

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİPERTROFİK KARDİYOMİYOPATİLİ HASTALARDA
HOP (HOMEODOMAIN ONLY PROTEİN) GEN
MUTASYONLARININ ANALİZİ**

TIB. BİO. ÇAĞRI GÜLEÇ

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

GENETİK ANABİLİM DALI / GENETİK ORTAK PROGRAMI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

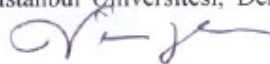

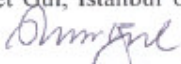
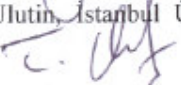

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik Ortak Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Genetik
Tez Sahibi : Çağrı Güleç
Tez Başlığı : Hipertrofik Kardiyomyopati Hastalarda HOP (Homeodomain Only Protein) Gen Mutasyonlarının Analizi
Sınav Yeri : İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)
Sınav Tarihi : 07 / 07 / 2006

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof. Dr. Nihan Erginel-Ünaltuna, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Genetik Anabilim Dalı 
- 2.Prof. Dr. Uğur Özbek, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Genetik Anabilim Dalı 
- 3.Prof. Dr. Ahmet Gül, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı 
- 4.Prof. Dr. Turgut Ulutin, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 
- 5.Doç. Dr. Kıvanç Çefle, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çağrı Güleç

İmza



ANNEME VE BABAMA

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Müdürü
Sayın Prof. Dr. Mehmet Kaya'ya,

Tez çalışmam sırasında verdiği bilgi ve destek için danışman hocam
Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel-Ünaltuna'ya,

Tezim için olgu sağlayan Doç. Dr. Bülent Mutlu ve Yrd. Doç. Dr. Fatih
Bayrak'a, DNA bankasını ve hasta bilgilerini benimle paylaşan Uzm. Tıbbi Biyolog A.
Evrin Bayrak'a,

İstatistik analizlerdeki yardımından dolayı Uzm. Dr. Günay Can'a,

Bu çalışmada bana fikir ve destek veren dostlarım Dr. G. Cumhuriyet G. Ekmekçi,
Dr. Fahri Akbaş ve Dr. Neslihan Abacı'ya,

ve aileme

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hox Genleri ve Homeodomeyn	3
2.2. <i>HOP</i> (Homeodomain Only Protein) Geni.....	3
2.2.1. <i>HOP</i> Geninin Yapısı ve Ürünleri.....	4
2.2.2 <i>HOP</i> Geninin İfadesi.....	7
2.2.3 <i>HOP</i> Geninin Görevleri.....	8
2.3 <i>HOP</i> Geni ve Kanser.....	10
2.4 <i>HOP</i> Geni ve Kalp.....	12
2.5. Kardiyak Hipertrofi.....	15
2.5.1. Kardiyak Hipertrofide Moleküler Mekanizmalar	16
2.5.2. Kardiyak Hipertrofide Önemli Transkripsiyon Faktörleri.....	21
2.5.3. Kardiyak Hipertrofide <i>HOP</i>	24
2.6 Kardiyomiyopatiler	26
2.6.1 Hipertrofik Kardiyomiyopatiler (HKM)	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Hasta Grubu	31

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu.....	31
3.1.3. Enzimler.....	31
3.1.4. Primerler	31
3.1.5. Kimyasal Maddeler	32
3.1.6. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.1.7. DNA İzolasyon Çözeltileri	34
3.1.8. Elektroforez Çözeltileri	35
3.2. Yöntemler	38
3.2.1. Yöntem Bilgisi	38
3.2.2 Periferik Kandan DNA İzolasyonu	39
3.2.3. DNA'nın Miktar ve Saflığının Ölçümü.....	40
3.2.4. PZR.....	41
3.2.5. SSCP.....	43
3.2.6. İstatistik Analizler	44
4. BULGULAR.....	45
4.1 Hasta Verileri.....	45
4.2 PZR Sonuçları.....	46
4.3 SSCP ve Dizileme Sonuçları	47
5. TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	57
ETİK KURUL KARARI	74
FORMLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Gelişen farede Hop ifadesinin görüldüğü doku ve organlar	7
Tablo 2-2: <i>Hop</i> ^{-/-} farelerde gözlenen kalp ile ilgili dört grup fenotip.....	13
Tablo 3-1: Kullanılan primerler	31
Tablo 3-2 : Üç bölge için kullanılan SSCP koşulları.....	43
Tablo 4-1: Hasta grubuna ait bazı klinik verilerin ve cinsiyetin dağılımı	45
Tablo 4-2: 8 bazlık D/I genotiplerinin iki grup arasındaki karşılaştırılması.....	50
Tablo 4-3: 8 bazlık D/I genotiplerinin bazı hasta verileri ile karşılaştırılması	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>HOP</i> geninin genomik yapısı, transkriptleri ve protein ürünü.....	4
Şekil 2-2: Hop'un Pax6 ile karşılaştırmalı ve üç boyutlu yapısı.....	5
Şekil 2-3 : <i>HOP</i> 'un DNA'ya bağlanmasını engelleyen aminoasit farklılıkları	6
Şekil 2-4 : Kalpte ve nöral tüpteki <i>Hop</i> ifadesinin in situ hibridizasyon görünümü.....	8
Şekil 2-5 : Hop mutant farelerde hiperplazik kalp büyümesi	12
Şekil 2-6 : Hop mutant farelerde hipertrofik kalp büyümesi	13
Şekil 2-7 : Kalp gelişiminin trabekülasyon aşamasında Hop	15
Şekil 2-8 : Kalp iş yükündeki artışa bağlı gelişen iki kardiyak hipertrofi tipi.....	18
Şekil 2-9 : Kardiyak hipertrofinin oluşmasındaki bazı basamaklar	20
Şekil 2-10: Kardiyak hipertrofide önemli dört transkripsiyon faktörünün kontrolü	23
Şekil 2-11: Hipertrofik yanıtta <i>HOP</i> 'un yeri.....	24
Şekil 2-12: Hop'un, SRF'ye bağlı gen ifadesini düzenleme mekanizması..	25
Şekil 2-13: Doğum öncesi ve sonrası kalp büyümesinde Hop.....	25
Şekil 4-1: <i>HOP</i> geni PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	46
Şekil 4-2: <i>HOP</i> geni 1. ekzonuna ait SSCP jel görüntüsü.....	47
Şekil 4-3: <i>HOP</i> geni 4. ekzonuna ait SSCP jel görüntüsü	48
Şekil 4-5: 8 bazlık D/I polimorfizminin poliakrilamid jeldeki görünümü.....	49
Şekil 4-6: <i>HOP</i> geni 5. ekzonuna ait SSCP jel görüntüsü	51
Şekil 5-1: Hop mutant farelerde ifadesi artan genler.....	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ANP (ve BNP): Atriyel (ve Beyin) Natriüretik Peptidi

CaMK : Kalsiyum-Kalmodulinle Düzenlenen Protein Kinaz

GATA : GATA (Guanine-Adenine-Timine-Adenine) Transkripsiyon Faktörü

GSK 3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*

HAT :Histon Asetil Transferaz

HDAC : Histon Deasetilaz (*Histon Deacetylase*)

HOP (Hop) : İnsan (Fare) Homeodomain Only Protein geni

NFAT : *Nuclear Factor of Activated T-cell*

MAPK : Mitojenle Uyarılan Protein Kinaz (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

MCIP: *Modulatory Calcineurin-Interacting Protein*

MEF : Miyosit Arttırıcı Faktör (*Myocyte Enhancer Factor*)

MRTF : *Myocardin-Related Transcription Factor*

NECC1 : *Not Expressed in Choriocarcinoma Clone 1*

SRF : Serum Yanıt Faktörü (*Serum Response Factor*)

TCF : Üçlü Kompleks Faktörü (*Tertiary Complex Factor*)

Not: Aynı kısaltmalardan italik yazılanlar geni (ör. *HOP*), normal yazılanlar (ör. HOP) proteini tanımlar.

ÖZET

Güleç, Ç. Hipertrofik Kardiyomiyopatili Hastalarda *HOP* (Homeodomain Only Protein) Gen Mutasyonlarının Analizi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2006 .

HOP, yakın zamanda tanımlanmış ve, doğum öncesi ve sonrasında kalp büyümesini kontrol ettiği gösterilmiş olan bir gen dir. Çalışmamızın amacı, *HOP* geninin hipertrofik kardiyomiyopatideki olası modifiye edici rolünün anlaşılmasıdır.

Klinik heterojenite HKM(hipertrofik kardiyomiyopati)'de karşılaşılan önemli sorunlardan biridir. HKM'deki klinik heterojenitenin; çevresel faktörler, hastalığa neden olan mutant gen ve modifiye edici genlerin etkileşimi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. *HOP*'ta yapısal değişikliğe neden olan mutasyonların, *HOP*'un kardiyak hipertrofikdeki işlevini, dolayısıyla kardiyak hipertrofi ilişkili hastalıkların fenotipini etkileyeceğini varsaydık. Bu nedenle HKM tanısı almış 50 hastada *HOP* geninin, protein kodlayan dizilerini de içeren üç ekzonunu PZR-SSCP yöntemleri ile inceledik. Protein yapısını değiştirecek özellikte herhangi bir mutasyon bulunmadı. Genin 4. ekzonunu içeren bölgede daha önce tanımlanmış olan intron yerleşimli iki polimorfizm bulundu. Bu polimorfizmlerden biri tek nükleotid değişimi, diğeri 8 bazlık delesyon-insersiyon değişimiydi. Poliakrilamid jelde, örneklerin 8 bazlık delesyon-insersiyon (D-I) polimorfizmi yönünden genotiplemesi yapıldı. Hasta grubunda (n=50) 13 kişinin (%26) D/D, 15 kişinin (%30) I/I ve 22 kişinin (%44) D/I genotipine sahip olduğu, kontrol grubunda (n=100) ise 30 kişinin (%30) D/D, 24 kişinin (%24) I/I ve 46 kişinin (%46) D/I genotipine sahip olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark göstermeyen genotip sonuçları, hastalara ait bazı klinik verilerle karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Bu sonuçlar, *HOP*'un modifiye edici rolünü açıklamak için daha duyarlı yöntemler ve daha geniş hasta grubu ile çalışılması gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : *HOP*, SRF, kardiyak hipertrofi, kardiyomiyopati

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-533/21102004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

ABSTRACT

Gulec C. Analysis of HOP Gene Mutations in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Thesis of Master. İstanbul. 2006.

HOP is a gene described recently and shown to control prenatal and postnatal heart growth. The aim of our study was to understand the possible modifying role of *HOP* gene in hypertrophic cardiomyopathy.

Clinical heterogeneity in HCM (Hypertrophic Cardiomyopathy) is thought to be result of interaction between environmental factors, disease causing gene and modifying genes. We hypothesed that mutations which cause structural changes in HOP, might effect the function of HOP in cardiac hypertrophy, thus phenotype of cardiac hypertrophy related diseases. We, therefore, analysed three exons, including protein coding sequences, of *HOP* gene by PCR-SSCP techniques in 50 patients diagnosed with HCM. We have not found any mutation which could change primer structure of the protein. Within the region which includes 4th exon of the gene, we have found two intronic variations defined before. One of those variations is single nucleotide polymorphism (SNP), and the other is deletion-insertion polymorphism (8-bp-DIP). Samples was genotyped by polyacrilamid gel for 8-bp-DIP variation. It has been seen that, 13 samples (%26) from patient group (n=50) have D/D, 15 samples (%30) have I/I and 22 samples (%44) have D/I genotype, and 30 samples (%30) from control group (n=100) have D/D, 24 samples (%24) have I/I and 46 samples (%46) have D/I genotype. Genotyping results, which are not significantly different between patient and control groups, were compared with some patient data. Statistically, there couldn't been found any correlation. Those results indicate that further study with more sensitive techniques and wider patient group is requered to elucidate modifying role of *HOP* gene.

Key Words: HOP, SRF, Cardiac Hypertrophy, Cardiomyopathy

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-533/21102004

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp hastalıklarına bağlı ölümler, dünya genelinde önlenmesi hedeflenen sağlık sorunlarının başında yer almaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerin önemli bir sorunu olan kalp ölümlerinden, genellikle koroner arter tıkanmalarına bağlı miyokard enfarktüsü sorumludur. Koroner hastalıklar dışında kalp yetmezliği, hipertansif kalp hastalıkları ve kardiyomiyopatiler gibi kalbin birincil ya da ikincil hastalıkları da kalp ölümlerinin başta gelen nedenleri arasındadır. Bu üç hastalık grubunun en önemli ortak bileşeni kardiyak hipertrofidir. Kardiyak hipertrofi, kalp iş yükünde artışa ya da kalp işlevinde azalmaya neden olan herhangi bir fizyolojik ya da patolojik durum karşısında devreye giren bir uyum mekanizmasıdır. Kısa dönemde faydalı olan kardiyak hipertrofinin uzun sürmesi durumunda, kalp işlevinde belirgin bir azalma ortaya çıkar. Kalp işlevindeki bu azalma da genellikle kalp yetmezliği ya da kardiyomiyopati ile sonuçlanır.

Kardiyak hipertrofinin moleküler temellerinin anlaşılması ve fizyolojik hipertrofi ile patolojik hipertrofi arasındaki farklılıkların tanımlanması, kardiyak hipertrofi temelli kalp hastalıklarının tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler sağlayacaktır. Hipertrofik yanıtta farklılıklara neden olan genetik polimorfizmlerinin belirlenmesi de bu amaca yönelik çalışmaların başlangıcını oluşturmaktadır. Kardiyak hipertrofi konusunda yapılan çalışmalarla; hipertrofik uyarıda, hipertrofik yanıtta ve bu ikisini birleştiren ara basamaklarda görev alan çok sayıda molekül tanımlanmıştır. Hipertrofik yanıtın kontrolünde önemli işlevleri olduğu anlaşılan moleküllerin başında GATA-4, MEF2C, NFAT ve SRF gibi transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Bu moleküllerden SRF, gelişim sırasında iskelet kası, kalp kası ve düz kas hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasını kontrol eder. Doğum sonrasında bölünme yeteneğini kaybeden erişkin kalp kası hücrelerinde ise SRF, hipertrofik yanıtın düzenlenmesinde görev almaya başlar.

HOP, kalp kasındaki SRF'ye bağlı gen ifadesini baskılayarak kalp gelişimini ve büyümesini düzenleyen bir molekül olarak tanımlanmıştır. SRF'nin kardiyak hipertrofideki düzenleyici rolü düşünüldüğünde, *HOP*'un kardiyak hipertrofi temelli kalp hastalıkları için modifiye edici gen adayı olabileceğini varsaydık. Bu amaçla, kardiyak hipertrofi geliştirmiş kişiler ile sağlıklı kişilerde *HOP* geninin protein kodlayan bölgeleri PZR ve SSCP yöntemleri ile incelenmiş, protein yapısında

değişikliğe neden olabilecek dizi farklılıkları araştırılmıştır. Kardiyak hipertrofi geliştirmiş hasta grubu olarak, Hipertrofik Kardiyomiyopati (HKM) tanısı almış hastalar seçildi.

HKM, kalbin sarkomerik proteinlerini kodlayan genlerdeki bazı mutasyonların neden olduğu ailevi ya da sporadik bir kalp kası hastalığıdır. HKM, neden olduğu hipertrofinin derecesi, yerleşimi ve ortaya çıkış zamanı, ve bunlara bağlı olarak da klinik bulgu ve gidişatı değişkenlik gösteren bir hastalıktır. Taşıdığı bu klinik heterojenite özelliğinden dolayı HKM'yi, kardiyak hipertrofinin anlaşılması için bir model hastalık olarak kabul ettik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hox Genleri ve Homeodomeyn

Gelişim biyolojisindeki en önemli ilerlemelerden biri *homeobox (Hox)* gen takımının tanımlanmasıdır. Embriyonel gelişimin temel düzenleyicilerinden olan *Hox* genlerinin ortak ve ayırt edici özelliği *homeobox* dizisidir. İlkel omurgasızlardan gelişmiş omurgalılara kadar evrimsel olarak korunmuş, 183 baz uzunluğundaki bu dizi, ilgili genin ürettiği proteinde (homeoproteinde) 61 aminoasit uzunluğunda “homeodomeyn” isimli bölgeyi kodlar. *Hox* gen ürünü olan protein (homeoprotein), sahip olduğu homeodomeyn bölgesi aracılığıyla DNA’ya bağlanabilmekte ve birçok genin transkripsiyonunu kontrol edebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan *Hox* gen ürünleri DNA’ya monomer, homodimer ya da heterodimer olarak ve diziye özgü bir biçimde bağlanır. Kromozom üzerinde sıralanarak küme oluşturan ve bu kümedeki sıralarına göre embriyonel ekseninde ifade edilen *Hox* genleri dışında, genoma dağılmış başka *homeobox* genler de vardır. Bu genlerin kodladığı proteinlerde genellikle homeodomeyn dışında başka bölgeler de bulunur. Homeodomeyn içeren tüm bu proteinler, homeodomeyn bölgesindeki aminoasit dizi benzerliklerine ve homeodomeyn dışında sahip olduğu diğer (*Paired box*, *LIM*, *Pou* gibi) korunmuş bölgelere göre sınıflandırılır (1, 2).

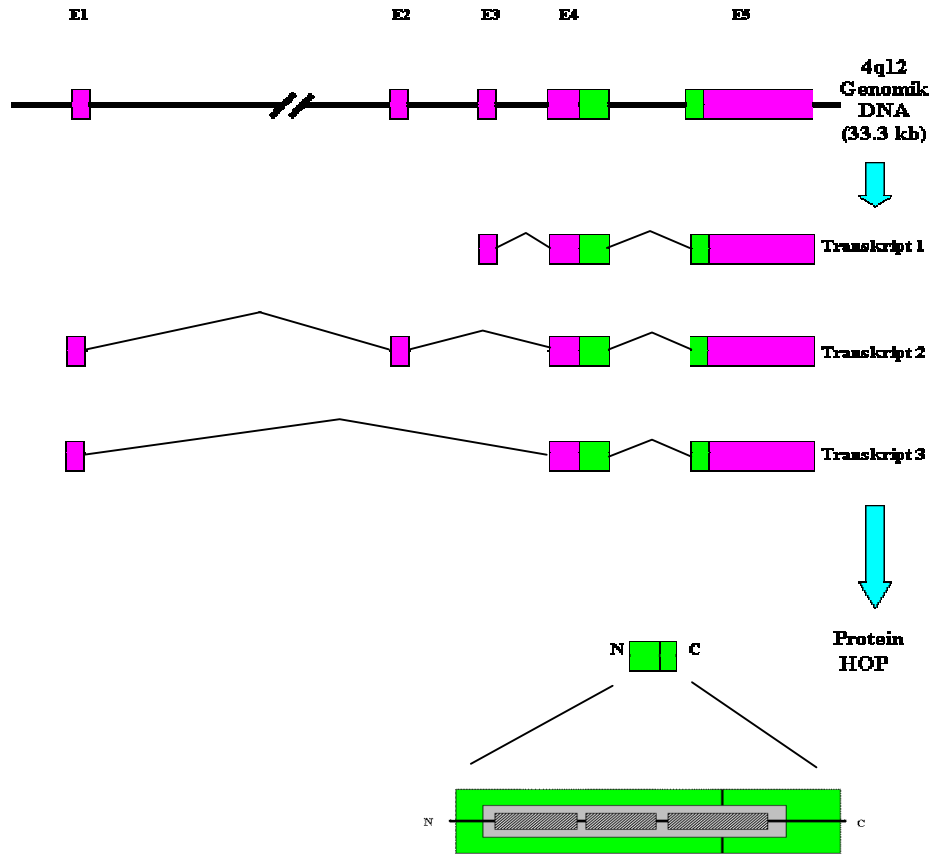
2.2. HOP (Homeodomain Only Protein) Geni

Chen ve arkadaşları, 2002 yılında PAX3 homeodomeynini prob olarak kullanarak farede, yalnız homeodomeyn bölge kodlayan bir gen tanımlamışlar ve bu gene *homeodomain only protein (Hop)* adını vermişlerdir (3). Aynı yıl, bağımsız olarak Shin ve arkadaşları tarafından da klonlanan *Hop*’un insandaki homoloğu (*HOP*), EST veri tabanının taranmasıyla bulunmuştur (4). Daha sonra farklı gruplar tarafından da klonlanan gen *Toto*, *Cameo (Cardiac homeobox)*, *Smad31 (Small protein 31)* ve *Ob1 (Odd homeobox)* gibi farklı biçimlerde adlandırılmıştır (3, 4, 5, 6).

