

Türk Kökenli Futbolcularda Apolipoprotein-E Genotiplerinin Belirlenmesi

Determination of Apolipoprotein-E Genotypes in Turkish Society

Başak Funda EKEN* 

Hazal GEZMİŐ** 

Yasemin ÜK*** 

Alper ERDOĞDU**** 

Canan Sercan DOĞAN***** 

Deniz KIRAÇ***** 

Korkut ULUCAN***** 

Öz

Apolipoprotein molekülleri, metabolizmamız için öneminin yanı sıra bazı hastalıklar içinde önemli biyolojik biyo-belirteçlerdendir. Özellikle Apolipoprotein E (ApoE) bu konuda en fazla çalışılan moleküllerin başında gelmektedir. Literatür incelemesi yaptığımızda serum ApoE seviyeleri ile spor ve egzersiz arasında ilişki kurulmuş, ancak bu proteini kodlayan APOE geni ile ilgili kısıtlı çalışma olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda, sporcuların nörobilişsel ve atletik performans üzerine etkisi olduğu düşünülen ve *ApoE* genindeki $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ varyantlarının Türk futbolcularda dağılımlarını belirlemeyi amaçladık. Çalışmamıza aktif futbol oynayan 18-24 yaş arası 22 profesyonel Türk kökenli futbolcu katıldı. Gerekli etik kurul izinleri alındıktan sonra çalışma protokolunu, sonuç ve çıktılarını anlatan onam formları imzalatıldıktan sonra sporculardan DNA izolasyonu gerçekleştirildi. ApoE genotipleme gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) metodu ile gerçekleştirilerek sporculardaki genotip dağılımları belirlendi. Bu dağılımların belirlenmesinde *APOE* rs429358 ve rs7412 polimorfizmlerin oluşturduğu haplo gruplar değerlendirilmiştir. Kohortumuzda *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi diğer genotiplere göre daha baskın olarak

* Doktora Öğrencisi, Marmara Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, basak.funda@marun.edu.tr

** Doktora Öğrencisi, Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü, hazalgezmis@gmail.com

*** Yüksek Lisans Öğrencisi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, yaseminuk@iyte.edu.tr

**** İstanbul Başakşehir Futbol Kulübü, Futbol Okulları Koordinatörü, alperibfk@gmail.com

***** Doktora Öğrencisi, Üsküdar Üniversitesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Tam Laboratuvarı, canan.sercan@uskudar.edu.tr

***** Doç. Dr., Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü, dyat@yeditepe.edu.tr

***** Doç. Dr., Marmara Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, korkut.ulucan@marmara.edu.tr

bulunmuştur. 1 sporcuda $\epsilon 2/\epsilon 3$ (%4.5), 1 sporcuda $\epsilon 2/\epsilon 4$ (%4.5), 13 sporcuda $\epsilon 3/\epsilon 3$ (%59) ve 7 sporcunun $\epsilon 3/\epsilon 4$ (%32) genotipinde olduğu saptanmıştır. Futbolcularda $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerine rastlanmamıştır. Kohortumuzda en yaygın allel olan $\epsilon 3$ ve $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi diğer allel ve genotiplere göre daha baskın olduğu görülmüştür. Çalışma grubumuzda $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotiplerine hiç rastlanmamıştır. Çalışma grubumuzdan elde edilen sonuçlara göre $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipinin futbolcularda daha baskın olmasının futbol biyolojisi ile ilişkili olabileceği sonucuna varmamızı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: ApoE, polimorfizm, futbol, genetik, spor genetiği

