of childhood gastrointestinal disorders in autism: nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *British Medical Journal*, 325: 419-421, 2002.
67. KÖSELER A. Apolipoprotein E ve Sitokrom P450 gen polimorfizmlerinin araştırılması: Moleküler genetik yöntem kurulması ve geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Danışman: İsmail H. Ulus), 2003.
68. MAHLEY R, PALAOĞLU K, ATAK Z, DAWSON-PEPIN J, LANGLOIS A, CHEUNG V, ONAT H, FULKS P, MAHLEY L, VAKAR F. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 36: 839-859, 1995.
69. AYBEK H, ASLAN D, ERCAN F, ŞAHİNER T. Association of apolipoprotein E genotype with late onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *FEBS Journal*, 273(Suppl.1): page 239, 2006.

70. TURIC D, FISHER PJ, PLOMIN R, OWEN MJ. No association between apolipoprotein E polymorphisms and general cognitive ability in children. *Neuroscience Letters*, 299: 97-100, 2001.
71. KONTULA K, AALTO-SETALA K, KUUSI T, HAMALAINEN L, SYVANEN A. Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing *Clinical Chemistry*, 36: 2087-2092, 1990.
72. MONTGOMERY R, CONWAY TW, SPECTOR AA, CHAPPELL D. *Biochemistry: A Case-Oriented Approach; Sixth Edition (Biyokimya: Olgu Sunumlu Yaklaşım; Altıncı Baskıdan Çeviri)*, Çeviren: ALTAN N, Palme Yayıncılık, Ankara, sayfa 356-389, 2000.
73. MAHLEY RW. Aterogenezin hücrel ve moleküler biyolojisi: Kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması, Editörler: GÖKDEMİR O, PALAOĞLU KE. Merck Sharp ve Dohme İlaçları A.Ş., İstanbul, 1993.
74. KLUG WS, CUMMINGS MR. DNA Klonlarının Oluşturulması ve İncelenmesi, *Concepts of Genetics; 6th edition (Genetik Kavramlar; Altıncı Baskıdan Çeviri)*, Çeviren: ÖNER C, Palme Yayıncılık, Ankara, sayfa 499-529, 2002.
75. GenID. Apolipoprotein E and B, Risk alleles for Alzheimer's disease, familial hyperlipoproteinaemia and arteriosclerosis, reverse hybridization kit., GenID GmbH, Sraasberg, page 15, 2003.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım sırasında başından sonuna kadar bana her yönden yol gösterici olan ve destekleyen, bilgi ve tecrübe birikimine çok saygı duyduğum Tez Danışmanım Uludağ Üniversitesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus'a; temel farmakoloji ve klinik farmakoloji konularında eğitimime büyük katkıları olan, aynı Anabilim Dalının öğretim üyeleri Prof. Dr. Burhan Kıran, Prof. Dr. Levent Büyükuysal, Prof. Dr. Vahide Savcı ve Prof. Dr. M. Sibel Gürün'e; her zaman desteğini hissettiğim doktora ders hocam Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet Kan'a; ayrıca Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Kasım Özlük'e;

Tez çalışmalarım sırasında teorik ve pratik konularda katkıda bulunan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yeşim İlçöl'e, biyolog Derya Sucu'ya ve baş teknisyen Mete Erden'e; tez çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr. A. Güven Kılıçoğlu ile Dr. M. Erdem Uzun'a ve tüm hastalarım ve ailelerine;

Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı ile Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma;

Tıp eğitimim sırasında farmakolojiyi tanıtan ve sevdiren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Sezen Koşay ve Prof. Dr. Işık Tuğlular'a;

Her zaman yanımda olan, yaşama ve mesleğe anlam katan aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Yrd. Doç. Dr. Yeşim Taneli, 29.07.1965 tarihinde İzmir’de doğmuş, ilköğrenimini Göttingen’de (Almanya) Wilhelm-Henneberg-Schule’de, ortaöğrenimini yine Göttingen’de Max-Planck-Gymnasium’da ve Bursa Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 1983-1989 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde yüksek öğrenim görmüş ve Psikiyatri Anabilim Dalından aldığı ‘Sağlıklı Deneklerde Hemisfer Dominansının Araştırılması’ konulu diploma tezini vererek Aralık 1989’da ‘Tıp Doktoru’ olarak mezun olmuştur. Ardından Bursa Tabip Odasından Bahar 1990 döneminde ‘İşyeri Hekimi’ sertifikası almıştır.

Eylül 1990’da Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalında doktora başlamış, Mart-Temmuz 1991 arasında Avrupa Topluluğu ‘Konferans Tercümanı Eğitimi’ bursu nedeniyle ara vermiş, Ağustos 1991’den itibaren devam ettiği Farmakoloji doktorasından, DAAD bursuyla Würzburg Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Kliniğinde Alzheimer Hastalığı konusunda Almanya’da çalışmak üzere Mart 1992’de ayrılmıştır. Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitiminden sonra Eylül 2000’den bu yana halen Farmakoloji doktorasına devam etmektedir.

Almanya’da Nisan 1992-Eylül 2000 arasında DAAD bursu ve Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimi çerçevesinde Würzburg Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Kliniğinde ve aynı kliniğin Nörokimya Laboratuvarında (Dir.: Prof .Dr. P. Riederer); ardından Westfalya Eyaleti Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Hastanesi / Marl; Düsseldorf Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Merkezi; Klinikum am Europakanal Psikiyatri Kliniği / Erlangen ve Erlangen Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Kliniği’nde çalışmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Yeşim Taneli, Eylül 2000’de Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olmuş, Mart 2001’de itibaren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda göreve başlamıştır. Aralık 2002’de Yardımcı Doçent ünvanını almıştır ve Şubat 2006’dan bu yana aynı Anabilim Dalı’nın başkanlığını yürütmektedir.

Yrd. Doç. Dr. Yeşim Taneli, Almanca, İngilizce ve Fransızca bilmektedir.