Toto, *Cameo*, *Smad31*, *Ob1* gibi farklı adlarla tanımlanan bu genin en belirgin özelliği, yalnız homeodomeyn içeren çok küçük bir protein kodlamasıdır. Bu özelliğinden dolayı, bilinen en küçük homeodomeyn proteini kodlayan bu gene *Homeodomain Only Protein (HOP)* adı uygun bulunmuştur (3).

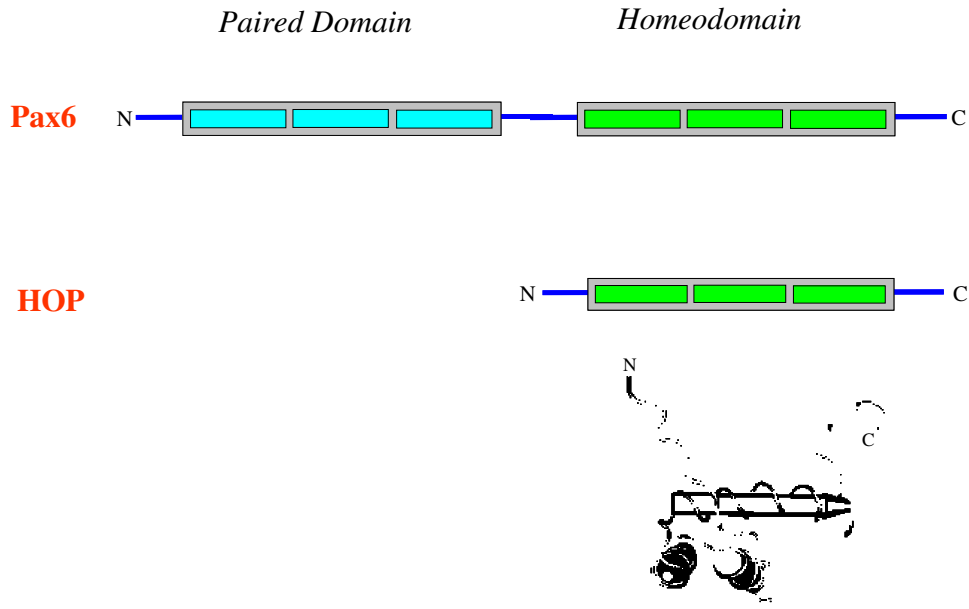
2.2.1. *HOP* Geninin Yapısı ve Ürünleri

HOP, insanda kromozom 4 (4q12) üzerinde bulunan 5 ekzonlu bir gendir. Genom üzerinde yaklaşık 33,3 kilobazlık yer kaplayan genin ekzonlarından üçü alternatif ekzondur (E1, E2 ve E3) ve diğer iki ekzon (E4 ve E5) ile birlikte bilinen üç farklı transkript kodlar. Bu üç transkriptin kodladığı proteinler ise aynıdır (Şekil 2-1). *HOP* geninin protein ürünü 73 aminoasit uzunluğundadır. Fare ve insan dışında sıçan, sığır, domuz, tavuk, bir tür kurbağa (*Xenopus laevis*) ve balıkta (zebra balığı) da bu genin homologları tanımlanmıştır. Şimdiye kadar incelenen (*D. melanogaster*, *C. elegans* gibi) hiçbir omurgasızda homologunun bulunmaması, *HOP* geninin evrimsel olarak geç dönemde ortaya çıkmış, omurgalılara özgü, genç bir gen olduğunu akla getirmektedir (3, 4).



Şekil 2-1- *HOP* geninin genomik yapısı, transkriptleri ve protein ürünü

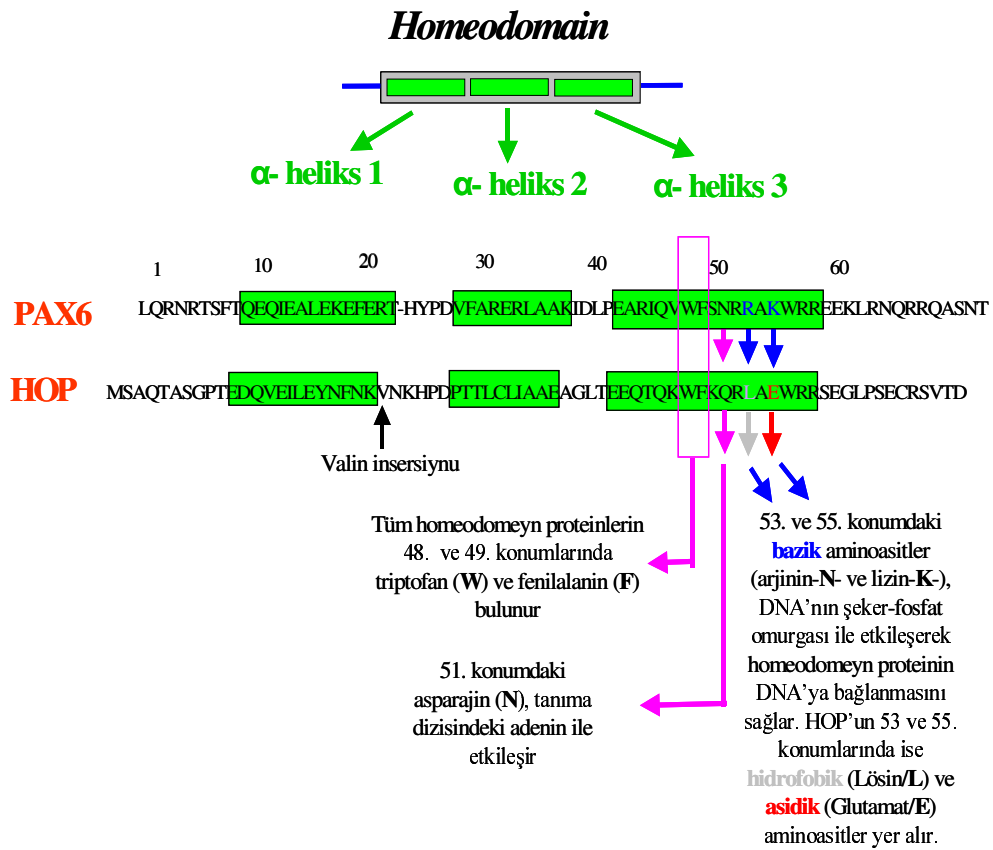
73 aminoasit içeren HOP, 61 aminoasitlik bir homeodomeyn bölgesine sahiptir. Kodladığı proteinin aminoasit dizisine göre *HOP* geni, *paired-tip homeobox* gen grubuna girer ve bu grupta yer alan *gooseoid* ve *Pax6*'nın homeodomeyni ile benzerlik gösterir. Üç alfa heliks yapısı içeren HOP (Şekil 2-2), tanımlanmış en küçük homeodomeyn proteindir (3, 4).



Şekil 2-2 Hop'un Pax6 ile karşılaştırmalı ve üç boyutlu yapısı

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=28757>)

Diğer homeodomeyn proteinlerde bulunan birçok aminoasit HOP'ta korunmuş olduğu halde, homeodomeyn bölgesinin DNA'ya bağlanmasından sorumlu olan aminoasitler korunmamıştır (Şekil 2-3). Bu da, nükleus yerleşimli olmasına rağmen HOP'un doğrudan DNA'ya bağlanma yeteneğine sahip olmadığını göstermektedir. Deneysel veriler de bu görüşü doğrulamaktadır (3, 4).



Şekil 2-3 : HOP'ta bulunan ve DNA'ya bağlanmasını engelleyen önemli aminoasit farklılıkları (Kaynak 4'den düzenlendi)

2.2.2 HOP Geninin İfadesi

Gelişmekte olan farenin ve erişkin farenin birçok dokusunda, kodlama bölgeleri aynı, 5' UTR dizileri farklı olan *Hop* transkriptleri tanımlanmıştır. Aynı proteini kodladığı düşünülen bu transkriptlerin 5' UTR bölgelerindeki dizi farklılıklarının işlevi bilinmemektedir (3,4).

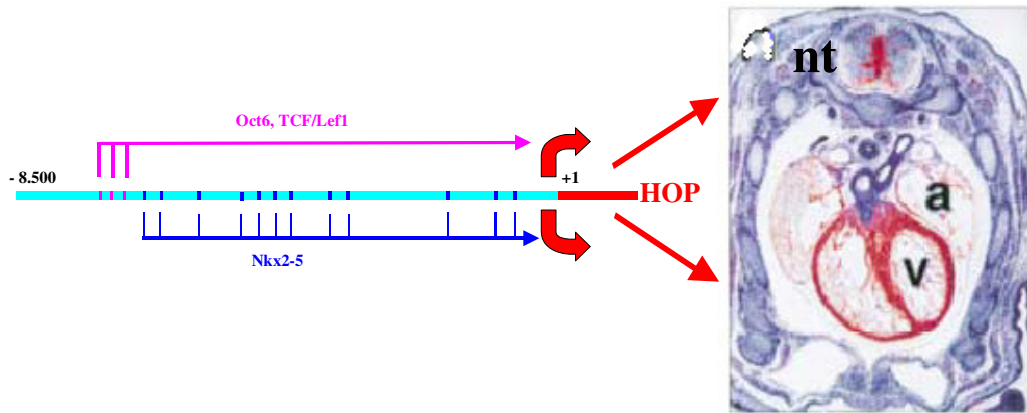
Hop gen ifadesi farede ilk olarak gelişimin 7. gününde (E 7.75), trofoblastlarda ve mezodermin kardiyak alanında (kardiyak mezoderimde) başlar. Gelişimin 8. gününde (E 8.0) doğrusal kalp tüpü boyunca ifade edilen *Hop*, miyokarddaki ifadesini tüm embriyonel gelişim ve erişkin yaşamı boyunca devam ettirir. Endokard, epikard ve büyük damarlarda ifade edilmez. En baskın ve uzun süreli ifade alanı miyokard olan *Hop* geninin transkriptleri kalp dışındaki dokularda da bulunmuştur (Tablo 2-1). Yutak yayları, bağırsak epitel kriptleri, nöral tüpün ve telensefalonun karıncık bölgesi, böbrek glomerülleri, gelişmekte olan meme bezleri ve akciğerin distal hava yolu epitelleri *Hop* transkriptleri bulunan diğer dokulardır. Bu dokularda yaklaşık 1.2 kilobazlık transkriptler bulunmuştur. Fare ve insana ait kalp, beyin, akciğer, bağırsak, uterus, idrar kesesi, düz kas, böbrek ve dalak gibi birçok doku ve organda *Hop* ifadesinin erişkin yaşamda da devam ettiği bilinmektedir (3, 4).

Tablo 2-1 Farede, farklı embriyonel dönemlerde *Hop* ifadesinin görüldüğü doku ve organlar (kaynak 3 ve 4'den düzenlendi)

E7.75:	Ekstraembriyonik membrablardaki trofoblastlarda, kardiyak mezodermin lateral bölgelerinde
E8.0:	Doğrusal kalp tüpünde, baş katlantılarında
E8.5-9.5:	Miyokardda (trabeküler miyokardda daha yaygın olarak), faringeal yaylarda
E12.5 :	Nöral tüpün periventriküler bölgesinde
E13.5:	İntestinal epitelde (düşük düzeyde)
E16.5:	Akciğerin gelişmekte olan havayolu epitelinde, olfaktor epitelde, telensefalonun ventriküler bölgesinde

Genin 5' düzenleyici bölgesi incelendiğinde *Hop* promotorunda 12 tane yüksek afiniteli NKE (Nkx Cevap Elementi-TNNAGTG) dizisi bulunduğu görülmüştür. Bu diziler, *Hop* geninin kalpteki ifadesinin, kalbe özgü bir transkripsiyon faktörü olan Nkx2-5 tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. *Hop* promotorundaki korunmuş NKE dizilerinin varlığı ile birlikte; Nkx 2-5 mutant farelerin kalbinde *Hop* ifadesinin gerçekleşmemesi, kardiyak mezodermde *Hop* ifadesinin Nkx 2-5 ifadesinden hemen sonra başlaması ve daha küçük bir alanda sınırlı kalması gibi veriler de, kalpteki *Hop* ifadesinin Nkx 2-5 tarafından kontrol edildiğini doğrulamaktadır (3, 4).

Hop geninin 7 kb 5' komşuluğundaki yaklaşık 418 bç'lik bir başka bölgenin de, *Hop*'un beyin ve merkezi sinir sistemindeki ifadesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu bölgede TCF/Lef1 ve Oct6 transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizisi bulunmaktadır (7) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4 Kalpte ve nöral tüpteki *Hop* ifadesinin promotor düzeyindeki kontrolü ve *in situ* hibridizasyon ile görünümü. (nt:nöral tüp, a:atrium, v:ventrikül) (*in situ* hibridizasyon görüntüsü kaynak 2'den)

2.2.3 HOP Geninin Görevleri

Düzeyleri farklı olsa da birçok dokuda *HOP* transkriptleri bulunmaktadır. Bu dokulardan akciğer ve plasentada *HOP*'un, hücre bölünmesini kontrol eden, tümör baskılayıcı bir gen olarak çalıştığı gösterilmiştir (6, 8). Merkezi sinir sisteminde, *Hop*'un yaygın ifade edildiği omurilik karıncık bölgesi, beyin kabuğu ve endodermal hücre tabakasının, nöron oluşumunun gerçekleştiği ana bölgeler olması, *Hop*'un hücre

bölünmesi ve/veya farklılaşmasında görev aldığı görüşünü desteklemektedir (7). *Hop*'un en fazla ve kalıcı ifade edildiği doku olan kalp kasında da benzer bir görev aldığı gösterilmiştir (3,4).

DNA'ya doğrudan bağlanamayan, sıradışı bir homeodomeyn protein olarak tanımlanan *Hop*'un, hücre bölünmesi ve farklılaşmasını farklı dokularda nasıl kontrol ettiği henüz açıklanamamıştır. Fakat kardiyomiyositlerde *Hop*'un, SRF'ye bağlı gen ifadesini baskıladığı ve bu yolla, kalp gelişimini düzenlediği anlaşılmıştır (9, 10).

Hop'un işlevinde, doğrudan etkili olduğu anlaşılan iki önemli molekül bilinmektedir:

I- SRF: *Hop*'un fiziksel olarak etkileştiği bilinen tek transkripsiyon faktörüdür. SRF, *MADS (MCMI, Agamous, Deficient, SRF) box* transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. Embriyonel gelişim sırasında düz kas ve kalp kasının farklılaşmasını kontrol eden SRF, DNA'da CArG dizisi ya da SRE (Serum Cevap Elementi) adı verilen bölgelere bağlanır. Promotorunda CArG bulunan, dolayısıyla SRF tarafından etkinleştirilen genler iki farklı hücresel süreçte (hücre bölünmesinde ya da miyosit farklılaşmasında) görev alırlar. Yaygın bir transkripsiyon faktörü olan SRF'nin hangi tip genin promotoruna bağlanacağı diğer transkripsiyon faktörleri ve kofaktörleri tarafından belirlenir. Kalp kası ve düz kas hücrelerinde SRF, bu hücrelere özgü bir transkripsiyon koaktivatörü olan *myocardin* aracılığıyla miyosit farklılaşmasını sağlayan genlerin promotoruna bağlanır (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Kas hücreleri dışındaki hücrelerde ve çoğalmakta olan (mitotik) öncül kas hücrelerinde ise SRF; TCF (veya MRTF) ile birlikte c-fos gibi hücre bölünmesini kontrol eden genlerin promotoruna bağlanır (11, 12, 13, 18, 19, 20).

Hop'un, kalpteki SRF etkinliğini *myocardin*'in SRF'ye bağlanmasını engelleyerek sınırlandırdığı düşünülmektedir (3, 4).

II- HDAC: Transkripsiyon faktörlerinin, transkripsiyonu etkinleştirmeleri ya da baskılamaları genellikle hedef genin promotorundaki kromatin yapısında meydana getirdikleri geri dönüşümlü değişiklikler (modifikasyonlar) ile gerçekleşir. Bu değişikliklerin en önemlisi olan histon asetilasyonu iki çeşit enzimatik etkinlikle kontrol

edilir. Histon asetil transferaz (HAT) etkinliği histon asetilasyonunu katalizleyerek kromatinin gevşemesine ve transkripsiyonun kolaylaşmasına neden olurken histon deasetilaz (HDAC) etkinliği histonları deasetile ederek kromatin yoğunlaşmasına ve transkripsiyonun zorlaşmasına neden olurlar (9, 21).

Birçok transkripsiyon faktörü HAT aktivitesine sahiptir, ya da HAT aktivitesine sahip p300/PCAF gibi molekülleri bağlayabilmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin HAT aktivitesiyle başlattıkları gen ifadesi, HDAC'lerin transkripsiyon kompleksine bağlanmasıyla tekrar baskılanır (21, 22, 23).

Memelilerde HDAC'ler, bira mayasındaki üç ana histon deasetilaz tipi ile benzerliklerine göre üç ana sınıfa ayrılırlar. Sınıf I HDAC'ler yalnız katalitik parçadan oluşurken sınıf II HDAC'ler katalitik parça dışında amino (N-) ve karboksi (C-) bölgelerinde uzantılara sahiptir. Sınıf II HDAC'ler, transkripsiyon faktörüne doğrudan bağlanabildiği halde sınıf I HDAC'ler transkripsiyon faktörüne bağlanabilmek için aracı moleküllere ihtiyaç duyar (21, 24, 25).

Hop'un, sınıf I HDAC üyesi olan HDAC 2'nin, SRF'ye bağlanmasına aracılık ettiği ve SRF'ye bağlı transkripsiyonu bu yolla baskıladığı düşünölmektedir (3, 4, 9).

2.3 HOP Geni ve Kanser

Hop genini tanımlayan Chen ve arkadaşları 2003 yılında, skuamoz hücreli akciğer karsinomunda ifadesi azalan bir gen tanımlamışlar ve *homeobox* içerdiği anlaşılan bu gene *LAGY* (*Lung Cancer-Associated Gene Y*) adını vermişlerdir (8). Aynı yıl, trofoblastların malin dönüşümleri üzerinde çalışan Asanoma ve arkadaşları da koryokarsinom hücre soyu CC1'de ifadesi kaybolan bir tümör baskılayıcı gen adayını bulmuşlar ve *homeobox* içeren bu gene *NECCI* (*Not Expressed in Choriocarcinoma Clone 1*) adını vermişlerdir (6) Bu iki grubun birbirinden bağımsız olarak tanımladıkları iki tümör baskılayıcı gen adayının aslında aynı gen olduğu ve bu genin 2002 yılında tanımlanmış olan *HOP* olduğu anlaşılmıştır (6, 8).

HOP geninin, ifade edildiği dokulardaki görevlerinin bilinmemesine karşın, bu dokuların bazılarında (akciğer ve plasenta gibi) kaynaklanan tümörlerde *HOP* ifadesinin azaldığının ya da kaybolduğunun gösterilmesi, *HOP*'un erişkin yaşamda, en azından bazı dokular için, tümör baskılayıcı gen olarak çalıştığını göstermektedir (6,8).

Asanoma ve arkadaşları tarafından *LAGY*, Chen ve arkadaşları tarafından *NECCI* olarak adlandırılan genin *HOP* olduğunun anlaşılmasından sonra, Lemaire ve arkadaşları da, baş ve boyun skuamoz hücre karsinomunda (hipofaringeal karsinomda) bu genin ifadesinde azalma olduğunu göstermişler ve *HOP* genini ‘tümör süpressör gen’ olarak tanımlamışlardır (26).

Chen ve arkadaşları, *HOP* ifadesi kaybolmuş koryokarsinom hücre soyuna *HOP* geni aktarıldığında, hücre morfolojilerinin normalleştiğini ve *in vivo* tümör oluşumunun baskılandığını görmüşlerdir (8).

Başka bir çalışmada ise Pauws ve arkadaşları, papiller tiroid karsinomunda *HOP* gen ifadesinin normalden yüksek olduğunu göstermişlerdir (27).

Tümör baskılanmasında ya da oluşumunda *HOP*’un nasıl görev aldığı henüz bilinmemektedir. Fakat, *HOP*’un fiziksel olarak etkileştiği bilinen tek transkripsiyon faktörü SRF, kontrol ettiği genlerden biri olan *c-fos* nedeniyle onkogeneze dolaylı ilişkiye sahiptir.