Abstract

In addition to its importance for human metabolism, apolipoprotein molecules are one of the most important biological biomarkers in certain diseases. Apolipoprotein E (ApoE) is one of the most widely studied molecules in this field. When we examined the literature, we found a relationship between serum ApoE levels and sports and exercise, but there was limited study of the APOE gene that encodes this protein. In this study, we aimed to determine the distribution of $\epsilon 2 / \epsilon 3 / \epsilon 4$ variants in the APOE gene in Turkish soccer players, which is thought to have an effect on athletic and neurocognitive performances. Twenty-two professional Turkish footballers between 18-24 years of age, still playing active football participated in the study. After obtaining the necessary ethics committee permissions, consent forms explaining the study protocol, results and outputs were signed and DNA isolation was performed from the athletes. APOE genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) method to determine genotype distributions in athletes. In determining these distributions, haplo groups formed by APOE rs429358 and rs7412 polymorphisms were evaluated. In our cohort, the APOE $\epsilon 3/ \epsilon 3$ genotype was found to be more dominant than the other genotypes. One player had $\epsilon 2/ \epsilon 3$ (4.5%), one had $\epsilon 2/ \epsilon 4$ (4.5%), 13 had $\epsilon 3/ \epsilon 3$ (59%) and 7 had $\epsilon 3/ \epsilon 4$ (32%) genotypes. No $\epsilon 2/ \epsilon 2$ and $\epsilon 4/ \epsilon 4$ genotypes were found in football players. The most common allele $\epsilon 3$ and $\epsilon 3/ \epsilon 3$ genotype was more dominant than other alleles and genotypes. In our study group, we detected no $\epsilon 2/ \epsilon 2$ and $\epsilon 4/ \epsilon 4$ genotypes. According to the results, the predominance of $\epsilon 3/ \epsilon 3$ genotype in footballers may be related to football biology.

Keywords: ApoE, polymorphism, football, genetic, spor genetics

GİRİŞ

Spor genetiği, atletik performansın oluşmasına ve sporcuların herhangi bir spor dalında başarılı olmalarına etki eden genetik faktörleri inceleyen bir disiplindir. Sporcuların antrenman ve müsabakaları sırasındaki mental ve fiziksel performanslarının toplamı sporcuların atletik performansı olarak kabul edilmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla sporcularda düzenli olarak yapılan antrenman ile geliştirilebilen atletik performansının hem oluşmasında, hem de gelişmesinde etkili olan mental ve genetik faktörlerin etkisi ortaya konmuştur (Ulucan, 2014). Psikolojik performansımıza etki eden stres, kaygı, agresyon gibi parametreler bireyin günlük yaşantısını etkilediği gibi, sporcuların müsabakalarda başarılı-başarısız olmasını da etkilemektedir. Bu sebeple sportif performansa etki eden genlerin ve serotonenerjik, dopaminenerjik ve androjenik sistemlerin işleyişine bağlı olduğu düşünülen stres, duygusal kontrol, rekabet ve saldırganlık direnci gibi psikolojik faktörlere etki eden genlerin belirlenmesinin sporcuların atletik performansının düzenlenmesine katkıda bulunabileceği yapılan çalışmalarla belirtilmektedir (Çorak ve diğ., 2017; Eken ve diğ., 2018).

Apolipoprotein E (ApoE), 34 kilo dalton ağırlığında, 299 amino asitten oluşan LDL reseptörleri için ligand görevi veren ve merkezi sinir sisteminde glial hücreler tarafından üretilen bir plazma proteindir. Senil plaklarda, vasküler amiloid (b-amiloid), nörofibriler yumak içerisinde ve yüksek yoğunluklu