Yaygın olarak ifade edilen SRF, etkinliği zayıf olan bir transkripsiyon faktörüdür. SRF’nin zayıf olan etkinliği, kalpte *myokardin* adlı kofaktör tarafından güçlendirilirken kalp dışı dokularda bu güçlendirme TCF ve MRTF (-A ve -B) tarafından sağlanır. SRF’nin TCF ya da MRTF ile oluşturduğu kompleks, *c-fos* ve *Egr1* gibi, promotöründe SRE bulunan proto-onkogenleri etkinleştirerek hücre bölünmesini başlatır. MRTF-A’nin, t(1;22) translokasyonu sonucu OTT/RBM-15 (*One Twenty Two/ RNA Binding Protein 15*) geni ile oluşturduğu MRTF-RBM-15 füzyon proteinin, t(1;22) translokasyonlu megakaryoblastik lösemi oluşumundan sorumlu olduğu bilinmektedir. MRTF-RBM-15 füzyon proteinin onkojenik özelliğini ise, SRF aracılığıyla etkinleştirdiği proto-onkogenler ile gösterdiği düşünülmektedir. Megakaryoblastik lösemi oluşumundaki rolü nedeniyle MRTF-A ve -B, aynı zamanda MKL (*Megakaryoblastic Leukemia*)-1 ve -2 olarak da adlandırılmaktadır (28, 29).

SRF uyarıcısı olan MRTF(MKL)’nin megakaryoblastik lösemi patogenezindeki rolü kısmen açıklanmış olsa da, SRF baskılayıcısı olan *HOP*’un akciğer kanseri, koryokarsinom, hipofaringeal karsinom ya da papiller tiroid karsinomu patogenezindeki rolü henüz açıklanmamıştır. Doğrudan SRF’nin, ya da *HOP* ile etkileşen olası başka

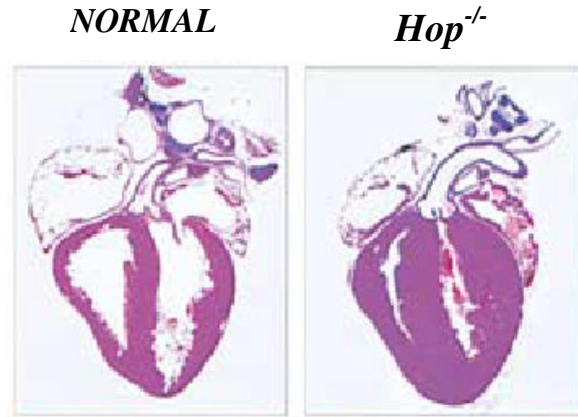
transkripsiyon faktörlerinin, bu tür malin dönüşümlerden sorumlu olduğu düşünülebilir. Ancak, bu sorular ve HOP'un tümör oluşumundaki görevi, etkileştiği diğer moleküllerin tanımlanmasıyla aydınlatılacaktır.

2.4 HOP Geni ve Kalp

Hop geninin görevini anlamak için üretilen delesyonlu ($Hop^{-/-}$) farelerde kalbi etkileyen farklı anomalilerin gözlenmesi, bu genin özellikle kalp gelişimi için önemli bir düzenleyici olduğunu göstermiştir.

Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile (2), $Hop^{-/-}$ mutant farelerin, gebeliğin 11. gününe kadar normal gelişim sürecini izlediği görülmüştür. Emriyonların bir kısmının gebeliğin 11. gününde (E 11.5) gelişim geriliği nedeniyle öldüğü gözlenmiştir. Bu aşamada ölen embriyonların, normalden küçük olduğu gözlenen kalplerinde iki önemli bulgu dikkat çekmiştir; kardiyomiyosit sayısının azlığına bağlı hipoplazik (hiposelüler) miyokard ve hipoplazik miyokardın perforasyonuna bağlı olduğu düşünülen epikardiyal efüzyon (Tablo 2-2'de FENOTİP I).

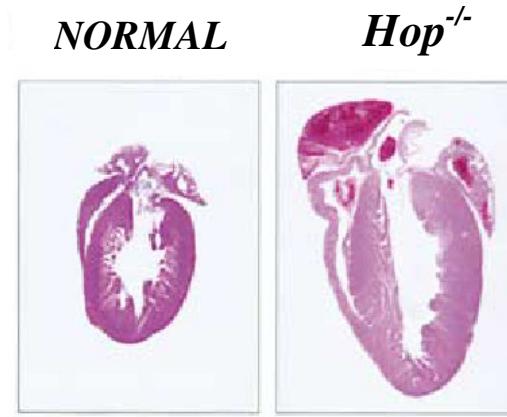
Gelişimin 11. gününü geçebilen mutant fareler doğuma kadar herhangi bir anomali göstermeden büyümeye devam etmişlerdir. Doğumdan hemen sonra ise mutant farelerin kalplerinde anormal bir büyüme olduğu gözlenmiştir (Tablo 2-2'de FENOTİP II) (Şekil 2-5). Histolojik incelemelerle, kalpteki bu büyümenin kardiyomiyosit hiperplazisinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (2).



Şekil 2-5 Hop mutant farelerde, doğumun ardından ortaya çıkan hiperplazik kalp büyümesi (4) (Fenotip II).

Hop^{-/-} mutant farelerin büyüme dönemlerinde de kalple ilgili bulguların ortaya çıktığı görülmüştür. Doğum sonrası gelişimin 6. ayındaki mutant farelerde fibrozlu, büyümüş, dilate kalp dikkat çekmiştir (Tablo 2-2’de FENOTİP III) (Şekil 2-6). Bu dönemdeki kardiyak büyümenin hiperplazik değil hipertrofik olduğu görülmüştür. Dilate kalp fenotipi gösteren bu farelerin kalbinde herhangi bir kontraktıl anomali gözlenmemiştir (3, 4).

Mutant farelerin bir kısmında ise kardiyak hipertrofi geç dönemde (erişkin yaşamda) ortaya çıkmıştır. Bu tip gecikmiş kardiyak hipertrofiye kontraktıl anomalilerin de eşlik ettiği gözlenmiştir (Tablo 2-2’de FENOTİP IV) (3, 4).



Şekil 2-6 *Hop* mutant farelerde yetişkin yaşamda ortaya çıkan hipertrofik kalp büyümesi (4). (Fenotip III ve IV)

Tablo 2-2 *Hop*^{-/-} farelerde gözlenen kalp ile ilgili dört grup fenotip (3 ve 4’den hazırlandı)

	Hop^{-/-} Mutant Farelerde Gözlenen Fenotip	Etkilenen Dönem	Fenotipik Değişiklik
FENOTİP I	Kardiyak Hipoplazi	Erken Embriyogenez E 11.5	Kardiyomiyosit sayısının yetersizliğine bağlı fetal kalp yetmezliği
FENOTİP II	Kardiyak Hiperplazi	Perinatal Dönem	Kardiyomiyosit sayısının fazlalığına bağlı postnatal kardiyak büyüme
FENOTİP III	Kardiyak Dilatasyon	Postnatal Dönem (6. ay)	Kardiyomiyositlerin aksentrik hipertrofisi ve fibrozuna bağlı dilatasyon
FENOTİP IV	Kardiyak Hipertrofi	Ergenlik Dönemi	Kardiyomiyositlerin konsantrik hipertrofisi, kontraktıl anomaliler

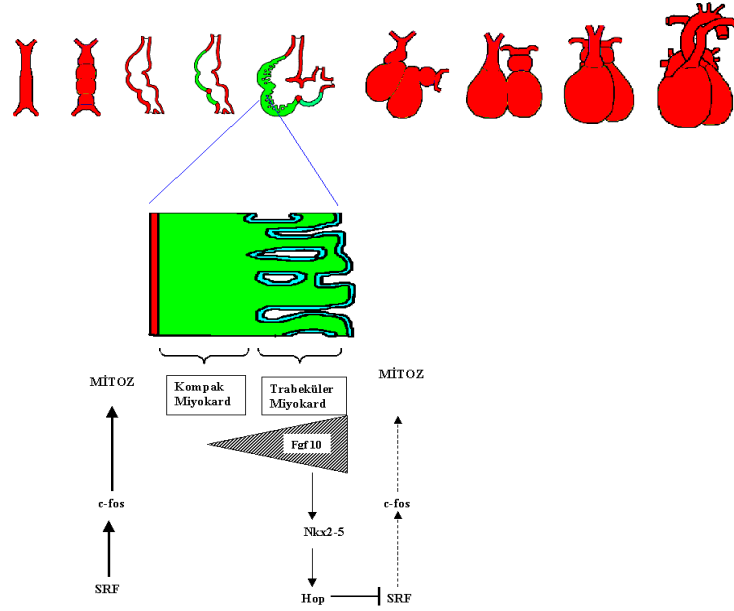
Kalp Gelişiminde *HOP* Geni

Hop mutant farelerde gözlenen fenotipik değişikliklerden ikisi (Fenotip I ve Fenotip II) sırasıyla, kardiyomiyosit sayısının normalden az ve normalden fazla olmasının bir sonucudur. Bu sonuçlar *Hop*'un, kardiyomiyosit sayısını normal sınırlar arasında tutan mekanizmanın bir parçası olduğunu göstermektedir.

Kalp gelişimi sırasında, Nrg, Fgf ve Bmp10 gibi proteinlerin ve retinoik asitin etkisiyle, miyokardın epikard ile örtülü dış yarısı ve endokard ile örtülü iç yarısı arasında, mitoz sıklığı açısından farklılık ortaya çıkar. Miyokardın epikard ile örtülü dış yarısı, yüksek mitoz sıklığı nedeniyle sıkı (kompak) miyokarda dönüşürken, endokard ile örtülü olan iç yarısı, düşük mitoz sıklığı nedeniyle boşluklu (trabeküler) miyokarda dönüşür. Trabekülasyon olarak adlandırılan bu aşamada p27 gibi mitoz baskılayıcılarının etkili olduğu bilinmektedir (30, 31).

Kalp gelişiminin trabekülasyon aşamasından önce tüm miyokarda yüksek düzeyde ifade edilen *Hop*, bu aşamadan sonra (fare için yaklaşık 11. günde) mitoz sıklığı düşük olan trabeküler miyokarda yüksek, mitoz sıklığı yüksek olan kompak miyokarda düşük düzeyde ifadesini sürdürür (3,4). Gen ifadesindeki bu değişiklik *Hop*'un anti-proliferatif özelliği ile uyumluluk gösterir (Şekil 2-7). Miyokardın, özellikle trabeküler yarısında ifade edilen *Hop*'un, kalbin elektriksel ileti sistemini oluşturan hücrelerde de yüksek düzeyde bulunduğu görülmüştür. Bu da *Hop*'un yetişkin kalbindeki elektriksel ileti hücrelerinin işleyişi için önemli olabileceğini görülmektedir (32).

Mutant ve normal farelerde yapılan EKG ölçümleri sonucunda, *Hop*^{-/-} farelerin normal farelere göre daha geniş bir QRS kompleksi ve p-dalgasına, ve daha uzun bir Q-T aralığına sahip oldukları görülmüştür (32). Mutant farelerin kalbinde, özellikle *His* demeti altındaki (distal) ileti hücrelerinde, hücrelerarası iyon geçişinden sorumlu bir transmembran protein olan *Connexin40* ifadesinin azaldığı da bildirilmiştir (32).



Şekil 2-7 Kalp gelişiminin trabekülasyon aşamasında Hop

2.5. Kardiyak Hipertrofi

Bölünme yeteneğini koruyan hücrelerin oluşturduğu bir dokuda, artan gereksinim karşısında hücreler bölünerek organda fizyolojik bir büyümeye neden olurlar. Hiperplazi adı verilen bu büyüme organın veriminde de artışa neden olur. Bazı patolojik durumlarda metaplazi, displazi ve neoplaziye kadar ilerleyebilse de hiperplazi, değişen koşullar karşısında bazı dokularda devreye giren yararlı bir uyum mekanizmasıdır.

Sitolojik yapıları gereği bölünemeyen hücrelerin oluşturduğu iskelet kası ve kalp kası gibi dokularda ise, artan gereksinim karşısında hücrelerin sayısında değil büyüklüğünde artış meydana gelir. Bu artışa bağlı olarak da organda büyüme gözlenir. Hipertrofi adı verilen bu büyüme türü de hiperplazi gibi yararlı bir uyum mekanizmasıdır ve hiperplazi gibi hipertrofi de bazı patolojik durumlarla bağlantılıdır (33, 34).

Gelişmekte olan kalpte, bir yandan çalışırken bir yandan bölünerek çoğalabilen kas hücreleri doğumun ardından (insan için ilk bir hafta içinde) bölünme yeteneklerini geri dönüşümsüz olarak kaybederler. Bu noktadan sonra kalpteki büyüme hücre sayısındaki değil hücre boyutundaki artışla sağlanır. Kardiyak hipertrofi adı verilen bu olgu, yaşamın herhangi bir döneminde tekrar ortaya çıkabilir (33, 35).

Kardiyak hipertrofi bazı fizyolojik ya da patolojik uyarıların varlığında kalp kasının gösterdiği uyumsal bir yanıttır. Bu yanıt, kardiyomiyosit büyümesine bağlı vantrikül duvar kalınlaşmasıyla belirgindir. Kardiyak hipertrofinin uyarıları çok çeşitlidir ve kalp veriminin, kalp iş yükü karşısında yetersiz kaldığı herhangi bir durum kardiyak hipertrofiye neden olabilir. Hipertansiyon ya da aort darlığına bağlı kalp iş yükü artışı, miyokard enfarktüsüne ya da enfeksiyonuna bağlı kardiyomiyosit kaybı, kapakçık hastalığına bağlı hemodinamik bozukluklar ya da sarkomerik gen mutasyonlarına bağlı kontraktıl protein bozuklukları kardiyak hipertrofiyi başlatan en önemli patolojik uyarılardır. Patolojik uyarıların yanında kalp iş yükünü arttıran sportif etkinlikler ya da gebelik gibi fizyolojik koşullarda da kardiyak hipertrofi tetiklenebilir. Fizyolojik ya da patolojik uyarılar ile tetiklenen bu uyum mekanizması, normal koşullarda, kalp verimi ile iş yükü arasındaki denge sağlandığı zaman devre dışı kalır. Kısa süreli faydası olan bu fizyolojik tepki, uyarının kalıcı olduğu durumlarda (hipertansiyon gibi) ya da kalpte yapısal bir bozukluk olduğu durumlarda (kardiyomiyopati gibi) normalden daha uzun sürer ve bu da kalp yetmezliği, aritmiler, miyokard iskemisi ve ani ölümle sonuçlanabilen komplikasyonlara neden olur (33, 34).

2.5.1. Kardiyak Hipertrofide Moleküler Mekanizmalar

Kardiyak hipertrofi, hücre dışı ya da hücre içi bazı uyarıların kalp kası hücrelerinde neden olduğu ve büyüme ile sonuçlanan değişiklikleri kapsar.

Hücre dışı bir uyarıya bağlı gelişen hipertrofi, bazı salgısal (nörohümorale) moleküllerin, kardiyomiyosit üzerindeki reseptörlere bağlanmasıyla tetiklenir. Kalp debisinin yetersiz kaldığı durumlarda periferik dokular tarafından dolaşıma salınan endotelin-1, anjiyotensin-II gibi nörohümorale faktörler, kardiyak hipertrofiyi tetikleyen en önemli hücre dışı uyarılardır. Hücre dışı uyarıların bağlandığı reseptörler, hücre

içinde bazı sinyal ileti yollarını etkinleştirir. Çoğunluğunu protein kinaz ve protein fosfataz enzimlerinin oluşturduğu hücre içi sinyal ileti yolu, zincirleme bir fosforilasyon ve/veya defosforilasyon tepkimesini tanımlar (33, 34, 36).

Nörohümorale faktörün bağlandığı beta adrenerjik reseptörler ve G-protein bağlı reseptörler hipertrofik sinyali düzenleyici enzimlere, siklik AMP (cAMP) ve kalsiyum (Ca^{2+}) gibi moleküller aracılığıyla iletir. PKA (Protein Kinaz A) enzimi cAMP varlığında etkinleşirken CaMK (Ca-Kalmodulin bağlantılı protein kinaz) ve Cn (kalsinörin) gibi enzimler Ca^{2+} varlığında etkinleşirler. Hücre içi sinyal iletimini sağlayan PI3K/AKT, ERK, JNK ve p38 gibi enzimler de hücre dışı uyarılara duyarlıdır. Hücre dışı uyarıların yanında, sarkomerik kalsiyum kullanımındaki bozukluğa bağlı sitozolik kalsiyum artışı da hipertrofik yanıtı başlatan önemli bir uyarandır (34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

Kalp duvar gerimindeki artışın, nörohümorale faktörlerin yokluğunda dahi kardiyak hipertrofiyi tetikleyebildiği bildirilmiştir. Bu durumda, integrin gibi proteinlerin mekanik almaç gibi davranıp membrandaki gerilimi *melusin* aracılığıyla hücre içi sinyal yollarına (AKT/GSK3 ve Ras/ERK) ilettiği ve hipertrofik programı başlattığı düşünülmektedir (44, 45, 46).

Kalp kası hipertrofisinde iki hücre tipi rol oynar;

- 1- Bağ dokusu hücreleri (Kardiyak Fibroblastlar)
- 2- Kas hücreleri (Kardiyomiyositler)

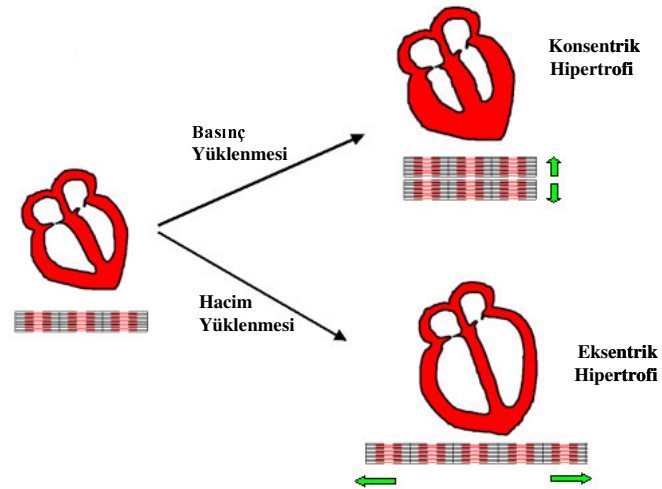
Hipertrofik büyüme sırasında bağ dokusu hücrelerinin sayısında ve kollojen üretiminde artış olur. Miyokardın hüclerarası protein içeriğindeki artış ve hüclerarası proteinleri parçalayan MMP (Matriks Metalo Proteaz) gibi enzimlerin üretimi kardiyak hipertrofinin birçok patolojik sonucundan sorumludur (47, 48).

Hipertrofik büyümenin ana bileşenini oluşturan kardiyomiyositler, bölünme yetenekleri olmadığı için hipertrofik uyarıya çoğalarak değil büyüyerek yanıt verirler. Hipertrofik uyarı ile büyümeye başlayan kardiyomiyositlerde moleküler düzeyde iki önemli değişiklik meydana gelir;

- 1- Translasyonel Değişiklik
- 2- Transkripsiyonel Değişiklik

1-Translasyonel Değişiklik: Hipertrofik yanıt sırasında ortaya çıkan kütle artışı, yeni sentezlenen yapısal ve sarkomerik proteinlerin birikiminin bir sonucudur. Hücrenin protein içeriğindeki bu artış ise, protein sentezinden sorumlu ribozomların ve translasyon faktörlerinin (eIF, 4E-BP, eEF2 gibi) etkinliğindeki artışa bağlıdır. MAPK (ERK, p38 ve JNK) sinyal yolu ile etkinleşen Akt, mTOR ve p70 S6K gibi enzimler, translasyon faktörlerini ve ribozom altbirimlerini fosforile ederek translasyonda (protein sentezinde) genel bir artışa neden olurlar (49, 50, 51, 52, 53).

Kardiyak hipertrofinin en belirgin hücresel özelliği olan kardiyomiyositlerdeki büyüme, yeni üretilen yapısal proteinlerin varolan öncekilere eklenmesiyle gerçekleşir. Yeni sarkomerlerin öncekilere eklenme biçimine göre kardiyomiyosit, boyuna büyüme ya da enine büyüme gösterebilir. Yeni sarkomerlerin öncekilere ‘paralel’ olarak eklenmesi kardiyomiyositin, dolayısıyla kalp duvarının kalınlaşmasına neden olur. Konsantrik tip olarak adlandırılan bu tip hipertrofi normal kalpte, basınç yüklenmesi durumunda ortaya çıkar. Yeni sarkomerlerin öncekilere ‘seri’ olarak eklenmesi ise kardiyomiyositin boyuna uzamasına, kalp duvarında da genişlemeye neden olur. Eksantrik hipertrofi olarak adlandırılan bu tip hipertrofi ise normal kalpte, hacim yüklenmesi durumunda ortaya çıkar (54) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Fizyolojik koşullarda, kalp iş yükündeki artışa bağlı gelişen iki hipertrofi tipi

2-Transkripsiyonel Değişiklik: Kardiyomiyositlerde hipertrofik uyarı ile etkinleşen protein kinazların substratları arasında ribozom altbirimleri ve translasyon faktörleri dışında transkripsiyon faktörleri de bulunur. Fosforilasyonla etkinleşen (ya da baskılanan) transkripsiyon faktörleri, hücrenin gen programında değişikliğe neden olurlar. Gen programındaki bu değişiklik; hipertrofik gen ifadesindeki artışı ve fetal gen reaktivasyonunu içerir (55) (Şekil 2-9).

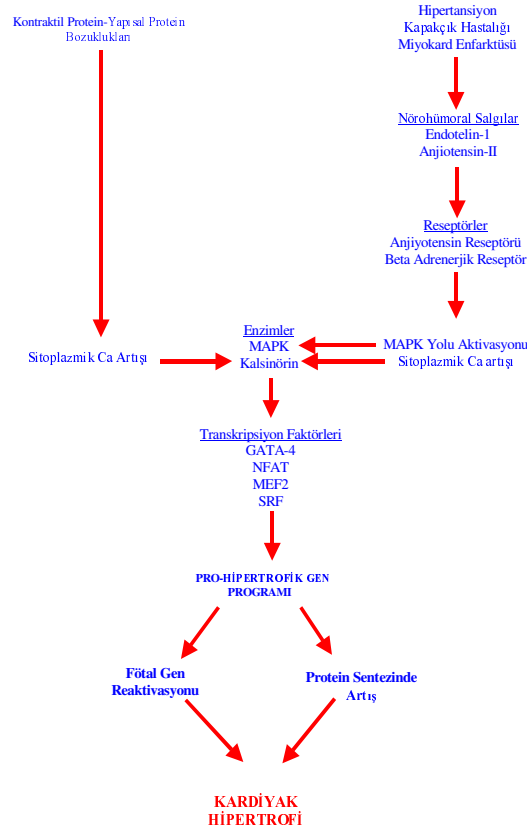
I- Hipertrofik Gen İfadesinde Artış: Fizyolojik koşullarda hipertrofik yanıt, pozitif ve negatif düzenleyicilerin denetimindedir. Hipertrofik yanıt, genellikle pozitif düzenleyicilerdeki etkinlik artışı ya da negatif düzenleyicilerdeki baskılanmanın sonucu olarak ortaya çıkar. Glikojen sentaz kinaz (GSK-3beta), PLA2 (Fosfolipaz A2), HDAC gibi enzimler ve MCIP, A20 gibi düzenleyici proteinler, transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini ya da kalsiyum düzeyini düşürerek hipertrofik yanıtı baskı altında tutarlar. Hipertrofik uyarı sırasında ise bu tür negatif düzenleyiciler baskılanırken transkripsiyon faktörlerini etkinleştiren ya da kalsiyum düzeyini yükselten pozitif düzenleyiciler etkinleşir (56, 57, 58, 59, 60, 61).

II- Fötal Gen Reaktivasyonu: Yeni sarkomerik ve yapısal proteinlerin üretilmesi, kalp kası hücresinde RNA ve protein sentezindeki artışı (nicel değişikliği) gerektirir. Hipertrofik yanıt sırasında transkripsiyon ve translasyondaki nicel değişikliğin yanında, transkripsiyonda nitel değişiklikler de olur.

Kalp, doğum öncesinde ve doğum sonrasında farklı koşullar altındadır. Bu nedenle fetal kalpteki yapısal, işlevsel ve metabolik proteinler yetişkin kalpteki proteinlerden farklı özellikler taşır. Embriyonel ve fetal yaşam boyunca kalpte etkin olan yapısal ve metabolik proteinlerin bazıları doğumun ardından etkinliğini kaybederken bazıları, yerlerini yetişkin izoformlarına bırakır. Etkinlikleri fetal yaşamla sınırlı olan bu genler, yetişkin dönemde hipertrofik uyarı ile karşılaşan kalpte yeniden etkinleşirler. Fetal yaşamda tüm miyokard tarafından, yetişkin yaşamda ise sınırlı olarak yalnız atriyal miyokard tarafından üretilen ANF (Atriyal Natriüretik Faktör), hipertrofik uyarı karşısında, ventriküler miyokard tarafından tekrar üretilmeye başlanır. Ventrikül tarafından üretilen ANF, kardiyak hipertrofinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Miyozin ağır zincirinin fetal izoformu (β MyHC) da hipertrofik yanıt sırasında yeniden

etkinleşen fütal genler arasındadır. Miyozin ağır zincirinin yetişkin izoformu (α MyHC) ise hipertrofik yanıt sırasında baskılanır (35, 62, 63, 64).

Kalbin kontraktıl proteinlerinde hipertrofik yanıt sırasında görülen yetişkin izoform / fütal izoform dönüşümüne benzer bir durum, metabolik proteinlerde de görülür. Fütal kalpte enerji gereksinimi büyük ölçüde glikolitik yolla karşılanırken sağlıklı yetişkin kalbinde yağ asidi oksidasyonu baskın durumdadır. Hipertrofik yanıt sırasında ise sarkomerik proteinlerin fütal izoformlarının yeniden etkinleşmesi gibi kardiyak metabolizmada da glikolitik yolun yeniden etkinleşmesi söz konusudur (49, 65, 66).



Şekil 2-9 Kardiyak hipertrofinin oluşmasındaki bazı basamaklar

2.5.2. Kardiyak Hipertrofiye Önemli Transkripsiyon Faktörleri

Hipertrofik gen programındaki artış ve fetal genlerin yeniden etkinleşmesi (reaktivasyonu), kardiyomiyositlerdeki transkripsiyon faktörlerinin denetimi altındadır. Kardiyak hipertrofiye etkin olan önemli transkripsiyon faktörleri arasında GATA-4, NFAT, MEF2C ve SRF bulunur. Embriyonel ve fetal yaşam sırasında kalbin gelişiminden de sorumlu olan bu transkripsiyon faktörlerinin yatişkin kalbindeki etkinliği, hücre dışı uyarılarla ya da hücre içi Ca^{2+} düzeyi ile tetiklenen enzimler tarafından denetlenir. Bu transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri arasında, kontraktıl proteinlerin fetal izoformlarını kodlayan genler de vardır (46, 55, 67, 68).

GATA-4: Kalp gelişiminin önemli bir düzenleyicisi olan GATA-4, yatişkin kalbinde bazal düzeyde ifade edilir ve kalp kası hücrelerinin devamlılığı için gereklidir. Hipertrofik uyarı varlığında MAPK enzimleri yetişkin kalbindeki GATA-4 etkinliğini artırır. Diğer transkripsiyon faktörleri ile de etkileşen GATA-4, ANP ve BNP gibi hipertrofiye özgü birçok genin promotörüne bağlanarak pro-hipertrofik gen programının etkinleştirir. Kalp kasında yapay olarak gerçekleştirilen yüksek GATA-4 ifadesinin kardiyak hipertrofiye yol açtığı görülmüştür. Hipertrofik bir transkripsiyon faktörü olarak kabul edilen GATA-4'ün etkinliği HDAC ve GSK-3 β tarafından negatif yönde denetlenir (67, 69, 70, 71) (Şekil 2-10).

NFAT: Sinir hücreleri, kas hücreleri ve T-lenfositleri gibi hücrelerde, hücre içi kalsiyum düzeyini hücrenin gen programına bağlayan ortak transkripsiyon faktörü NFAT'dir. Uyarılmamış hücrede GSK-3 β tarafından fosforillenmiş halde ve çekirdek dışında bulunan NFAT, *Cn* (kalsinörin) isimli bir protein fosfataz tarafından defosforile edilir. Defosforile edilen NFAT ise hücre çekirdeğine girerek ilgili genlerin düzenleyici bölgelerine bağlanır. NFAT etkinleşmesini sağlayan *Cn* enzimi ise hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış ile etkinleşir. *Cn* tarafından defosforile edilen ve çekirdeğe giren NFAT, GSK-3 β tarafından fosforillenceye kadar kalp kasında, pro-hipertrofik genlerin transkripsiyonunu uyarır. BNP ve kardiyak bir metabolik gen olan adss1 (adenilosuksinat sentetaz 1), GATA-4 ile NFAT'nin transkripsiyon düzeyinde doğrudan ortak hedefleridir (52,72,73,74, 75, 76, 77) (Şekil 2-10).

MEF2C: Kas farklılaşmasının önemli düzenleyicilerinden biri olan MEF2C, yetişkin kalbinde bazal düzeyde ifade edilir ve kalbin yapısal ve metabolik

proteinlerinin üretimi için gereklidir. MEF2C etkinliğindeki artışın da kardiyak hipertrofiye yol açtığı bilinmektedir. Kalp kası hücrelerinde hedef genin promotoruna bağlı bulunan MEF2C, normal koşullarda HDAC tarafından baskı altında tutulmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış ile uyarılan CaMK enzimi, HDAC'nin fosforillenmesine neden olur. Fosforillenen HDAC, MEF2C'yi bırakır ve 14:3:3 proteini eşliğinde çekirdekten uzaklaşır. HDAC baskısından kurtulan MEF2C ise diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte, promotoruna bağlı bulunduğu hipertrofik genleri etkinleştirir (78, 79, 80, 81, 82, 83, 84) (Şekil 2-10).

SRF: SRF, embriyonel gelişim sırasında düz kas ve kalp kası hücrelerinin farklılaşmasını kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Doğum sonrasında ise, stres uyarılarıyla karşılaşan düz kas ve kalp kası hücrelerinde proliferatif (düz kas için) ya da hipertrofik (kalp kası için) yanıtın düzenlenmesine katılır. Kardiyak hipertrofide önemli bir düzenleyici olduğu anlaşılan SRF karmaşık moleküler etkileşimlerle kontrol edilir (85, 86).

SRF, DNA üzerinde A ve T bakımından zengin CArG [CC(A/T)₆GG] dizilerine bağlanmaktadır. Hücre bölünmesini kontrol eden c-fos ve Egr-1 gibi genlerin, ve ileri düzeyde farklılaşmış hücre tiplerine özgü olan kardiyak aktin, miyozin, distrofin gibi genlerin promotorlarında bu diziler vardır. Çoğalmayı sağlayan genlerin promotorunda genellikle tek bir CArG dizisi bulunurken farklılaşmayı sağlayan genlerin promotorunda iki ya da daha fazla CArG dizisi bulunur. Her iki gruptaki genlerin promotorunda CArG dizilerinin bulunması, birbirine karşıt olan hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması süreçlerinin ortak bir transkripsiyon faktörü (SRF) tarafından düzenlenebildiğini göstermektedir. İleri düzeyde farklılaşmış olan kalp kası hücrelerinde ise SRF'nin, yine birbirine karşıt iki süreç olan pro-hipertrofik ve anti-hipertrofik gen programlarının düzenlenmesinde görev aldığı görülmektedir (12, 19, 85).

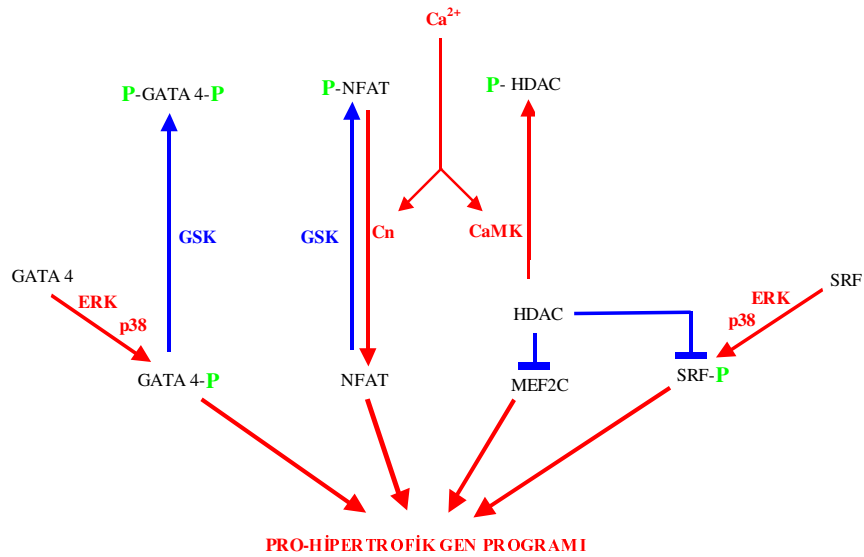
Hücre bölünmesi / hücre farklılaşması ve pro-hipertrofik program / anti-hipertrofik program gibi birbirine karşıt süreçlerin her iki tarafında da yer alması, SRF'nin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. SRF'nin bu ikili davranışı büyük ölçüde etkileştiği moleküllerden kaynaklanmaktadır. SRF, bölünebilir hücrelerde TCF ya da MRTF eşliğinde mitotik genlerin promotoruna bağlanarak hücre çoğalmasını uyarır.

Düz kas ve kalp kasında bulunan *myocardin* varlığında ise SRF kas hücresine özgü genlerin promotoruna bağlanarak hücre farklılaşmasını başlatır (12, 85).

SRF'nin mitotik gen promotoruna bağlanmasını sağlayan TCF ve MRTF, hücre dışı ve hücre içi değişikliklere duyarlı moleküllerdir. Hücredeki TCF etkinliği, hücre dışı bazı uyarılar ile denetlenirken, MRTF etkinliği, hücrenin aktin dinamiği (F-aktin / G-aktin oranı) ve RhoA kinaz yolu tarafından denetlenir (87, 88, 89).

SRF etkinliğini belirleyen diğer bir etmen, SRF'nin *caspase* aracılı yıkımı ve bu yıkım sonucu oluşan üründür. SRF'nin yıkım ürünü, SRF'nin bazı alternatif transkript ürünleri (SRF Δ 5) gibi DNA'ya bağlanma yeteneği yoktur ve dimer oluşturduğu normal SRF'nin de DNA'ya bağlanmasını engeller (85, 90, 91).

SRF etkinliğinin belirlenmesinde önemli görevi olan moleküller arasında, diğer transkripsiyon faktörleri de vardır. SRF DNA'ya bağlanırken, bağlanma bölgesi yakınlarında bulunan TCF, NKX2-5, GATA-4, MEF2C, YY1 gibi transkripsiyon faktörlerinin varlığından etkilenir. DNA üzerindeki bağlanma bölgesi, SRF bağlanma bölgesi ile çakışık olan YY1, SRF etkinliğini azaltırken, SRF bağlanma bölgesi yakınına bağlanan (NKX2-5 ve GATA4 gibi) diğer transkripsiyon faktörleri SRF etkinliğini artırır. Benzer biçimde, DNA'ya doğrudan bağlanmadıkları halde *myocardin* SRF etkinliğini arttırırken, Hop SRF etkinliğini azaltır (14, 92, 93, 94, 95).

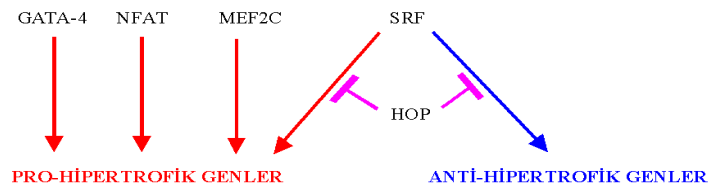


Şekil 2-10 Kardiyak hipertrofide önemli dört transkripsiyon faktörünün kontrolü

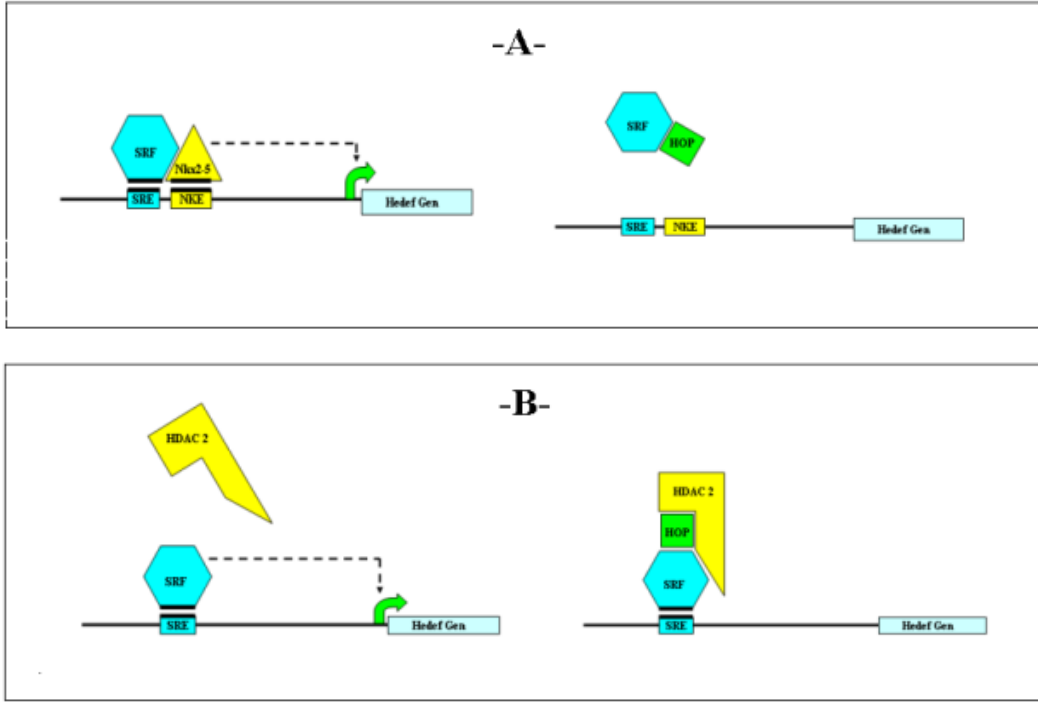
2.5.3. Kardiyak Hipertrofi HOP

Hop mutant farelerde gözlenen fenotipik değişikliklerden ikisi (Tablo 2-2'deki Fenotip I ve Fenotip II) prenatal ve perinatal dönemde kendisini gösterirken diğer ikisi (Tablo 2-2'deki Fenotip III ve Fenotip IV) postnatal dönemde ortaya çıkar. Fenotip II'deki kalp büyümesi hiperplazik olduğu halde fenotip III ve IV'de ortaya çıkan kalp büyümesinin hipertrofik olduğu anlaşılmıştır. Bu da *Hop*'un doğum öncesinde hücre bölünmesini, doğum sonrasında ise hücre büyümesini (hipertrofiyi) baskılayan bir düzenleyici olduğunu göstermektedir (3, 4).

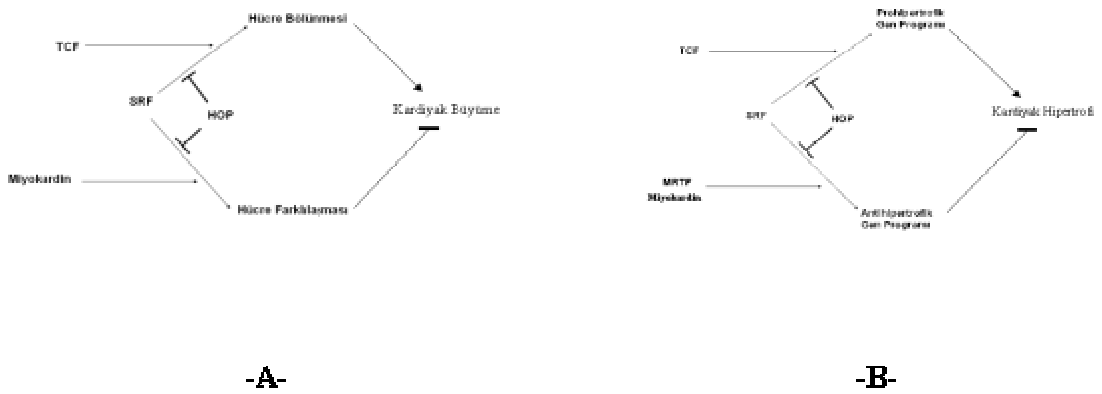
Mutasyonu yetişkin farelerde hipertrofik kalp büyümesine neden olan *Hop* geninin kardiyak hipertrofi ile ilişkisini anlayabilmek için çeşitli deneyler yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda *Hop*'un kardiyak hipertrofiye etkisini SRF aracılığıyla gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 2-11). SRF'ye bağlı gen ifadesinin *Hop* tarafından baskılanması, anlaşıldığı kadarıyla iki yolla gerçekleşmektedir. İlk yolda *Hop*, SRF'nin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek SRF'ye bağlı gen ifadesini baskılar. Nkx2-5'in homeodomeynini taklit ederek SRF ile dimer oluşturan *Hop*, DNA'ya bağlanma özelliği olmadığı için SRF'nin de DNA'ya bağlanmasını engeller. İkinci yolda ise *Hop*, DNA'ya bağlanmış durumdaki SRF'yi hedef alır ve transkripsiyonu baskılamak için sınıf I HDAC'lere gereksinim duyar (Şekil 2-12). *Hop*, sınıf I HDAC üyesi olan HDAC2'nin SRF'ye bağlanmasını sağlayarak SRF'nin transkripsiyonel etkinliğini baskılamaktadır. Kalp kasındaki yüksek *Hop* ifadesinden kaynaklanan hipertrofinin, HDAC inhibitörleri varlığında gerçekleşmemesi, *Hop*'un hipertrofik etkisini HDAC aracılığıyla gösterdiğini doğrulamaktadır. *Hop* mutant farelerde olduğu gibi, yüksek düzeyde *Hop* ifade eden farelerde de kardiyak hipertrofi geliştiği görülmüştür. Bu çelişkili durum, SRF'nin hipertrofik yanıtındaki ikili davranışına bağlanmaktadır (3, 4, 9, 96, 97) (Şekil 2-13).