olan benzer lipoproteinlerde bulunmaktadır. APOE, amiloid beta peptidine bağlanarak düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesinin üyelerinden farklı olan reseptörlerle etkileşime girmektedir. Bu reseptörlerle etkileşimi sonucu olarakta vücudun çeşitli hücrelerinde kolesterol ve yağda çözünen vitaminlerin transportunda görev almaktadır (Mahley ve Huang,1999). ApoE proteinin plazma lipid metabolizmasındaki rolünün yanı sıra günümüzde nöronal fonksiyon üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu da belirtilmektedir (Hauser ve diğ., 2011). *APOE* geni bu fonksiyonundan dolayı nöronların korunması ve onarımında önemli rol oynamaktadır. ApoE izoformları, beynin solunum kontrol merkezindeki nörofibriler yumaklara ve plaklara yol açan b-amiloid ve tau proteinlerine bağlanarak uyku esnasında da ventilasyon stabilitesi üzerinde potansiyel etkisinden dolayı sporcu dinlenmesine etki edebileceği belirtilmiştir. *ApoE* geni 19. kromozomda (19q13.2) lokalizedir. *ApoE* proteinin $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, sporcuların nörobilişsel, bilişsel performans üzerine etkisi olduğu düşünülen ve lipid metabolizmasına etki ettiği belirtilen *ApoE* genindeki $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ varyatlarının dağılımının belirlenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza profesyonel, aktif olarak düzenli futbol oynayan 22 Türk kökenli futbolcu katılmıştır. Futbolcuların antrenman programı haftada en az 4 gün (90-120 dk) ve bir maç olarak bildirilmiştir. Çalışmamız ve çalışma protokolümüz, Helsinki Deklarasyonu-2 (2015) yönergelerine uygun olarak hazırlanmış ve Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu tarafından onanmıştır. Çalışmaya gönüllü olarak katılan sporculara, çalışma öncesi yapılan analizler ve çıktıları hakkında detaylı bilgi verilerek, kendilerinden imzalı onam formu alınmıştır.

APOE Genotiplemesi

DNA İzolasyonu: Çalışmamıza gönüllü olarak katılan sporculardan DNA toplama çubukları yardımıyla ağız içi epitel hücreleri toplanmış, sonrasında PureLink DNA izolasyon kiti (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad,CA, USA) kullanılarak DNA izolasyonu tamamlanmıştır. Kısaca, 200 µL elde edilen DNA izolasyonu üzerine, 20 µL proteinaz K, 10µL RNAaz eklenerek vortekslendi. 2 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra 200µL bağlanma tamponu eklendi ve karıştırılarak homojen hale getirildi. 55°C su banyosunda 10 dk inkübe edildikten sonra 200 µL etanol ilavesinden sonra 5 sn vortekslendi. Filtreli tübe alındı ve 10000g 'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pellet kısmı üzerine 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 10000g'de 1,15 sn santrifüj edildi ve yine süpernant kısmı alınarak üzerine 2. yıkama tamponu eklendi ve maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi. 80 µL elüsyon tamponu eklenerek inkübe edildi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. İlgili gen bölgelerinin analizlerinin tamamlanmasına kadar, elde edilen DNA örnekleri – 20° C de saklanmıştır.

APOE genindeki $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ varyatlarının belirlenmesi

ApoE genindeki $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ varyatlarının belirlenmesi işlemi rs429358 ve rs7412 genotipleme yapılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). *APOE* genindeki rs429358 ve rs7412 polimorfizmleri izole edilen DNA materyalinden “7500 Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) cihazı ile Taqman Genotyping Assays (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) genotipleme kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Totalde 10uL olacak şekilde 5 μ L master mix, 3,75 μ L H₂O, 0,25 μ L assay ve 1 μ L (10 ng) DNA kullanılarak genotipleme işlemi tamamlanmıştır.

Tablo 1: APOE genotiplemesinde kullanılan polimorfizmler ve varyantların belirlenmesi

<i>ApoE</i> allel	rs429358	rs7412
$\epsilon 2 / \epsilon 2$	TT	TT
$\epsilon 2 / \epsilon 3$	TT	TC
$\epsilon 2 / \epsilon 4$	TC	TC
$\epsilon 3 / \epsilon 3$	TT	CC
$\epsilon 3 / \epsilon 4$	TC	CC
$\epsilon 4 / \epsilon 4$	CC	CC

BULGULAR

Kohortumuzda APOE $\epsilon 3 / \epsilon 3$ genotipi diğer genotiplere göre daha baskın olarak bulunmuştur. 1 sporcuda $\epsilon 2 / \epsilon 3$ (%4,5), 1 sporcu $\epsilon 2 / \epsilon 4$ (%4,5), 13 sporcu $\epsilon 3 / \epsilon 3$ (%59) ve 7 sporcuda $\epsilon 3 / \epsilon 4$ (%32) genotipinde olduğu saptanmıştır. Çalışma grubumuza dahil olan futbolcularda $\epsilon 2 / \epsilon 2$ ve $\epsilon 4 / \epsilon 4$ genotiplerine rastlanmamıştır. Genotip sonuçları ve yüzdeleri tablo 2’ de özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: APOE genotiplerinin futbolculardaki dağılımı