Şekil 2-11 Hipertrofik yanıtta HOP'un yeri



Şekil 2-12 Hop'un yokluğunda (sol) ve varlığında (sağ), SRF'ye bağlı gen ifadesinin düzenlenmesini açıklayan iki mekanizma. Hop, SRF'nin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek (A), ya da transkripsiyon repressörü HDAC'yi SRF'ye bağlayarak (B) SRF'nin transkripsiyonel etkinliğini baskılar.



Şekil 2-13 HOP'un doğum öncesinde (A) ve sonrasındaki (B) kalp büyümesini etkilediği basamaklar.

2.6 Kardiyomiyopatiler

Kardiyomiyopatiler (kalp kası hastalıkları); kalp kasında, kalbin çalışmasını aksatacak bir bozukluğun ortaya çıkmasıyla beliren klinik tabloların genel adıdır. Bu bozukluk virüs gibi bir enfeksiyon etkeninden, metabolik bir bozukluktan ya da kimyasal bir maddeden kaynaklanabilir. Bu tür edinsel kalp kası hastalıkları (enfektif, metabolik ve toksik kardiyomiyopatiler) dışında kalan kalıtsal kalp kası hastalıkları ise kalbin yapısal, metabolik veya kontraktil proteinlerindeki bozukluklardan kaynaklanır (98, 99).

Farklı nedenlerden kaynaklansa da kardiyomiyopatiler, genellikle yaşamı tehdit edebilen bazı ortak komplikasyonlarla sonuçlanır. Bu komplikasyonların başında kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü ve kardiyak aritmiler gelir. Hastalığın seyri, tedavi seçeneği ve prognozu kardiyomiyopatinin nedenine bağlı olarak değişir (49,98,99,100).

2.6.1 Hipertrofik Kardiyomiyopatiler (HKM)

Kalıtsal kardiyomiyopatilerin büyük bir kısmı (özellikle kontraktil protein bozukluğu taşıyanlar), interventriküler septumda asimetrik bir kalınlaşmaya neden olur. Miyosit kütle artışından kaynaklanan bu kalınlaşma, sol ventrikül hipertrofisi olarak adlandırılır ve HKM için en önemli bulgudur (99).

Sol ventrikül hipertrofisi, değişik nedenlerden dolayı sol ventrikül miyokardında meydana gelen büyümeyi tanımlar. Sistemik hipertansiyon, aort kapak hastalığı, koroner arter hastalığı, aort darlığı ve bazı doğumsal kalp hastalıklarına ikincil olarak gelişebilen sol ventrikül hipertrofisi, bu durumlarda, ilgili hastalığın bir belirtisi (semptomu) olarak değerlendirilir. Kalp kasının kendi hastalığına (kardiyomiyopatiye) birincil olarak gelişen sol ventrikül hipertrofisi ise hipertrofik kardiyomiyopati (HKM) hastalığı adı altında ayrı değerlendirilir. Altında yatan nedenlerin farklı olmasından dolayı birincil (kardiyomiyopatik) hipertrofi ile ikincil (hipertansif veya aortik) hipertrofinin ayırımı klinik olarak önemlidir. Bu nedenle HKM tanısı, hipertansiyon ve aort kapak hastalığı gibi sol ventrikül hipertrofisine neden olabilen durumların dışlandığı sol ventrikül büyümesi varlığında düşünülür (98,99).

Tanı: Sol ventrikül hipertrofisine neden olduğu bilinen sistemik hipertansiyon, koroner arter hastalığı, aortik kapak hastalığı, aort darlığı ve doğumsal kalp hastalığı

gibi hastalıkların yokluğunda, nondilate odacığın (ve korunmuş sistolik işlevin) eşlik ettiği sol ventrikül hipertrofisi HKM tanısını düşündüren ilk nedendir. HKM tanısı, tipik olarak asimetrik dağılım gösteren sol ventrikül hipertrofisinin 2-D ekokardiyografide gösterilmesiyle kolaylıkla konabilir (101).

Görüntüleme teknikleriyle ölçülen sol ventrikül duvar kalınlığının 15 mm'nin üzerinde olması HKM için en önemli tanı kriteridir. Atlet kalbi olarak adlandırılan fizyolojik hipertrofide ölçülen sol ventrikül duvar kalınlığı (12 mm) ile HKM tanı sınırı (15 mm) arasında kalan (13-14 mm) ölçümlerin değerlendirilmesi daha dikkat gerektiren durumlardır (102).

Hastaların yaklaşık % 70'inde interventriküler septumun asimetrik tutulumu görülürken, hastaların % 8-10'u, asimetrik septal hipertrofi yerine konsantrik hipertrofi geliştirir. Bazal yerleşimli septal hipertrofi hastaların % 15-20'sinde görülürken, apikal ya da lateral duvar yerleşimli hipertrofi batı toplumlarında çok düşük (< % 2), Japon toplumunda ise yüksek (% 25) oranda bulunur (98,100).

Etiyoloji: HKM, kalp kası hücrelerinin sarkomer bileşenlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların neden olduğu genetik bir hastalıktır. Kontraktil, yapısal ya da düzenleyici işlevi olan, 15'ten fazla sarkomerik protein geninde 150'den fazla mutasyonun HKM nedeni olduğu bildirilmiştir. Tanımlanan bu mutasyonlar içinde en yaygın olanların β MyHC (% 35), MyBPC (% 20) ve TNNT (% 15) genlerinde bulunduğu görülmüştür. β MyHC geninde HKM nedeni olan 65'ten fazla, MyBPC geninde 30, TNNT geninde ise 14 mutasyon bulunmuştur. α TM, TNNI, MLC-2, MLC-2, α AC ve TTN gibi diğer genlerde bulunan mutasyonlar ile birlikte β MyHC, MyBPC ve TNNT genlerindeki mutasyonlar, tanımlanan tüm HKM hastalarının yaklaşık % 70'inden sorumludur. Genç nüfusta sıklığı 1/500 olarak ölçülen HKM, hastaların yaklaşık % 50'sinde ailevi olarak kalıttır. Aile hikayesi olmayanlarda hastalığın yeni mutasyonlardan kaynaklandığı ya da aile içinde gözden kaçacak kadar silik belirti verdiği düşünülmektedir (98, 100, 102).

Klinik Bulgular ve Prognoz: Dispne, anjina, konjestif kalp yetmezliği, miyokard iskemisi, aritmi ve mitral regürgitasyon gibi farklı belirtiler verebilen HKM, klinik gidişatı değişkenlik gösteren bir hastalıktır. Bazı hastalarda HKM yaşam boyu

belirtisiz kalırken, bazı hastalarda mekanik ya da elektriksel anomalilere bağlı ani kalp ölümlerine neden olabilmektedir (98, 100, 103, 104, 105).

Belirtilerinin yanında, hipertrofinin yerleşimi bakımından da HKM değişkenlik gösterir. Hipertrofinin yerleşimine bağlı olarak ortaya çıkan bu değişkenlik hastalığın adlandırılmasına da yansımıştır. HKM'nin başlangıçta Hipertrofik Obstrüktif Kardiyomiyopati, Müsküler Subaortik Stenoz ve İdiyopatik Hipertrofik Subaortik Stenoz gibi farklı biçimde adlandırılmasının nedeni hipertrofinin yerleşimindeki değişkenliktir (98,100).

Hipertrofik kitlenin yerleşimine bağlı olarak ortaya çıkabilecek en önemli klinik bulgu tıkanmadır (obstrüksiyon). Aort ağzına yakın (sub-aortik) yerleşim gösteren hipertrofik kitle, sistol sırasında sol ventrikülden aortaya kan geçişini dereceli olarak ya da tamamen engelleyebilir. Kalp atım yolu tıkanıklığı olarak adlandırılan bu durum HKM hastalarında yaklaşık % 25 oranında görülür ve ani ölümlerin önemli bir nedenidir. Bu nedenle HKM'nin tıkaç oluşturan (obstrüktif) ve oluşturmayan (non-obstrüktif) biçimlerinin ayırımı klinik olarak önemlidir. Sub-aortik yerleşimli septal hipertrofi dışında ventrikül içi papiller kas hipertrofisi de sistol sırasında tıkaç oluşturabilmektedir (99, 106, 107).

HKM hastaları için en ciddi risk, kalp atım yolu tıkanıklığına ya da aritmilere bağlı ani kalp ölümleridir. Bazı durumlarda hastalığın ilk belirtisi olarak ortaya çıkan ani kalp ölümleri, özellikle genç sporculardaki ani ölümlerin ilk nedenleri arasındadır. Daha ileri yaşlarda ise HKM, kalp yetmezliğine ilerleyebileceği gibi klinik bulgu vermeden de kalabilir (100, 108).

Histopatoloji: HKM'deki üç temel histolojik bulgu miyofibriler düzensizlik, interstisiyal fibroz ve kardiyomiyosit hipertrofisidir. HKM'yi diğer hipertrofik durumlardan ayıran ve HKM'ye özgü olan en önemli histolojik bulgu miyosit düzensizliğidir. Mutant ve normal sarkomerik proteinler arasındaki işlevsel uyumsuzluktan kaynaklandığı düşünülen miyofibriler düzensizliğin oranı değişkenlik gösterir ve sol ventrikül duvarının % 33'ünü tutabilir. Yapılan otopsiler sonucu, özellikle hastalıktan dolayı ölen gençlerde bu oranın daha yüksek olduğu görülmüştür. İnterstisiyel fibroz ise, genellikle iskeminin tetiklediği apoptoz sonucu ölen miyositlerin yerine bağ dokusu hücrelerinin geçmesiyle oluşur. Kalp kasının esnekliğinde azalmaya

neden olan interstisyel fibroz, aynı zamanda kalp ileti sisteminde de aksaklıklara yol açabilmektedir. HKM'nin en önemli, fakat özgül olmayan histolojik bulgusu ise miyosit hipertrofisidir. Miyosit hipertrofisi konsentrik tiptedir ve HKM'deki kalp büyümesinin esas sorumlusudur (49, 109).

Küçük intramural koroner arterlerin duvarlarındaki mediyal hipertrofi de HKM'de sık görülen bir bulgudur. Hastaların % 80'inden fazlasında görülen mediyal hipertrofi, koroner arter lümeninin daralmasına neden olur. Koroner arter lümenindeki daralma, miyokardın oksijenlenmesini azaltır. Miyokard hipertrofisine bağlı olarak artan oksijen gereksinimi ile birlikte bu durum HKM hastalarında iskemi olasılığını artırır (98, 100, 110).

Patogenez: HKM patogenezinin sorumlu olan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmese de iki önemli açıklama öne sürülmektedir. İlk açıklamaya göre normal ve mutant proteinlerin sarkomer içindeki heterojen dağılımları, aktin-miyozin arasındaki uyumu bozar. İkinci açıklamaya göre mutasyon ya ATPaz etkinliğini değiştirdiği için doğrudan, ya da dolaylı yollarla, mutant miyositin enerji gereksinimini artırır. Her iki durumda da hipertrofik gen programının devreye girmesiyle hücrede yeniden yapılanma başlar. Hücre büyümesi (hipertrofi) ile belirgin olan yeniden yapılanma enerji gereksinimini organ düzeyinde artırır (98, 100).

Farklı mutant proteinlerin miyositlerde hipertrofik yanıtı farklı sinyal yolları aracılığıyla tetikledikleri düşünüyor olsa da kalsiyum hepsi için önemli bir ortak nokta oluşturmaktadır. HKM patogenezinde kalsiyumun önemi hayvan deneylerinde de gösterilmiştir. HKM'li farelere L-tipi kalsiyum kanal inhibitörü diltiazem verildiğinde histopatolojik değişikliklerin düzeldiği görülmüştür (49, 111).

MyHC7 ve MyBPC3 mutasyonlarında, sol ventrikül hipertrofisi gelişmeye başlamadan önce dahi azalmış diyastolik işlev gelişmeye başladığı görülmüştür. Hayvan modellerleriyle, diyastolik gevşemedeki bu yetersizliğin artmış kalsiyum duyarlılığından kaynaklandığı anlaşılmıştır (49, 112).

Mutant proteinin yüksek kalsiyum duyarlılığı nedeniyle arttığı düşünülen sitoplazmik kalsiyum düzeyi, kalsinörin (*Cn*) ve CaMK gibi enzimlerin etkinleşmesine neden olur. Hücre içi kalsiyum artışının yanında hücre dışı uyarılar da MAPK

enzimlerinin etkinleşmesine neden olur. Hücre içi ya da hücre dışı uyarılarla etkinleşen bu enzimlerin substratları arasında yer alan MEF2, GATA4, NFAT ve SRF gibi transkripsiyon faktörlerinin ise yetişkin kalbinde hipertrofik yanıtta özgü f3tal gen reaktivasyonundan sorumlu oldukları bilinmektedir (37, 49).

HKM'deki temel sorun mutant sarkomerik proteinlerdir. Mutant proteinin neden olduğu kalp işlev bozukluğu, kalp işlevini arttırmaya yönelik uyumsal yapılanmaları tetikler. Bu yeniden yapılanmaların en önemlisi de hipertrofidir. Hipertrofik yanıt ile kalp, sayısını arttıramadığı hücrelerinin, sarkomerik içeriğini arttırarak sorunu çözmeye çalışır. Fakat, sorunun asıl kaynağı olan bozuk sarkomerlere eklenen yeni sarkomerler de bozuk olacağı için, bu uyum mekanizması sorunun çözümünden çok büyümesine ve başka yeni sorunların eklenmesine neden olur. Kısa dönemde faydalı olmasına rağmen uzun dönemde yeni sorunlara kaynaklık eden hipertrofinin özellikle sol ventrikülü tutması, sol ventrikül iş yükünün fazla olmasına bağlıdır. Bu nedenle HKM, büyümenin ve buna bağlı olarak sol ventrikül iş yükünün sürekli arttığı erişkin öncesi (çocukluk- gençlik) dönemde belirtilerini genellikle göstermiş olur (98,101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza; Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde ekokardiyografi ile tanısı konulan 50 Hipertrofik Kardiyomiyopatili (HKM) hasta dahil edildi. Hastalara yapılacak çalışma hakkında bilgi verildi ve bilgilendirilmiş onay formu okunarak imzalanması istendi. Hastalardan EDTA'lı tüpe 10 cc kan alındı ve amonyum asetat yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı.

3.1.2. Sağlıklı Kontrol Grubu

Kontrol grubu için hipertrofik kardiyomiyopati bulgularına sahip olmayan 100 sağlıklı birey seçildi. Kontrollerden EDTA'lı tüpe 10 cc kan alındı ve amonyum asetat yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı.

3.1.3. Enzimler

Taq DNA Polimeraz

Proteinaz K

3.1.4. Primerler

Tablo 3-1 : Kullanılan primerler

Bölge	Ekzon	Primer	Primerin Dizisi (5'-3')	Beklenen Bant Boyu (bp)
1	1	HOP-e1F	AACGTGCTATCAGCAGCCTG	177
		HOP-e1R	GCATTTTGGTCTAGTTCCTGCAC	
2	4	HOP-e2F	CGACCGCCTTCCTTCGCTGC	308
		HOP-e2R	GACGAACAGGACCGCCAGC	
3	5	HOP-e3F	CTTGTGCCACAGAGGCTACC	206
		HOP-e3R	CCTTCATGGAGTGAAGCTGTC	

3.1.5. Kimyasal Maddeler

Agaroz

Akrilamid

Amonyum Asetat

Amonyum Klorür (NH_4Cl)

Amonyum Persülfat (APS)

Asetik Asit

Bisakrilamid

Borik Asit

Brom Fenol Mavisi

Etanol

Etidyum Bromid

EDTA (Etilen Diamid Tetraasetik Asit)

Formaldehit

Formamid

Gliserol

Gümüş Nitrat

Ksilen Siyanol

Potasyum Bikarbonat (KHCO_3)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Sodyum Hidroksit (NaOH)

Sodyum Klorür (NaCl)

TEMED (Tetrametiletildiamin)

Tris baz

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucu	(+ 4 °C ve -20 °C Uğur, -80°C Memmert)
CCD kamera-bilgisayar donanımı	(Mitsubishi-Machintosh)
Çalkalamalı su banyosu	(Memmert)
Çalkalayıcı (shaker)	(Memmert)
Çeker Ocak	(Kermanlar)
Distile su cihazı	(Milipore)
Dikey elektroforez aleti	(Owl Separation System)
Dikey jel soğutucu	(Polyscience)
Elektroforez aleti	(Owl)
Etüv	(Heraeus)
Güç kaynağı	(Ec Appatus Corporation)
Hassas terazî	(Shimadzu)
Hibridizasyon fırını	(Techne)
Homojenizatör	(Heidolph)
Horizontal beyaz ışık kaynağı	(Fotodyne)
Isı bloğu	(Vive scientific)

Masaüstü mini santrifüj	(Eppendorf)
Otomatik pipetler	(Gilson)
PZR cihazı	(Techne-Perkin Elmer-Eppendorf)
PH metre	(Corning)
Soğutmalı santrifüj	(Heraus)
Spektrofotometre	(Labomed)
UV- transluminatör	(Fotodyne)
UV-crosslink	(Stratagene)

3.1.7. DNA İzolasyon Çözeltileri

RBL (Alyuvar Parçalayıcı Çözelti), pH 7.4

NH ₄ Cl	8.74 g
KHCO ₃	1 g
0,5 M EDTA, pH 8.0	200 ml
Distile Su	800 ml.

WBL (Akyuvar Parçalayıcı Çözelti)

4 M NaCl	10 ml
0,5 M EDTA, pH 8.0	20 ml

Steril distile su ile 400 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Amonyum Asetet Çözeltisi (9.5 M)

Amonyum Asetat	770 g
Distile su	1 000 ml

Sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtre kullanıldı ve oda ısısında saklandı.

TE (TrisEDTA) Tampon Çözeltisi (1000 ml, pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10 ml
0.5 M EDTA	20 ml
Distile su	970 ml

SDS %1 (50 ml, pH 7.2)

SDS (Sodyum dodesil sülfat)	5 g
-----------------------------	-----

Steril distile su ile 50ml'ye tamamlandı. pH HCl ile 7.2'ye ayarlandı.

Oda ısısında saklandı.

3.1.8. Elektroforez Çözeltileri

Yükleme Tamponları

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Yükleme Tamponu (6X)

0.25% brom fenol mavisi

30% gliserol

Poliakrilamid Jel Elektroforezi İçin Yükleme Tamponu (2X)

0.25% brom fenol mavisi

0.25% ksilen siyanol

95% formamid

Yürütme Tamponları**Agaroz Jel Elektroforezi İçin Yürütme Tamponu****TAE (50X)**

Tris baz: 242 g

Glasiyal asetik asit: 57.1 g

EDTA (0.5M): 100 ml

Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi.

Poliakrilamid Jel elektroforezi İçin Yürütme Tamponu**TBE (5X)**

Tris baz: 60.57 g

Borik asit: 30.90 g

EDTA (0.5M): 40 ml

% 10 Poliakrilamid Jel Çözeltisi (SSCP için) (99:1)

Akrilamid 10 g

Bisakrilamid 0,1 g

5 X TBE çözeltisi 10 ml

Distile Su 90 ml

% 10 Poliakrilamid Jel Çözeltisi (100 ml)

% 40 Akrilamid –Bisakrilamid (19:1)	20 ml
5 X TBE çözeltisi	20 ml
Distile Su	60 ml

Gümüş Boyama Çözeltileri**A Çözeltisi (10X)**

%95 Etil alkol

%5 Asetik asit

B Çözeltisi (10X)

Gümüş nitrat 3 gr

Distile su 300 ml

C Çözeltisi (Taze hazırlanır)

NaOH 4.5 gr

Borik Asit 0.03 gr

Formaldehit %0.4

Distile su 300 ml

D Çözeltisi (10X)

Sodyum bikarbonat 22.5 gr

Distile su 300 ml

3.2. Yöntemler

3.2.1. Yöntem Bilgisi

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR, biyolojik bir maddede, varlığı bilinen ya da tahmin edilen bir DNA (ya da RNA) parçasının, *in vitro* koşullarda, ölçülebilecek miktarlara kadar çoğaltılması işlemidir. PZR, varlığı tahmin edilen bir DNA bölgesinin varlığını göstermek ya da varlığı bilinen bir DNA bölgesini başka amaçlarla kullanılabilir miktarlarda elde etmek amacıyla uygulanabilir. PZR yöntemi, *Taq* DNA Polimeraz enziminin, tek zincirli bir DNA molekülünü kalıp olarak kullanarak serbest bir 3'OH ucuna, kalıp diziyeye uygun nükleotidleri ekleyebilme yeteneğine dayalıdır. Hücre içinde DNA Polimeraz için serbest 3'OH ucu tek zincirli kısa RNA molekülleriyle sağlanırken, *in vitro* koşullarda (PZR'de) 3'OH uç, yapay olarak üretilen tek zincirli kısa DNA molekülleri ile sağlanır. Primer adı verilen bu tek zincirli DNA molekülleri, PZR'ın seçiciliğini belirleyen esas bileşendir. Primer dizisi kurgulanarak serbest 3'OH ucunun hedef DNA'da bağlanacağı yer, dolayısıyla çoğaltılacak bölge önceden belirlenebilir.

SSCP (Tek Zincir Biçimlenme Polimorfizmi)

Primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda elde edilen ürün birçok amaç için kullanılabilir. Bu amaçlardan biri de, incelenen bölgedeki mutasyonların (ya da polimorfik değişikliklerin) belirlenmesidir. Varlığı daha önce başka örneklerde gösterilmiş, bilinen bir mutasyonu görebilmek için RFLP ve ASO-PZR gibi yöntemler kullanılırken, daha önce tanımlanmamış yeni mutasyonları bulabilmek için daha değişik yöntemler kullanılır. PZR ürününün doğrudan dizilenmesi, yeni mutasyonları görebilmek için uygulanabilecek en kesin yöntemdir. Fakat, yüksek maliyeti nedeniyle DNA dizileme yöntemi, çok sayıda örnek içeren çalışmalar için kullanılmamaktadır. Bu nedenle mutasyonun varlığını dolaylı olarak göstererek dizilenecek örnek sayısını en aza indirmeyi amaçlayan hetodubleks-homodubleks analiz, HPLC ve SSCP gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan SSCP, tek zincirli DNA molekülünün poliakrilamid jeldeki yürüme tarzının molekülün biçimine bağlı olduğu varsayımına dayanır. Tek zincirli DNA molekülünün biçimi, yani kendi üzerine

katlanma tarzı ise ortamın fizikokimyasal durumuna ve DNA'nın baz dizisine bağlıdır. Dolayısıyla aynı fizikokimyasal koşullar altında, aynı diziye sahip tek zincirli DNA moleküllerinin aynı biçimde katlanacakları ve poliakrilamid jelde aynı tarzda yürüyecekleri varsayılır. Dizisinde bir farklılık olan DNA molekülünün ise aynı fizikokimyasal koşullar altında farklı bir katlanma biçimine sahip olacağı, bunun da örneğin jeldeki yürüme tarzını değiştireceği varsayılır.

SSCP'de kullanılacak olan tek zincirli DNA, PZR ile elde edilen çift zincirli DNA ürünlerinin denatürasyonu ile sağlanır. PZR ürününün denatürasyonu yüksek ısı ile gerçekleştirilir. Denatürasyonla elde edilen tek zincirli DNA moleküllerinin renatürasyonunu engellemek amacıyla formamid gibi denatüre edici kimyasalların varlığında şok soğutma uygulanır. Şok soğutma sırasında kendi üzerine katlanan tek zincirli PZR ürünü, denatüre halde poliakrilamid jele yüklenir ve elektrik alanda poliakrilamid jelde yürütülür. Elektroforez sonunda jel gümüş boyama yöntemi ile görüntülenir ve örnekler kendi aralarında karşılaştırılarak değerlendirilir.

Denatürasyondan elektroforez sonuna kadar uygulanan her aşamadaki fizikokimyasal koşullar, sonucu etkileyebileceği için SSCP her örneğe aynı koşullarda uygulanmalıdır.

SSCP'de sonucu etkileyen birçok etmen vardır;

- PZR ürününün uzunluğu,
- PCR ürünü-formamid oranı,
- Denatürasyon sıcaklığı ve süresi,
- Poliakrilamid jelin yüzdesi, akrilamid-bisakrilamid oranı, gliserol içeriği ve oranı,
- Elektroforezde uygulanan voltaj, sıcaklık ve süre

3.2.2 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1 10 ml EDTA'lı periferik kan, 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 30 ml (1:3 oranında) RBL (Eritrosit Parçalayıcı Çözelti) eklendi. RBL ile karıştırılan kan 20 dakika, +4 °C sıcaklıkta bekletildi ve 10 dakika, 1500 rpm devirde santifüj edildi.

2 Santrifüj sonrasında falkon tüpteki sıvı kısım (süpernatant) döküldü. Tüp dibindeki katı kısım (çökelti) resüspanse edilerek üzerine 20 ml RBL eklendi. 1500 rpm devirde tekrar 10 dakika santrifüj edildi.

3 Süpernatant kısım atılarak pelet resüspanse edildi. Üzerine 500 µl SDS (10%), 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml WBL (Lökosit Parçalayıcı Çözelti) eklenerek gece boyu 55 °C'lik su banyosunda bekletildi (inkübasyon).

4 İnkübasyonun ardından su banyosundan alınan falkon tüpüne 3700 µl, 9.5 molarlık amonyum asetat çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı.

5 Örnekler -20 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra +4 °C'de 20 dakika 4500 rpm devirde santrifüj edildi.

6 Santrifüj sonrasında üst kısımdaki berrak sıvı (süpernatant) yeni bir falkon tüpüne aktarıldı. Yeni falkon tüpündeki berrak sıvı üzerine 20 ml saf etanol eklenerek DNA'nın toplanması sağlandı. DNA, 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılarak 1ml'lik %70'lik etanolde yıkandı. Mikrosantrifüj ile 14.000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

7 Alkol atılarak çökelti halindeki DNA kurumaya bırakıldı.

8 Yeterli ölçüde kuruyan DNA'nın üzerine, miktarına göre 100-300 µl TE (Tris-EDTA) tamponu eklendi ve çözünmesi için 55 °C'de 1 saat bekletildi. Eppendorf tüpteki DNA 4 °C'de saklandı.

3.2.3. DNA'nın Miktar ve Saflığının Ölçümü

1 Elde edilerek 4 °C'de saklanan DNA'dan 5 µl alındı ve 1.5 µl'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.

2 Alınan 5 µl'lik DNA, üzerine 95 µl TE tamponu eklenerek 1/20 oranında sulandırıldı.

3 Ultraviyole spektrofotometresi ile örneğin 260 nm ve 280 nm dalgaboylarındaki emilim (absorbsiyon) değerleri ölçüldü.

4 DNA'nın konsantrasyonu ; sulandırma oranı (100), 260 nm'de okunan değer (OD260) ve sabit bir sayının (çift zincirli DNA için 50) çarpımı ile, mikrolitrede nanogram (ng/µl) cinsinden hesaplandı. $C(\text{ng}/\mu\text{l})= 100 \times 50 \times \text{OD}260$

5 Spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de ölçülen değerlerin oranı (OD260/OD280)

İle, elde edilen DNA'nın saflığı değerlendirildi:

OD 260/OD 280 < 1.8 ise protein kontaminasyonu

OD 260/OD 280 > 2.1 ise RNA kontaminasyonu olduğu düşünüldü.

3.2.4. PZR

PZR Karışımları:

	PZR1 (HOP-e1 ve HOP-e5 için)	PZR2 (HOP-e4 için)
H ₂ O	16.4 µl	13.9 µl
10X Tampon	2.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂ (25nM)	1.5 µl	1.0 µl
dNTP (2mM)	1.5 µl	2.0 µl
Primer 1	1.0 µl	1.0 µl
Primer 2	1.0 µl	1.0 µl
DMSO	-	2.5 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.1 µl	0.1 µl
Toplam	24.0 µl	24.0 µl
DNA	1.0 µl	1.0 µl

PZR Koşulları

		Sıcaklık	Süre
a- Ön Denatürasyon	1 döngü		
	a1- Denatürasyon	95 °C	5 dakika
b- Amplifikasyon	35 döngü		
	b1- Denatürasyon	94 °C	45 saniye
	b2- Primer Bağlanması	*	1 dakika
	b3- Sentez	72 °C	1 dakika
c- Sonlanma	1 döngü		
	c1- Son sentez	72 °C	10 dakika

* Primer bağlanma sıcaklığı

HOP-e1 ve HOP-e5 için 59 °C

HOP-e4 için 65 °C

Agaroz Jelin Hazırlanışı

%2'lik agaroz jel hazırlamak için beher içinde 50 ml TAE tamponuna 1gr agaroz eklenerek karıştırıldı. Agaroz, tomponda çözününceye kadar karışım mikrodalga fırında yaklaşık 5 dakika ısıtıldı. 40°C'ye kadar soğuyan karışıma 2 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Karışım, önceden hazırlanan ve jel tarağı ile jel tepsisinden oluşan düzeneğe döküldü.

PZR Sonuçlarının Kontrolü

0.2 µl'lik tüplerde 25 µl'lik karışım içinde gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun sonuçlarını kontrol etmek için, PZR ürünlerinden 5 µl'lik örnek alınarak TAE tamponundaki %2'lik agaroz jele 6X yükleme tamponu ile birlikte yüklendi. Ürün boylarını ölçebilmek için jele pUC- *mix* işaret örneği de yüklendi. Agaroz jele yüklenen örnekler 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. Jel transilüminatör kullanılarak UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi.

3.2.5. SSCP

Poliakrilamid Jelin Hazırlanışı

Önceden hazırlanmış olan poliakrilamid çözeltisinden 25 ml alınarak 25 µl APS ve 2.5 µl TEMED ile karıştırıldı. İki cam yüzey arasında hazırlanan 0.5 mm genişliğindeki boşluğa dökülerek jelin polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jel sırasıyla oda sıcaklığında, +4 °C'de ve yürütme tamponu sıcaklığında en az bir saat bekletildi.

Örneklerin Hazırlanışı

Agaroz jel elektroforezi ile amplifikasyonun gerçekleştiği görülen örnekler seçildi. 4 µl PZR ürünü 12 µl formamidli yükleme tamponu ile 1:4 oranında karıştırıldı. Örnekler 95 °C'de 10 dakika denatüre edildikten hemen sonra buz içine aktarıldı ve soğumaya bırakıldı.

Elektroforez

Sirkülatörlü soğutucuya bağlı dikey elektroforez cihazına yürütme tamponu ile yerleştirilen jele, denatüre örnekler yüklendi ve belirli bir voltajda örneklerin jel boyunca yürütmesi sağlandı. Yükleme tamponunda bulunan ve örnekle birlikte jele yüklenen brom fenol mavisini ve ksilen siyanol boyalarının yürüyüşleri, düzeneğin voltajı, direnci ve sıcaklığı takip edilerek elektroforez kontrol edildi. Belirli bir süre sonunda elektroforez işlemi durduruldu ve jeller boyama için elektroforez düzeneğinden alındı. (°C)

Tablo 3-2 : Üç bölge için kullanılan SSCP koşulları

Bölge	Ekzon	Jel yüzdesi	Gliserol İçeriği	Sıcaklık (°C)	Voltaj (volt)	Süre (saat)
1	1	8	10%	23	450	1,5
2	4	10	-	23	450	2
3	5	10	10%	25	500	1,5

Gümüş Boyama

Camdan ayrılan jelin sırasıyla A, B, C ve D çözeltilerinde hafif çalkalanarak boyanması sağlandı. C çözeltisi boyama sırasında taze olarak hazırlandı.

A- Başlangıçta 10X olarak hazırlanan ve saklanan A ve B çözeltilerinden bir jel için, 30 ml alınarak 270 ml distile suda 1X olacak şekilde sulandırıldı.

B- Jel, 300ml 1X A çözeltisinde 6 dakika çalkalanarak örneklerin tespiti sağlandı

C- Boyama işlemi için jel, 300 ml 1X B çözeltisinde 15 dakika çalkalandı

D- Taze hazırlanan 300 ml C çözeltisinde 15 dakika çalkalanan jel son olarak 300 ml'lik D çözeltisine aktarıldı

3.2.6. İstatistik Analizler

İstatistik analiz *SPSS for windows 10.0* istatistik paket programında yapıldı. Karşılaştırmalarda χ^2 , *Fisher exact test* ve *Hardy-Weinberg* eşitliği kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hasta Verileri

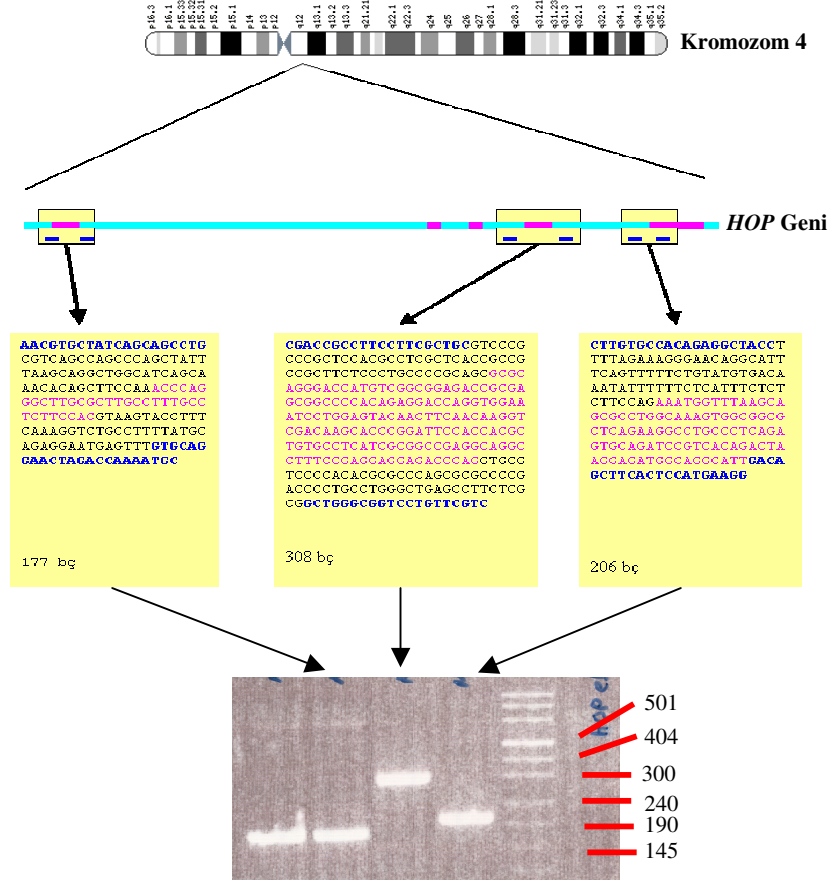
Çalışmada kullanılan hastalara ait klinik verilere göre, 50 HKM hastasından 25 tanesi (%50) non-obstrüktif (tıkaç oluşturmayan), 23 tanesi (%46) obstrüktif (tıkaç oluşturan) tiptedir (Tablo 4-1). Hipertrofi, obstrüktif olanlardan 18 tanesinde (%78) sub-aortik yerleşim gösterirken 2 tanesinde (%8,6) apikal, 2 tanesinde (%8,6) mid-ventriküler yerleşim göstermektedir. Hasta grubu 30 (%60) erkek ve 20 (%40) kadından oluşmaktadır. Yaş ortalaması kadınlarda 46,31, erkeklerde 41,74 olarak hesaplandı.

Tablo 4-1 : Hasta grubuna ait bazı klinik verilerin ve cinsiyetin dağılımı

		n	%
Hipertrofinin Tipi	Tıkaç Oluşturan	23	46
	Tıkaç Oluşturmayan	25	50
Aile Hikayesi	Var	34	68
	Yok	15	30
Ailede Ani Ölüm Hikayesi	Var	11	22
	Yok	37	74
Hipertrofinin Dağılımı	Konsentrik	6	12
	Asimetrik	36	72
Cinsiyet	Kadın	20	40
	Erkek	30	60

4.2 PZR Sonuçları

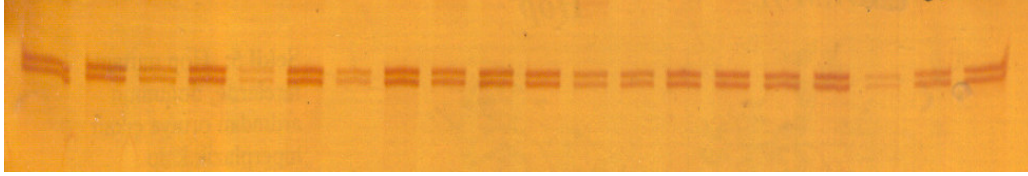
Her üç bölgenin PZR sonuçları agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: *HOP* geninin PZR ile incelenen ekzonları, genomik DNA üzerinde primerlerin bağlandığı yerler ve PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. Örnek 1 ve 2; ekzon1, örnek 3; ekzon 4, örnek 4; ekzon 5 (Kromozom 4; <http://www.ensembl.org>'dan)

4.3 SSCP ve Dizileme Sonuçları

Ekson1: İncelenen 50 HKM hastası ve 100 sağlıklı kontrolde, *HOP* geni birinci ekzonuna ait SSCP jeline görünüm farklılığı gözlenmedi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2- *HOP* geni 1. ekzonuna ait SSCP jel görüntüsü

Ekson 4: Hasta ve kontrol grubunda, ekzon 4'ün SSCP taraması sonucunda üç farklı bant görünümü (g1, g2, g3) tespit edildi (Şekil 4-3). Hasta ve kontrol grubundaki tüm örneklerde dağılım gösteren bu üç farklılık dışında, kontrol grubundaki bir örnekte dördüncü bir görünüm farklılığı (g4) belirlendi (Şekil 4-3).

SSCP jeline yürüyüş biçimi farklılık gösteren örneklerin dizilenmesi ile bu dört farklılığın, iki polimorfik değişiklikten kaynaklandığı anlaşıldı. Kontrol grubundaki değişikliği (g4) taşıyan örneğin dizilenmesi ile, ekzon 4'ün 3' komşuluğundaki intron içinde, daha önce tanımlanmış (rs4626270) bir G-A dönüşümü bulundu (Şekil 4-4). Kontrol grubunda yer alan örneğin, bu polimorfizmi homozigot (A/A) olarak taşıdığı görüldü.

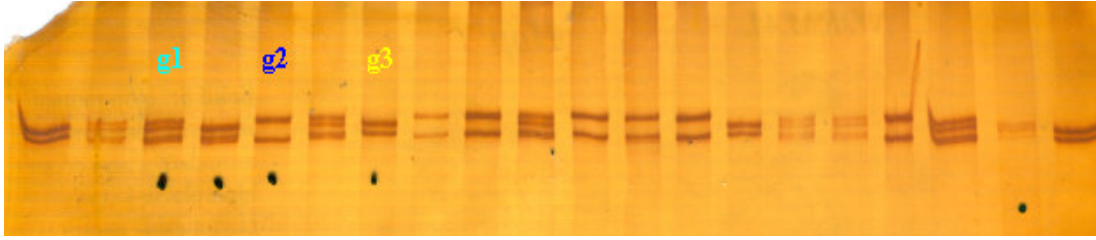
Diğer üç değişikliği (g1, g2 ve g3) taşıyan, seçilmiş bazı örneklerin dizilenmesi ile, ekzon 4'ün 5' komşuluğundaki intron içinde, 8 bazlık bir delesyon-insersiyon (8-bç D/I) polimorfizmi bulundu (Şekil 4-4). Bu polimorfizmin de daha önce tanımlanmış (rs11279383) olduğu görüldü. SSCP jeline gözlenen üç farklı bant değişikliğinin (g1, g2 ve g3), bu polimorfizmin oluşturduğu üç genotipi (I/I, I/D ve D/D) yansıttığı anlaşıldı (Şekil 4-4). Her iki grupta da bulunan ve poliakrilamid jelde gözlenebilen (Şekil 4-5) 8 bazlık D/I polimorfizmi, hasta ve kontrol grubundaki dağılımları ve hasta

grubuna ait bazı klinik verilere göre dağılımları SPSS programı kullanılarak karşılaştırıldı.