Genotip	<i>ApoE</i> varyantları					
	$\epsilon 2 / \epsilon 2$	$\epsilon 2 / \epsilon 3$	$\epsilon 2 / \epsilon 4$	$\epsilon 3 / \epsilon 3$	$\epsilon 3 / \epsilon 4$	$\epsilon 4 / \epsilon 4$
Sayı	-	1	1	13	7	-
Yüzde	-	(%4,5)	(%4,5)	(%59)	(%32)	-

TARTIŞMA

APOE genotipinin travmatik beyin yaralanmaları (TBI) riski üzerine ile ilgili ilişkisi daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiş ve oluşan hasarın meydana getireceği klinik sonuçlara genetik verilerin etkisi belirlenmiştir. Özellikle müsabaka ve antrenman sırasında çarpışma veya kafaya alınabilecek darbelerle oluşan beyin sarsıntısı spor bilimciler ve klinisyenler için ayrı bir önem taşımaktadır. Sarsıntı sonrası oluşabilecek beyin hasarlarının nörolojik açıdan etkisinin şiddetinin belirlenmesinde *APOE* genotipi önemli bir biyobelirteçtir. *APOE* genotiplerinin sarsıntı riski

üzerine olan etkisinin incelenmesi halen yapılan çalışmalarla devam etmektedir. Bu etkilere yol açan moleküler mekanizmalar halen net olmamakla beraber büyük ilerlemeler gerçekteşirilmifitir.

Çalışmamıza katılan futbolcularda *APOE* rs429358 ve rs7412 polimorfizmleri ile belirlenen *APOE* genotipleri belirlenmiştir. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi diğer genotiplere kıyasla daha baskın olarak saptanmış, $\epsilon 2/\epsilon 2$ ve $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipleri ise çalışma grubumuzda saptanmamıştır.

Beyin sarsıntısı, kafaya iletilen biyomekanik kuvvetler nedeniyle nörolojik fonksiyondaki değişiklikleri ifade etmektedir. *APOE* $\epsilon 4$ alleli beyin hasarı şiddeti ile ilişkilidir (Abrahams ve ark., 2018). Jordan ve diğer., (1997) gerçekteştirdikleri çalışmalarında kronik beyin hasarı geçirmifitir boksörlerde *APOE* genotiplemesi analiz etmiş, yüksek kafa travmasına maruz kalan $\epsilon 4$ alleli taşıyan boksörlerin beyin hasarlarının daha fazla olduğunu bildirmifitirlerdir. 318 sporcu ile yapılan başka bir çalışmada ise, *APOE* $\epsilon 4$ alleli ile beyin sarsıntısı sonrası klinik hasar arasında önemli bir ilişki bulunmadığı bildirilmifitir (Kristman ve diğer., 2008). Abrahams ve ark., (2018) rugby oyuncuları üzerinde gerçekteştirdikleri çalışmalarında *APOE* rs405509, rs429358 ve rs7412 polimorfizmlerini beyin sarsıntısı geçirmifitir ve geçirmemifitir sporcularda karşılaştırmış. Ancak genotip ve allel bakımından yüzdesel farklılıklar olmasına rağmen istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlı fark saptanmamışlardır.

Tierney ve diğer., (2010) 196 futbolcu üzerinde gerçekteştirdikleri çalışmada beyin sarsıntısı sonrası oluşan bilişsel bozukluklar ile *APOE* genotipleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadığını belirtmifitirlerdir.

Üniversite sporcuları ile yapılan bir başka çalışmada ise *APOE* geninin $\epsilon 4$ alleli ile spor sırasında yaşanan beyin sarsıntısının ardından nörokognitif özelliklerin ilişkisi karşılaştırılmış, $\epsilon 4$ alleli taşıyanların alleli taşımayanlara göre nörobilişsel açıdan daha fazla değişiklik gösterdiği belirtilmifitir (Merritt ve diğer.,2018). Profesyonel futbolcuların bilişsel durumlarının, yaş ve *APOE* genotipinin bir fonksiyonu olarak değişip değişmediğini anlamaya yönelik gerçekteştirilen bir çalışmada $\epsilon 4$ alleli taşıyan sporcuların taşımayan sporculara göre nörokognitif testlerde daha zayıf performans gösterdiği tespit edilmiştir (Kutner ve diğer., 2000).

APOE ve atletik performans ilişkisini değerlendiren çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Özellikle Türk sporcularda *APOE* genotip dağılımının belirlendiği çalışmalara tarafımızca rastlanmamıştır. Çalışmamızın en büyük kısıtlılığı örnek sayısının azlığı ve biyokimyasal olarak serum ApoE miktarlarının ölçülememifitir olmasıdır. Aynı takım sporcuların aynı tip antrenman programını uygulamasının öneminden dolayı sporcu sayısı sadece bir futbol takımı ile kısıtlanmıştır.

Çalışmamızın, yapılan literatür araştırmaları sonucunda, *ApoE* polimorfizmleri ile ilgili olan ve Türk sporcularının dahil olduğu çalışmaların kısıtlılığı göz önüne alındığında bundan sonra gerçekteştirilecek çalışmalar için önemli bir veri kaynağı olacağı düşünceindeyiz.

KAYNAKLAR

Abrahams S, Mc Fie S, Patricios J, Suter J, Posthumus M, September AV.(2018). An association between polymorphisms within the *APOE* gene and concussion aetiology in rugby union players. *J Sci Med Sport*, 21(2),117-122.

- Çorak, A., Kapıcı, S, Sercan, C, Akkoç, O, Ulucan, K. (2017) A pilot study for determination of anxiety related SLC6A4 promoter “S” and “L” alleles in healthy Turkish athletes. *Cellular and Molecular Biology*, 63(5), 29-31.
- Eken, B.F., Akpınaroğlu, C., Arslan, K.S., Sercan, C., Ulucan, K. (2018). Genlerin Sporda Psikolojik Faktörlerle İlişkisi, *The Journal of neurobehavioral sciences*, 1 (5), 56-61
- Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. (2011). Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.*, 50(1):62-74.
- Jordan B.D., Relkin N.R., Ravdin L.D, Jacobs A.R., Bennett A, Gandy S.(1997). Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA*, 278(2),136–140.
- Kristman VL, Tator CH, Kreiger N, et al. (2008). Does the apolipoprotein epsilon 4 allele predispose varsity athletes to concussion? A prospective cohort study. *Clin. J. Sport Med.*, 18(4),322–328.
- Kutner KC, Erlanger DM, Tsai J, Jordan B, Relkin NR. (2000). Lower cognitive performance of older football players possessing apolipoprotein E epsilon4. *Neurosurgery*, 47(3),651-657.
- Mahley, R.W., Huang, Y. (1999).Apolipoprotein E: From Atherosclerosis to Alzheimer Disease and Beyond, *Current Opinion in Lipidology*, 10(3), 207-217.
- Merritt VC, Rabinowitz AR, Arnett PA.(2018). The Influence of the Apolipoprotein E (APOE) Gene on Subacute Post-Concussion Neurocognitive Performance in College Athletes. *Arch Clin Neuropsychol*.33(1),36-46.
- Tierney RT, Mansell JL, Higgins M, McDevitt JK, Toone N, Gaughan JP, Mishra A, Krynetskiy E. . (2010). Apolipoprotein E genotype and concussion in college athletes. *Clin. J. Sport Med*, 20(6),464–468.
- Ulucan, K., Yalçın, S., Akbaş, B., Konuk, M. (2014). Analysis of Solute Carrier Family 6 Member 4 Gene promoter polymorphism in young Turkish basketball players. *The Journal of Neurobehavioral Sciences*, 1, 37-40.