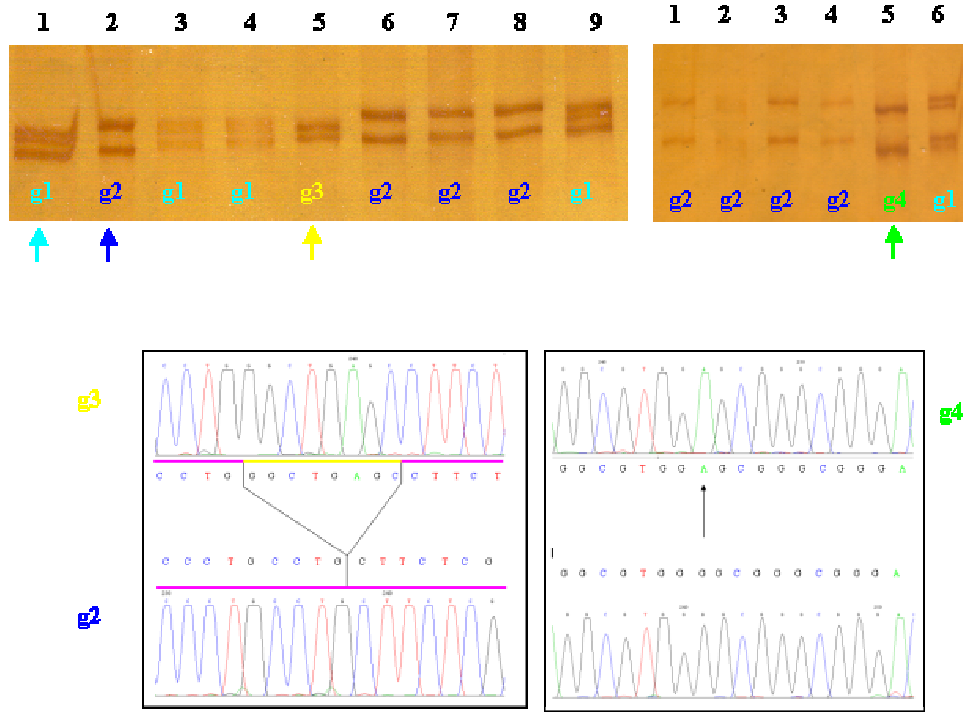
Daha önce tanımlanmış olduğu anlaşılan 8 bazlık D/I polimorfizminin, genotip (DD, DI ve II) dağılımı hasta ve sağlıklı grup arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 4-1).

Hipertrofinin tipi ve yerleşimi, hastanın cinsiyeti, aile hikayesinin ya da ailede ani ölüm hikayesinin varlığı gibi hasta verileri, D/I genotipi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür (Tablo 4-2).

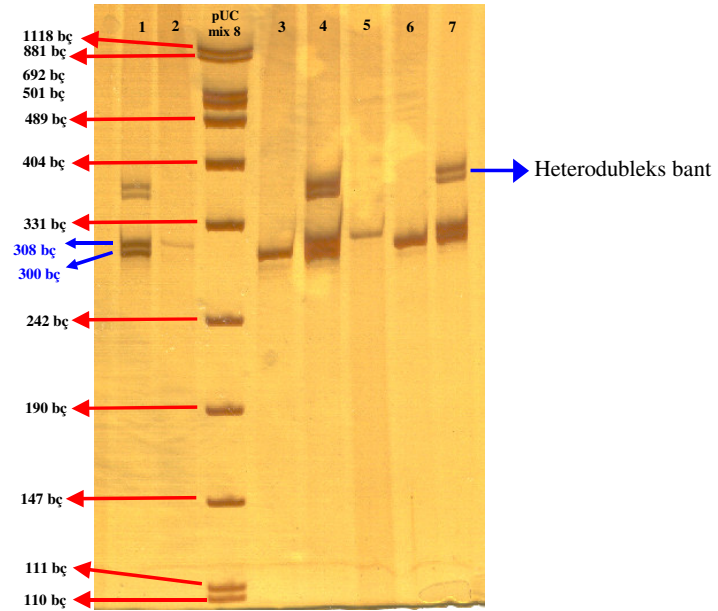
Hastanın cinsiyeti ve D allelinin varlığı arasında görülen olası zayıf ($p = 0,058$) ilişki nedeniyle genotip dağılımı, her iki cinsiyette ayrı olarak incelendi (Tablo 4-3 ve Tablo 4-4).



Şekil 4-3- HOP geni 4. eksonuna ait SSCP jel görüntüsü



Şekil 4-4- Ekzon 4 SSCP'sinde farklılık gösteren dört örneğin jeldeki görünüşleri ve dizileme sonuçları. G/A (sağ alt ve sağ üst) polimorfizmi (ters yönde dizileme) ve 8 bazlık delesyon (sol alt) /insersiyon (sol üst) polimorfizmi.



Şekil 4-5- 8 bazlık D/I polimorfizminin % 10'luk poliakrilamid jeldeki görünümü. Örnek 3 ve 6; D/D, örnek 2 ve 5; I/I, örnek 1, 4 ve 7; D/I genotipine sahiptir.

Tablo 4-2: Ekzon 4 yakınında bulunan, intron yerleşimli, 8 bazlık insersiyon / delesyon (8 bç I/D) polimorfizminin (rs11279383) genotip ve allel dağılımının iki çalışma grubu (Hasta/Sağlıklı) ile karşılaştırılması (I: İnsersiyon, D: Delesyon)

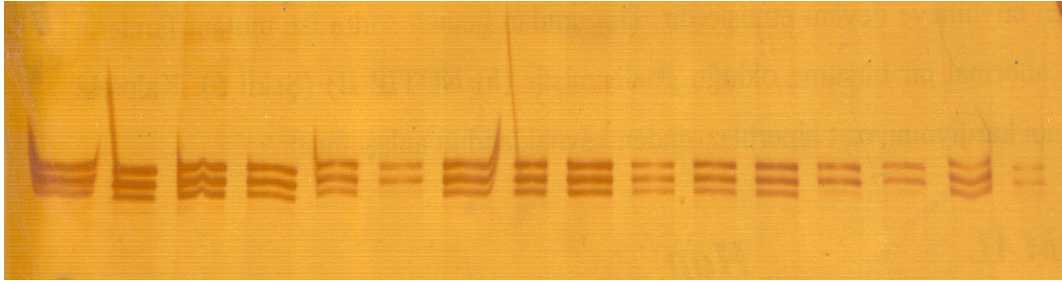
Grup		Genotip			p Değeri	I Alleli		p Değeri	D Alleli		p Değeri
		I/I	I/D	D/D		I/I+I/D	D/D		I/I	I/D+D/D	
Grup	Hasta	15	22	13	0.712	37	13	0.609	15	35	0.429
	Kontrol	24	46	30		70	30		24	76	

Tablo 4-3- 8 bç I/D polimorfizminin genotip ve allel dağılımının, bazı hasta verileri ile karşılaştırılması

		Genotip			p Değeri	I Alleli		p Değeri	D Alleli		p Değeri
		I/I	I/D	D/D		I/I+I/D	D/D		I/I	I/D+D/D	
Hipertrofinin Tipi	o*	8	11	4	0,174	19	4	0.147	8	15	0.412
	no*	6	10	9		16	9		6	19	
Ailede Hastalık Hikayesi	Yok	12	15	7	0,072	27	7	0.178	12	22	0.174
	Var	2	7	6		9	6		2	13	
Ailede Ani Ölüm Hikayesi	Yok	9	16	12	0,161	25	12	0.246	9	28	0.458
	Var	4	6	1		10	1		4	7	
Cinsiyet	Erkek	6	14	10	0.525	20	10	0.63	6	24	0.652
	Kadın	3	9	8		12	8		3	17	
Asimetrik Septal Hipertrofi	Yok	6	4	3	0.233	10	3	0.526	6	7	0.152
	Var	8	18	10		26	10		8	28	
Konsentrik Hipertrofi	Yok	11	19	11	0.662	30	11	0.645	11	30	0.672
	Var	3	3	2		6	2		3	5	

o* : obstrüktif (tıkaç oluşturan)
no* : non-obstrüktif (tıkaç oluşturmayan)

Ekzon 5: SSCP ile hasta ve kontrol grubunun taranması sonucunda *HOP* geni 5. ekzonunda farklılığa rastlanmadı (Şekil 4-6).



Şekil 4-6- *HOP* geni 5. ekzonuna ait SSCP jel görüntüsü

5. TARTIŞMA

HKM, sol ventrikül duvarında kalınlaşmayla belirgin, klinik bulguları ve gidişatı değişkenlik gösteren genetik bir hastalıktır. Hastalığın anlaşılmasında karşılaşılan en önemli sorun klinik bulgularındaki ve ilerleyişindeki değişkenlikten kaynaklanan heterojenitedir (115, 116). Klinik heterojenitenin, hastalığa neden olan mutant gene bağlı olduğunu gösteren net bir fenotip-genotip ilişkisi kurulamamıştır. Ancak bazı genlerdeki bazı mutasyonların, hastalığın ortaya çıkış yaşı (49, 117), ani ölüme neden olma olasılığı (118) ve hipertrofik kitlenin yerleşimi (119) gibi HKM değişkenleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mutant geni esas alan fenotip-genotip ilişkisi tüm olguları açıklayamadığı için, HKM'deki klinik heterojenitenin modifiye edici faktörlerden de etkilendiği kabul edilmektedir. Beslenme ve fiziksel etkinlik gibi çevresel modifiye edici faktörlerin yanında, mutant gen dışındaki genlerde bulunan ve kişinin genetik arka planını oluşturan polimorfik farklılıkların da modifiye edici faktör oldukları düşünülmektedir. HKM için modifiye edici gen adayları arasında yer alan ACE genindeki DD (Delesyon/Delesyon) genotipinin, hipertrofi ve ani kardiyak ölüm olasılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (116).

Modifiye edici genlerin varlığını gösteren en önemli delil, α MyHC (403/+) mutasyonu taşıyan fareler üzerinde yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (120). İnsandaki en önemli HKM nedeni olan α MyHC mutasyonlarından Arg403Gln değişiminin, iki ayrı fare soyunda hastalığı farklı oranlarda açığa çıkardığı görülmüştür. α MyHC (403/+) mutasyonunu taşıyan *I29SvEv* soyundan olan farelerin hepsinde (%100) sol ventrikül hipertrofisi gelişirken, aynı mutasyonu taşıyan *Black Swiss* soyundan olan farelerin yarısında (%50) sol ventrikül hipertrofisi geliştiği bildirilmiştir. Aynı mutasyonun iki ayrı fare soyunda farklı oranlarda hipertrofi geliştirmesi, iki soy arasındaki genetik farklılıklar ile açıklanmaktadır. Bu farklılıktan sorumlu olan modifiye edici gen ya da genler ise henüz tanımlanmamıştır (120).

HKM'deki klinik değişkenliği açıklayabilecek modifiye edici yeni gen adaylarının tanımlanması hastalığın daha iyi anlaşılmasını, dolayısıyla tanısını ve tedavisini kolaylaştıracaktır. Nörohümorale salgılar (katekolamin hormonları ve sitokinleri) ve aralarında ACE'nin de bulunduğu renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi HKM için, modifiye edici oldukları düşünülen genlerin ürünleridir. Kalpte bu salgıların bağlandığı, aynı zamanda HKM'de uygulanan tedavilerin hedefini oluşturan

reseptörleri (beta adrenoseptör, endotelin reseptörü) kodlayan genlerdeki polimorfik farklılıkların da HKM’de modifiye edici rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ancak bu genlerde henüz HKM ile ilişkili polimorfik değişiklikler tanımlanmamıştır (98).

Sağlıklı kalpte uyumsal bir yanıt olarak gelişen fizyolojik hipertrofi, genetik arka plana bağlı olarak kişiler arasında farklılık gösterebilir. Taşıdığı polimorfik değişiklikler nedeniyle hipertrofik yanıtın eşik değerini, süresini, şiddetini ya da sonlanma biçimini değiştirebilecek olan modifiye edici genler etkilerini, kardiyomiyopati hastalarda klinik bulgu farklılığı biçiminde yansıtabilir. Sağlıklı kişilerde ise aynı etki ağır fiziksel aktiviteye yatkınlık derecesi biçiminde yansıyabilir. Bu nedenle hipertrofik yanıt farklılığına neden olan modifiye edici genlerin belirlenmesi, yalnız HKM, DKM ve kalp yetmezliği gibi hipertrofi geliştiren kalp hastalıkları için değil, sağlıklı kişilerdeki spor yatkınlığını açıklayabilmek için de önem taşıyacaktır.

HKM’de ve diğer patofizyolojik durumlarda gelişen kardiyak hipertrofinin başlangıç, ilerleme ya da sonlanma aşamalarında görev alan GATA-4, NFAT, MEF2C ve SRF gibi transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler de, doğrudan kardiyak hipertrofi ile ilişkili bir mutasyon tanımlanmamıştır. Görevleri gereği iyi korunmuş oldukları için, hipertrofik transkripsiyon faktörlerinden çok, bu transkripsiyon faktörlerini denetleyen ve daha az korunmuş olan düzenleyici proteinlerin HKM için modifiye edici etki gösterdikleri söylenebilir.

Kardiyak hipertrofide, hem pro-hipertrofik hem de anti-hipertrofik genleri etkinleştirerek hipertrofik yanıtın düzenlenmesini sağlayan en önemli transkripsiyon faktörü SRF’dir. Yakın zamanda tanımlana *HOP* geni, SRF’nin DNA’ya bağlanmasını engelleyerek ya da HDAC’yi SRF’ye bağlayarak, kalpteki SRF’ye bağlı gen ifadesini baskılayan küçük bir düzenleyici protein kodlar. SRF’nin kardiyak hipertrofideki önemli görevi nedeniyle, SRF baskılayıcısı olan *HOP*’un da, temel bileşeni kardiyak hipertrofi olan HKM için modifiye edici gen adayı olabileceğini varsaydık.

HOP’un HKM için modifiye edici bir gen olduğu varsayımını sınamak için HKM tanısı almış ve bazı klinik verileri toplanmış hastalarda *HOP* genini incelemeyi planladık. Bilinen polimorfik farklılıklar dışında, bilinmeyen yeni mutasyonların bulunması amaçlandığı için gen SSCP yöntemi ile incelendi. HKM, kardiyak sarkomerin yapısal ya da kontraktıl proteinlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan bir hastalık olduğu için, sarkomerle ilişkisiz, çekirdek yerleşimli bir protein olan *HOP*’ta,

HKM nedeni olabilecek mutasyonların bulunma olasılığı düşüktür. *HOP* geninde, düşük de olsa HKM ile nedensel ilişkisi olan bir mutasyon bulunabileceği için, HKM hastaları ile birlikte sağlıklı kişiler de incelendi.

Modifiye edici bir gendeki polimorfizmlerin, ilgili hastalığın fenotipini, gen ürününde yapısal (nitel) ya da miktarsal (nicel) bir değişikliğe neden olarak etkilediği düşünülmektedir. Protein ürününde miktarsal değişikliğe neden olabilecek polimorfizmlerin, genellikle genin promotöründe ya da protein kodlamasına katılmayan bölgelerinde, yapısal değişikliğe neden olabilecek polimorfizmlerin ise protein kodlamasına katılan ekzon bölgelerinde yerleştiği kabul edilmektedir. HKM için modifiye edici gen olduğunu düşündüğümüz *HOP* geninde, öncelikle gen ürününde yapısal değişikliğe neden olabilecek polimorfizmleri bulmayı amaçladık. Bu nedenle genin protein kodlamasına katılan bölgelerinin bulunduğu iki ekzonu SSCP ile taradık. Ayrıca, genin kalpteki transkriptindeki 5' UTR bölgesini kodlayan ekzon da incelendi.

Çalışma sonucunda, gen ürününde yapısal değişikliğe neden olabilecek bir mutasyon bulunmadı. Kodlama bölgesi dışında iki polimorfik değişiklik belirlendi. Her ikisi de 4. ekzona yakın yerleşim gösteren polimorfizmlerden biri, ekzonun 5' komşuluğundaki intronda (-42 bç), diğeri 3' komşuluğundaki intronda (+42 bç) bulunmaktadır.

Ekzonun 42 baz sonrasında (+42 bç 3' yönünde) yerleşik bulunan 8 bazlık D/I polimorfizminin hasta ve sağlıklı gruptaki dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmaması (Tablo 3), bu polimorfizmin HKM ile nedensel bir ilişkisi olmadığını düşündürmektedir. D/I polimorfizminin olası modifiye edici etkisini anlamak için ise, hastaların genotipi ile bazı klinik veriler karşılaştırıldı (Tablo 4). Hipertrofinin tipi ve dağılımı, hastanın cinsiyeti, ailesinde hastalık ve ani ölüm hikayesinin varlığı gibi verilerle D/I polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi.

Ekzonun 42 baz öncesinde (-42 bç 5' yönünde) yerleşik bulunan G/A polimorfizmi yalnız bir kontrol örneğinde homozigot AA biçiminde bulunmuştur. Uluslararası HAPMAP çalışmasında ise AA genotip sıklığı, farklı toplumlarda %11 ile % 47 arasında hesaplanmıştır. Elimizdeki çalışma grubunda AA genotip sıklığının bu kadar düşük bulunması, kullandığımız SSCP yönteminin duyarlılığına bağlı olabilir. Bu

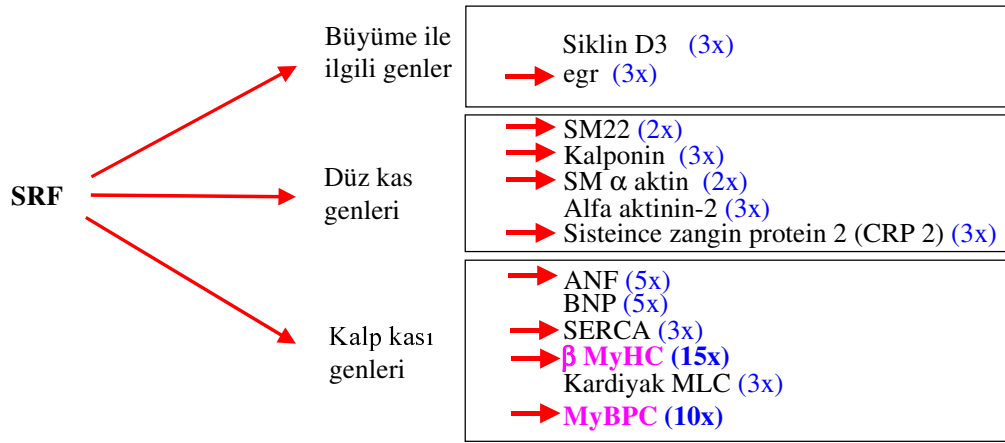
nedenle, Türk toplumundaki G-A allel ve genotiplerinin gerçek sıklığını ancak RFLP ya da allel spesifik PZR gibi yöntemler kullanılarak hesaplanabilir.

Bu çalışmada, HKM için modifiye edici gen adayı olduğunu düşündüğümüz *HOP*'un üç ekzonu SSCP yöntemi ile incelenmiş, protein yapısını değiştirecek bir mutasyon ya da polimorfizm bulunmamıştır. Protein miktarını değiştirebilecek mutasyonların bulunabileceği bölgeler ise bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Ancak, dilate kardiyomiyopati hastalarında gelişen kalp yetmezliğinde, SRF uyarıcısı olan *myocardin* düzeyi artarken SRF baskılayıcısı *HOP*'un azalması (114) ve bazı tümörlerde *HOP* miktarının artmış (27) ya da azalmış (6, 8) olması, *HOP*'un işlevinde yapısal değişikliklerden çok miktarsal değişikliklerin daha önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle HKM'de, varsa *HOP*'un modifiye edici etkisi, genin transkripsiyonunu düzenleyen bölgelerindeki polimorfik değişikliklerin sonucu olabilir. Gen ürünündeki miktarsal değişikliğin incelenmesi biyopsi örneklemesini veya hücre kültürünü gerektirdiği için, çalışmamız gen ürünündeki yapısal değişiklikleri araştırmakla sınırlanmıştır. Çalışmamızın sonraki aşamasında, bulduğumuz intronik polimorfizmlerin RFLP gibi daha duyarlı yöntemlerle incelenmesini ve elde edilen genotip dağılımının daha ayrıntılı verilerle istatistik analizini amaçladık.

Hop mutant (Hop-/-) farelerin kalbinde ifadesi artan genler incelendiğinde, çoğunun SRF'nin hedef genleri arasında olduğu görülmektedir (Şekil 5-1) (4). Bu genlerden beta miyozin ağır zinciri (β MyHC) ve miyozin bağlayıcı protein C (MyBPC) genlerinin ifadesinde sırasıyla 15 ve 10 kat artış olması dikkat çekicidir. Bu iki gendeki mutasyonların, en sık rastlanan HKM nedeni olduğu (98,100) göz önüne alınırsa, bu genlerden birinde mutasyon taşıyan HKM hastalarında, *HOP* genindeki olası başka bir mutasyon mutant protein (β MyHC veya MyBPC) üretimini (15x ve 10x), dolayısıyla hastalık fenotipini önemli ölçüde etkileyecektir.

İleride promotor bölgesinin ve diğer düzenleyici bölgelerinin incelenmesiyle, *HOP* geninin HKM ya da kalp yetmezliği gibi kardiyak hipertrofi ilişkili diğer hastalıklarındaki rolü daha iyi anlaşılacaktır. Ayrıca, daha geniş klinik verileri bulunan HKM hastalarında, ya da HKM dışındaki başka hasta gruplarında *HOP*'un incelenmesi ile farklı sonuçlara ulaşılabilir. *Hop* mutant farelerde QT aralığının uzamış olması (32) ve HKM hastalarında QT uzamasına bağlı ani kalp ölümlerinin sık olması (121, 122)

HOP'un, özellikle HKM'deki ani ölüm hikayesi ile ilişkili olabileceğini akla getirmektedir. Aritmi hastalarında ya da *NKX2-5* mutasyonlarının neden olduğu atrioventriküler blok (123) hastalarında da *HOP*'un incelenmesi anlamlı olabilir. *Nkx2-5*, kalp ileti sisteminin proksimal (atrioventriküler düğüm) kısmı için gerekli olduğu halde, *Nkx2-5*'in hedef genlerinden biri olan *Hop*, kalp ileti sisteminin distal (*His* demeti sonrası) kısmı için gereklidir (32). Bu da *HOP*'un, distal ileti sistemini tutan ve atrioventriküler blok kadar ağır olmayan aritmilerde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5-1: Hop mutant farelerde ifadesi artan genler. SRF hedefi olduğu bilinen genler kırmızı ok ile, genlerin ifadesindeki artış oranları mavi parantez içinde gösterilmiştir. (Kaynak 4'den düzenlendi)

HOP genindeki mutasyon veya polimorfizmlerin incelenmesi, genin hastalıklarla ilişkisinin açıklanmasında yararlı olabileceği gibi, *HOP*'ın fonksiyonel çalışmalarla incelenmesi de ilgili hastalıkların tedavisinde yararlı olabilir. Son yıllarda, kardiyak hipertrofi tedavisinde HDAC inhibitörlerinin kullanımı gündeme gelmiştir (35). Ancak HDAC'lerin yaygın ifade ediliyor olması nedeniyle bu tedavi henüz uygulanamamaktadır. İleride, HDAC2'nin kalp kasındaki etkisine aracılık yapan *HOP*'un hedef alındığı bir yöntemin geliştirilmesi, kardiyak hipertrofi tedavisinde yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

- 1 - Hoegg S, Meyer A. Hox clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet.* 2005; **21**:421-4.
- 2- Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet.* 2006; **22**:67-9.
- 3- Chen F, Kook H, Milewski R, Gitler AD, Lu MM, Li J, ve ark. Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell.* 2002; **20**; **110**: 713-23.
- 4- Shin CH, Liu ZP, Passier R, Zhang CL, Wang DZ, Harris TM, ve ark. Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell.* 2002; **110**:725-35.
- 5- Adu J, Leong FT, Smith NR, Leek JP, Markham AF, Robinson PA, Mighell AJ. Expression of mOb1, a novel atypical 73 amino acid K50-homeodomain protein, during mouse development. *Mech Dev.* 2002;119 Suppl 1:S43-7. *Gene Expr Patterns*; **2**:39-43
- 6- Asanoma K, Matsuda T, Kondo H, Kato K, Kishino T, Niikawa N, ve ark. NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene that encodes a homeodomain consensus motif. *Genomics.* 2003; **81**:15-25.
- 7- Muhlfriedel S, Kirsch F, Gruss P, Stoykova A, Chowdhury K. A roof plate-dependent enhancer controls the expression of Homeodomain only protein in the developing cerebral cortex. *Dev Biol.* 2005; **283**:522-34.
- 8- Chen Y, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Pietas A, Petersen I. Identification of a novel homeobox-containing gene, LAGY, which is downregulated in lung cancer. *Oncology.* 2003; **64**:450-8.

- 9- Hamamori Y, Schneider MD. HATs off to Hop: recruitment of a class I histone deacetylase incriminates a novel transcriptional pathway that opposes cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2003;**112**:824-6.
- 10- Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, Lu MM, Wing-Man Yung W, Mackay J, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest.* 2003;**112**:863-71.
- 11- Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;**35**:577-93.
- 12- Cen B, Selvaraj A, Prywes R. Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem.* 2004;**93**:74-82.
- 13- Gineitis D, Treisman R. Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol Chem.* 2001;**276**:24531-9.
- 14- Camoretti-Mercado B, Dulin NO, Solway J. Serum response factor function and dysfunction in smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;**137**:223-35.
- 15- Wang DZ, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;**14**:558-66.

- 16- Zhang X, Azhar G, Zhong Y, Wei JY. Identification of a Novel Serum Response Factor Cofactor in Cardiac Gene Regulation. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 55626 - 55632.
- 17- Yoshida T, Sinha S, Dandre F, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, Kremer BE ve ark. Myocardin is a key regulator of CArG-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circ Res.* 2003;**92**:856-64.
- 18- Spencer JA, Misra RP. Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites. *J Biol Chem.* 1996;**271**:16535–16543.
- 19- Ramirez S, Ait-Si-Ali S, Robin P, Trouche D, Harel-Bellan A. The CREB-binding protein (CBP) cooperates with the serum response factor for transactivation of the c-fos serum response element. *J Biol Chem.* 1997; **272**:31016–21.
- 20- Kasza A, O'Donnell A, Gascoigne K, Zeef LA, Hayes A, Sharrocks AD. The ETS domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF. *J Biol Chem.* 2005;**280**:1149-55.
- 21- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;**11**:497-504.
- 22- Dai YS and Markham BE. p300 functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *J Biol Chem.* 2001; **276**:37178–85
- 23- Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002;**277**:24390–8.

- 24- Legube G, Trouche D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* 2003;**4**:944-7.
- 25- Carrozza MJ, Utlely RT, Workman JL, Cote J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 2003;**19**:321-9.
- 26- Lemaire F, Millon R, Muller D, Rabouel Y, Bracco L, Abecassis J, Wasylyk B. Loss of HOP tumour suppressor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2004;**91**:258-61.
- 27- Pauws E, Sijmons GG, Yaka C, Ris-Stalpers C. A novel homeobox gene overexpressed in thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2004;**14**:500-5.
- 28- Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2001;**28**:220-1.
- 29- 23-Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, Prywes R. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol.* 2003;**23**:6597-608.
- 30- Chen H, Shi S, Acosta L, Li W, Lu J, Bao S, et al. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 2004;**131**:2219-31.
- 31- Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell.* 2005;**8**:85-95.

- 32- Ismat FA, Zhang M, Kook H, Huang B, Zhou R, Ferrari VA, ve ark Homeobox protein Hop functions in the adult cardiac conduction system. *Circ Res.* 2005;**96**:898-903.
- 33- Frey N, Olson EN, Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003; **65**: 45–79.
- 34- Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation.* 2004;**109**:1580-9.
- 35-. McKinsey TA, Olson EN. Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound. *Trends Genet.* 2004;**20**:206-13.
- 36- Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, ve ark Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; **278**: H1695–H1707.
- 37- Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev.* 2003;**17**:1937-56.
- 38- Molkenin JD ve Dorn II, IG. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 2001;**63**:391–426.
- 39- Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 1999;**341**:1276-83.
- 40- Zwadlo C, Borlak J. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;**207**:244-56.

- 41- Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2004;**63**:500-9.
- 42- Jalili T, Takeishi Y. ve Walsh RA. Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of Gαq, PLCβ1, and PKC, *Cardiovasc. Res.* 1999, **44**:5–9.
- 43- Adams JW, Sakata Y, Davis MG, ve ark Enhanced G alpha q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**: 10140–10145.
- 44- ABrancaccio M, Fratta L, Notte A, ve ark Melusin, a muscle-specific integrin beta(1)-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med.* 2003; **9**: 68–75
- 45- Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, ve ark The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 2002; **111**: 943–955.
- 46- Frey N, Richardson JA, Olson EN. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; **97**: 14632–14637.
- 47- Noji Y, Shimizu M, Ino H, Higashikata T, Yamaguchi M, Nohara A, ve ark Increased circulating matrix metalloproteinase-2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy with systolic dysfunction. *Circ J.* 2004;**68**:355-60.
- 48- Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, ve ark. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003;**108**:1455-60.
- 49- Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;**6**:185-216.

- 50- Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, ve ark Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2005;**39**:1570-80.
- 51- Fischer TA, Ludwig S, Flory E, Gambaryan S, Singh K, Finn P, ve ark Activation of Cardiac c-Jun NH2-Terminal Kinases and p38-Mitogen-Activated Protein Kinases With Abrupt Changes in Hemodynamic Load. *Hypertension* 2001; **37**: 1222-8.
- 52- Braz JC, Bueno OF, Liang Q, Wilkins BJ, Dai Y, Parsons S ve ark Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J Clin Invest.* 2003; **111**:1475–86.
- 53- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, ve ark The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice.*EMBO J.* 2000;**19**:6341-50.
- 54- 44-Dorn GW II, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 2003; **92**: 1171–5.
- 55- Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2003; **92**: 1079–1088.
- 56- Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, ve ark Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;**98**: 3328–3333.
- 57- Haq S, Choukroun G, Kang ZB, ve ark Glycogen synthase kinase-3 β is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol.* 2000; **151**: 117–130.

- 58- Antos CL, McKinsey TA, Frey N, ve ark Activated glycogen synthase kinase-3 β suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**: 907–912.
- 59- Cook SA, Novikov MS, Ahn Y, Matsui T, Rosenzweig A. A20 is dynamically regulated in the heart and inhibits the hypertrophic response. *Circulation* 2003;**108**:664–7.
- 60- Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, ve ark Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**: 669–674.
- 61- Kusumoto K, Haist JV, Karmazyn M. Na⁺/H⁺ exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; **280**: H738–H745.
- 62- Whalen RG, Sell SM, Butler-Browne GS, Schwartz K, Bouveret P, Pinset-Harstom I. Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 1981;**292**:805–9.
- 63- Houweling AC, van Borren MM, Moorman AF, Christoffels VM. Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovasc Res*. 2005;**67**:583-93.
- 64- Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, Baba HA, Bubikat A, Begrow F, ve ark Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J. Clin. Invest*. 2003;**111**:1399–1407.
- 65- van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res*. 2004;**61**:218-26.

66- Asakawa M, Takano H, Nagai T, ve ark Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*. 2002; **105**: 1240–1246.

67- Sepulveda JL, Vlahopoulos S, Iyer D, Belaguli N, Schwartz RJ. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem* 2002;**277**: 25775–82.

68- Bushdid PB, Osinska H, Waclaw RR, Molkenin JD, Yutzey KE. NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ Res*. 2003;**92**:1305-13.

69- Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkenin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:7460–9.

70- Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. 2004;**63**:196-207.

71- Morisco C, Seta K, Hardt SE, ve ark Glycogen synthase kinase 3 beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 28586–28597.

72- Molkenin JD, Lu J-R, Antos CL, ve ark A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998; **93**: 215–228.

73- Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, ve ark Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 2002;**105**:2265–9.

74- Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, ve ark. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathologic, but not physiologic cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2004;**94**:110–8.

- 75- Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, ve ark Inhibition of calcineurin–NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**: 11363–11368.
- 76- Leinwand LA. Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**: 2947–2949.
- 77- Zou Y, Hiroi Y, Uozumi H, ve ark Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2001; **104**: 97–101.
- 78- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Signaling chromatin to make muscle. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2002;**14**:763–72.
- 79- Black BL ve Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*. 1998;**14**:167–196.
- 80- Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, ve ark CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*. 2000;**105**:1395-406.
- 81- Berger I, Bieniossek C, Schaffitzel C, Hassler M, Santelli E, Richmond TJ. Direct interaction of Ca²⁺/ histone deacetylase 5 repressor core binding to myocyte enhancer factor 2. *J. Biol Chem*. 2003;**278**:17625–35.
- 82- Youn HD, Grozinger CM, Liu JO. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem*. 2000;**275**:22563–7.

- 83- Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, ve ark MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol.* 1999; **9**: 1203–1206.
- 84- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci.* 2002; **27**: 40–47.
- 85- Nelson TJ, Balza R Jr, Xiao Q, Misra RP. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;**39**:479-89.
- 86- Thuerauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, DeMartin KM, McDonough PM, ve ark p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 20636–43.
- 87- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 1999;**98**:159–69.
- 88- Montaner S, Perona R, Saniger L ve Lacal JC. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappa B and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem.* 1999;**274** :8506–15.
- 89- Davis FJ, Gupta M, Camoretti-Mercado B, Schwartz RJ, Gupta MP. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem.* 2003;**278**:20047–58.

- 90- Chang J, Wei L, Otani T, Youker K, Entman M, Schwartz R J, Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation* 2003; **108**: 407–13.
- 91- Belaguli NS, Zhou W, Trinh TH, Majesky MW, Schwartz RJ, Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 4582–91.
- 92- Ellis PD, Martin KM, Rickman C, Metcalfe JC, Kemp PR. Increased actin polymerization reduces the inhibition of serum response factor activity by Yin Yang 1. *Biochem J.* 2002;**364**:547–554.
- 93- Groisman R, Masutani H, Leibovitch MP, Robin P, Soudant I, Trouche D, Harel-Bellan A. Physical interaction between the mitogen-responsive serum response factor and myogenic basic-helix-loop-helix proteins. *J Biol Chem.* 1996;**271**:5258–64.
- 94- Morin S, Paradis P, Aries A, Nemer M. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol.* 2001;**21**:1036–44.
- 95- Itoh S, Katoh Y, Konishi H, Takaya N, Kimura T, Periasamy M, Yamaguchi H. Nitric oxide regulates smooth-muscle-specific myosin heavy chain gene expression at the transcriptional level-possible role of SRF and YY1 through CArG element. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001;**33**:95–107.
- 96- Kook H, Epstein JA. Hopping to the beat. Hop regulation of cardiac gene expression. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;**13**:261-4.

97- Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, ve ark Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 2002;**110**: 479–488.

98- Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, ve ark Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. American College of Cardiology; Committee for Practice Guidelines. European Society of Cardiology. American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**42**:1687-713.

99- Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*. 2002;**82**:945-80.

100- Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002;**287**:1308-20.

101- Klues HG, Schiffers A, Maron BJ. Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol* 1995;**26**:1699–1708.

102- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, ve Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation*. 1995;**92**:785-789.

103- Takagi E, Yamakado T, Nakano T. Prognosis of completely asymptomatic adult patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1999;**33**:206–211.

- 104- Maron BJ, Casey SA, Poliac LC, Gohman TE, Almquist AK, Aeppli DM. Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy in a regional United States cohort. *JAMA*. 1999;**281**:650–655.
- 105- Maki S, Ikeda H, Muro A, Yoshida N, Shibata A, Koga Y, Imaizumi T. Predictors of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;**82**:774–8.
- 106- Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1997;**336**:775–785.
- 107- Paz R, Jortner R, Tunick PA, Sclarovsky S, Eilat B, Perez JL, Kronzon I. The effect of the ingestion of ethanol on obstruction of the left ventricular outflow tract in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1996;**335**:938–941.
- 108- Nicod P, Polikar R, Peterson KL. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *N Engl J Med*. 1988;**318**:1255-7.
- 109- 84. Varnava AM, Elliott PM, Mahon N, Davies MJ, McKenna WJ. Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2001;**88**:275-9.
- 110- Schwartzkopff B, Mundhenke M, Strauer BE. Alterations of the architecture of subendocardial arterioles in patients with hypertrophic cardiomyopathy and impaired coronary vasodilator reserve: a possible cause for myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**:1089–96.
- 111- Semsarian C, Ahmad I, Giewat M, Georgakopoulos D, Schmitt JP, McConnell BK, et al. The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J Clin Invest*. 2002;**109**:1013-20.

- 112- Nagueh SF, McFalls J, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, ve ark Tissue Doppler imaging predicts the development of hypertrophic cardiomyopathy in subjects with subclinical disease. *Circulation*. 2003;**108**:395-8.
- 113- Zhang X, Azhar G, Chai J, Sheridan P, Nagano K, Brown T, ve ark Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;**280**:H1782-92.
- 114- Torrado M, Lopez E, Centeno A, Medrano C, Castro-Beiras A, Mikhailov A. Myocardin mRNA is augmented in the failing myocardium: expression profiling in the porcine model and human dilated cardiomyopathy. *J Mol Med*. 2003;**81**:566-77.
- 115- Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*. 1998;**32**:825-30.
- 116- Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, ve ark Angiotensin I-converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; **92**: 1808–1812.
- 117- Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, ve ark Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998;**338**:1248-57.
- 118- Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A, ve ark Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2000;**36**:2212-8.
- 119- Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001;**104**:557-67.

120- McConnell BK, Fatkin D, Semsarian C, Jones KA, Georgakopoulos D, Maguire CT, ve ark Comparison of two murine models of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2001;**88**:383-9.

121- Cuomo S, Marciano F, Migaux ML, Finizio F, Pezzella E, Losi MA, Betocchi S. Abnormal QT interval variability in patients with hypertrophic cardiomyopathy: can syncope be predicted? *J Electrocardiol.* 2004;**37**:113-9.

122- G. Yi, P. Elliott, W.J. McKenna ve ark., QT dispersion and risk factors for sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1998;**82**:1514-1519

123- Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Akazawa H, Mizukami M, ve ark. Functional analyses of three Csx/Nkx-2.5 mutations that cause human congenital heart disease. *J Biol Chem.* 2000;**275**:35291-6.

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi: 08.09.2004
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon
Toplantı Sayısı:08
Prof.No.Sayısı :

Sorumlu araştırmacılığını Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nihan Erginel Ünaltuna'nın,üstlendiği Biyolog Çağrı Güleç'in yürüteceği "Hipertrofik Kardiyomyopati Hastalarda HOP (Homeodomain Only Protein) Gen Mutasyonlarının Analizi" başlıklı tek merkezli (tanı testi geliştirmeye yönelik) çalışması kurulumuzda incelendi ve araştırma fonundan desteklendiği takdirde,etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü,uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr.Deniz **SARGIN**

Prof.Dr.Mübeccel **DEMİRKOL** *M. Demirel*

Prof.Dr.Berrin **UMMAN** *Berrin Ummann*

Prof.Dr.Cahide **GÖKKUŞU** *Cahide Gökkuşu*

Prof.Dr.Koray **ACARLI**

Prof.Dr.Selim **BADUR**

Prof.Dr.Aykan **CANBERK** *Aykan Canberk*

Prof.Dr.Emin **DARENDELİLER**

Prof.Dr.Beyhan **ÖMER** *Beyhan Ömer*

Prof.Dr.Oğuzhan **ÇOBAN** *Oğuzhan Çoban*

Prof.Dr.Veli **UYSAL** *Veli Uysal*

Prof.Dr.Kamil **PEMBECİ** *Kamil Pembeci*

Prof.Dr.Nuran **YILDIRIM** *Nuran Yıldırım*

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Çalışmanın Kapsamı:

Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden öncelikle 10 ml periferik kan örneği alınacaktır. Alınan kan örneğinde DNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.

Araştırılacak olan hastalığa neden olduğu düşünülen gende mutasyon, polimorfizm taraması yapılacaktır. Böylece, hastalığın ilgili gendeki mutasyonlarla muhtemel ilişkisi araştırılmış olacaktır.

Araştırmadan beklenen tıbbi yarar, hastalığın erken tanısının ve ailesel genetik taramaların mümkün olabileceğidir.

Araştırma kapsamında yapılan çalışmaların süresi kesin değildir ve sonucunda tedaviye yönelik cevap elde edilmeyebilir.

Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizin psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

Elde edilen genetik bilgi sonuçları şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacak olup, sadece size ve hekiminize bildirilecek, üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

Araştırmada, 50 Hipertrofik kardiyomiyopati hastası ile 100 sağlıklı gönüllü yer alacaktır.

Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden maddi destek talep edilmeyecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla sözkonusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağrı	Soyadı	Güleç
Doğ.Yeri	Zonguldak	Doğ.Tar.	29.08.1973
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	57670555088
Email	cagrigulec@hotmail.com	Tel	0212 414 22 00-33316

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ortak Programı	
Lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1995
Lise	Ödemiş Lisesi	1991

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laborant	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fikret Biyal Acil Biyokimya Lab.	2002-

Yabancı Dilleri	Okuduğunuz Anlama*	Konuşma *	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	zayıf	orta	ÜDS-65	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin