

**FILİZ GÜÇLÜ**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2006**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TROPONİN T GEN MUTASYONLARININ TÜRK  
POPULASYONUNDAKİ DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ  
HASTALARDA TARANMASI**

**BİO. FİLİZ GÜÇLÜ**

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

**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK ORTAK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2006**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TROPONİN T GEN MUTASYONLARININ TÜRK  
POPULASYONUNDAKİ DİLATE KARDİYOMİYOPATİLİ  
HASTALARDA TARANMASI**

**BİO. FİLİZ GÜÇLÜ**

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

**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK ORTAK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2006**

**TEZ ONAYI**

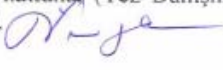




Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans / Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Genetik Ortak Programı  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( X )                      Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Genetik Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Filiz Güçlü  
Tez Başlığı : Troponin T Gen Mutasyonlarının Türk Populasyonundaki Dilate Kardiyomyopati Hastalarda Taranması  
Sınav Yeri : İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)  
Sınav Tarihi : 03.07.06

**Tez Sınav Jürisi**

1. Prof. Dr. Nihan Erginel – Ünaltuna, (Tez Danışmanı), İst.Üniv., Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik AD. 
2. Prof. Dr. Funda Öztunç, İst.Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. 
3. Prof. Dr. Beyhan Tüysüz, İst.Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. 
4. Prof. Dr. Şükrü Palandüz, İst.Üniv., İstanbul Tıp Fak. İç Hast. AD. 
5. Prof. Dr. Vedat Sansoy, İst.Üniv., Kardiyoloji Enstitüsü 

**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.

FİLİZ GÜÇLÜ



*Canım Anne ve Babam'a*

## TEŞEKKÜR

Akademik kariyerde bir adım olan Yüksek lisans eğitimimin gerçekleşmesindeki katkısı, tez aşamasında verdiği bilgi ve destek için, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nihan ERGİNEL-ÜNALTUNA'ya

Tezim için hasta grubunun oluşturulmasında destek veren Sayın Prof. Dr. Funda ÖZTUNÇ'a ve Doç Dr. Tevfik DEMİR'e

Tez konumun belirlenmesinde ve deneysel tecrübemi kazanmamda destek sağlayan Dr. Mehveş PODA'ya,

DNA bankasını benimle paylaşan ve tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen Uz. Tib. Bio. A. Evrim BAYRAK'a

Bu çalışmanın her aşamasında verdikleri fikir ve gösterdikleri destek için Uz. Bio. Neslihan ABACI'ya, Tib. Bio. Çağrı GÜLEÇ'e, ve bütün çalışma arkadaşlarıma,

Tezimin her aşamasında, laboratuvar içinde ve dışında beni yalnız bırakmayan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen canım arkadaşım Bio. Neslihan ÇOBAN'a

Tez aşamasında benden sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen dostlarım Dr. Gülay ÖZGÖN'e, Zehra DURAN'a ve Arzu AKIN'a

Bana sonsuz sabır gösteren ve hiçbir zaman desteklerini eksik etmeyen annem Kezban GÜÇLÜ'ye ve babam Kazım GÜÇLÜ'ye

*Teşekkür ve Şükranlarımı Sunarım...*

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-534/21102004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

## 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 .....	2
2.1.Kardiyomiyosit Yapısı ve Hücresel Fizyolojisi .....	2
2.1.1 Sarkomerin yapısı ve sarkomerik hücre iskeleti proteinleri.....	3
2.1.2 Ekstrasarkomerik hücre iskeleti proteinleri .....	6
2.2.Kalp Kasılmasının Moleküler Mekanizması .....	7
2.3. Kardiyak Troponin T Proteinini.....	9
2.3.1 Troponin T'nin Kas Kasılmasındaki Rolü .....	13
2.4 TNNT2 Geni .....	14
2.4.1 TNNT2 gen mutasyonları .....	15
2.5 Dilate Kardiyomiyopati (DKM) .....	16
2.5.1 Tanımı ve Prevalansı.....	16
2.5.2 Septomları .....	17
2.5.3 Etiyolojisi .....	17
2.5.4 Tanısı ve sınıflandırılması.....	18
2.6 DKM ile ilişkili genler ve kromozomal lokusları .....	20
2.7 Ailesel Dilate Kardiyomiyopati .....	23
2.7.1 Otozomal dominant kalıtmı olanlar .....	23
2.7.2 X'e Bağlı Kalıtımı olanlar.....	23
2.7.3 Otozomal resesif kalıtmı olanlar .....	23
2.7.4 Mitokondriyal kalıtmı olanlar .....	24

2.8 Dilate Kardiyomiyopatide TNNT2 Gen Mutasyonları .....	24
2.9 Genotip-Fenotip İlişkisi .....	25
2.10 DKM' nin patofizyolojisi.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1 Gereçler.....	31
3.1.1 Hasta Grubu .....	31
3.1.2 Kontrol Grubu.....	31
3.1.3 Bilgilendirilmiş Onay Formu .....	32
3.1.4 Onay Formu .....	33
3.1.5. Kimyasallar .....	34
3.1.7 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	36
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1 Periferik kandan DNA izolasyonu .....	41
3.2.2 DNA konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü .....	41
3.2.3 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	42
3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi .....	44
3.2.5 Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi / SSCP (Single Strand Conformation polymorphism-).....	45
3.2.7 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Mutasyon Taraması.....	47
3.2.6. Dizileme Analizi .....	48
4. BULGULAR.....	49
5. TARTIŞMA .....	56
KAYNAKLAR .....	63
FORMLAR .....	72
ETİK KURUL KARARI .....	74
ÖZGEÇMİŞ .....	75

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: DKM'ye neden genlerin listesi. ....	22
Tablo 3-1: TNNT2 geni 10. ve 13. ekzonların PZR primer çiftleri.....	43
Tablo 3-2: TNNT2 geni 10. ve 13. ekzonlarının PZR koşulları. ....	43
Tablo 3-3: SSCP taraması için poliakrilamid jel konsantrasyonları ve yürüme şartları. 46	
Tablo 3-4: <i>Hpa II</i> restriksiyon enzim kesimi şartları.....	47
Tablo 4-1: DKM hastalarının klinik bulguları.....	55
Tablo 4-2: EKO parametrelerinin hasta grubunda dağılımı.....	55

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kalp kasının boyutuna kesiti.....	2
Şekil 2-2: Aktin ve miyozin filamentlerinin şematik görünümü.....	3
Şekil 2-3: Sarkomerin şematik görünümü.....	5
Şekil 2-4: Kalp kasılmasının şematik görünümü.....	8
Şekil 2-5: Troponin kompleksi ve troponin T.....	9
Şekil 2-6: Kardiyak Troponin T izoformları. ve izoformların ekzon dağılımı.....	10
Şekil 2-7: Troponin T izoformları ve kardiyak troponin T' izoformlarının ekspresyon düzeyleri.....	11
Şekil 2-8: TNNT2 geni ekzonik yapısı.....	14
Şekil 2-9: DKM ve HKM' ye neden olan TNNT2 gen mutasyonlarının şematik görünümü. ....	15
Şekil 2-10: Normal ve dilate kalbin şematik görünümü.....	16
Şekil 2-11:Dilate kardiyomiyopatiye yol açan proteinlerin kardiyomiyosit içinde hücrenel yerleşimi. ....	21
Şekil 2-12: DKM'ye yol açan çeşitli mekanizmaların şematik görünümü. ....	27
Şekil 3-1: TNNT2 geni 10. ve 13. ekson dizileri ve primer yerleşimi. ....	42
Şekil 4-1: TNNT2 geni ekzon 10 jel elektroforez görüntüsü. ....	49
Şekil 4-2: 10. ekzon RFPL analizi jel elektroforez görüntüsü. ....	50
Şekil 4-3:10 ekzon RFPL poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü. ....	50
Şekil 4-4: SSCP ve dizileme analizi sonuçları. ....	52
Şekil 4-5: TNNT2 geni ekzon 13 agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	53
Şekil 4-6: TNNT2 geni ekzon 13 poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü.....	53
Şekil 4-7: TNNT2 geni ekzon 13 SSCP görüntüsü .....	54

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

DKM	: Dilate Kardiyomiyopati
İDKM	: İdiyopatik dilate kardiyomiyopati
HKM	: Hipertrofik Kardiyomiyopati
cTnT	: Kardiyak troponin T proteini
TNNT2	: Troponin T geni
TnC	: Troponin C protein
TnI	: Troponin I protein
KF	: Kısalma fraksiyonu
EF	: Ejeksiyon fraksiyonu
LVEDD	: Sol ventriküler sonu dolum hacmi
LMNA	: lamin A geni
mtDNA	: Mitokondiyal DNA
SSCP	: Single Strand Conformation Polymorphism (tek iplik konformasyon polimorfizmi)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
TNNC1	: Kardiyak troponin C geni
TNNI3	: Kardiyak troponin I geni
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü

## ÖZET

Güçlü F.

Troponin T Gen Mutasyonlarının Türk populasyonundaki Dilate Kardiyomiyopati Hastalarda Taranması.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2006

**Genel Bilgi:** Dilate kardiyomiyopati (DKM), artmış ventriküler dilatasyon ve bozulmuş sistolik fonksiyon ile karakterize bir kalp kası hastalığıdır. Etiyolojisinde miyokardit, iskemik kalp bozukluğu, enfeksiyon ve gen mutasyonları gibi nedenler rol oynar. DKM vakalarının yaklaşık %30'u kalıtsaldır. Kardiyak Troponin T (TNNT2) gen mutasyonları DKM'ye neden olmaktadır.

**Amaç:** Bu çalışmada, Türk toplumundaki idiyopatik DKM'li çocuklarda, hastalığın etyolojik nedenlerinin araştırılmasının bir basamağı olarak TNNT2 gen mutasyonlarının incelenmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmada, yaş ortalaması 2 olan, 23 idiyopatik DKM'li çocuk hasta ve 100 sağlıklı birey bilinen ve bilinmeyen TNNT2 gen mutasyonları açısından incelendi. Bu gendeki mutasyonlar, HKM'ye de yol açması nedeni ile ikinci bir kontrol grubu olarak, 50 HKM'li hasta bireyde incelendi. TNNT2 geninin fonksiyonel olarak önemli olan 10 ve 13. ekzonlarında olası mutasyonların varlığı SSCP yöntemi ile tarandı. Ayrıca, TNNT2 geninde DKM'ye yol açtığı bildirilen R141W ve ΔK210 mutasyonları da çalışma grubumuzda araştırıldı.

**Sonuç:** Bilinen bu iki mutasyonlar çalışma grubumuzda tespit edilmedi. Genin 10. ekzonunun SSCP analizi sonucunda, DKM'li hasta grubunun üçünde, sağlıklı kontrol grubunun ikisinde ve HKM'li kontrol grubunun birinde farklı bir bant paterni saptandı. Bu farklılığın, dizi analizi sonucunda TNNT2 geninin intronik bölgesinde yer alan yeni bir varyant olduğu belirlendi. IVS10 +57G>C baz transversiyonu olarak isimlendirilen bu varyantın sıklığı hastalarda %13 (n=23) kontrol grubunda ise %2 (n=100) olarak bulundu (p= 0.003).

Elde edilen bu bulgular, saptadığımız IVS10 +57 G>C değişiminin DKM fenotipi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu veriler TNNT2 geninin, DKM oluşumunda etkin rol oynayan bir aday gen olabileceği hipotezini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler :** Troponin T, dilate kardiyomiyopati, SSCP, sarkomerik protein, kalp

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-534/21102004 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

## ABSTRACT

Güçlü F.

Analysis of Troponin T gene mutations in Turkish Populations Patients with Dilated Cardiomyopathy.

Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme, Istanbul, 2006

**Introduction:** Dilate cardiomyopathy (DCM) is a heart muscle disease characterized by left ventricular dilatation and systolic dysfunction. The underlying causes of DCM are heterogenuos including myocarditis, myocardial ischemi induced, metabolic and genetic abnormalities. A genetic cause of DCM is identified in approximataly 30% of cases. Cardiac Troponin T (TNNT2) gene mutations cause DKM.

**Aim:** We aimed to investigate TNNT2 gene mutations in the Turkish child with idiopathic DCM as a step for searching ethyological causes of the disease.

**Method:** The mutations of TNNT2 gene caused DCM investigated which 23, idiopathic DCM patients (age mean is 2) and 100 healthy individuals and 50 hypertrophic cardiomyopathic (HCM) patients as a control group. Functionally important exons of TNNT2 gene, 10th and 13th exons are examined via SSCP method for possible mutations. Moreover, in the TNNT2 gene R141W and  $\Delta$ K210 mutations associated with DCM are analysis in patients with DCM and control groups.

**Result:** These two mutations were not our study groups. SSCP analysis of 10th exon, three DCM patients, two individuals from control group and one HCM patient, formation of one, distinct band pattern was observed. Investigation of this difference via sequence analysis is concluded that there is a IVS10 +57G/C base transversion at the intronic region of the TNNT2 gene. The frequency of the difference is determined as 13% (n=23) at patients, 2%(n=100) at control group (p= 0.003).

Outcome of this project exhibits that IVS10 +57 G>C base transversion can be related with DCM phenotype. Consequently, our data suggest that TNNT2 gene is the important candidate gene for DCM disease.

**Key Words:** Troponin T, dilated cardiomyopathy, SSCP, heart, sarcomeric proteins.

This study is supported by IU Research Grantor /Project no: T-534-21102004

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dilate kardiyomyopati (DKM), ventriküler dilatasyon, sistolik fonksiyonda bozulma ve ilerleyici refrakter kalp yetmezliği ile karakterize edilen miyokardiyal bir hastalıktır (1). Dilate kardiyomyopati, en sık (%60) görülen kardiyomyopati tipi olup genel populasyonda sıklığı 100.000 de 40 ile 50 arasındadır (2). Çocuklarda idiyopatik DKM'nin prevalansı 2,6/100.000 olarak bildirilmiştir (3). Etiyolojisinde kalp kasına ait bozukluklar, miyokardit, iskemik kalp bozukluğu, inflamasyon, infeksiyon, metabolik bozukluklar, miyokardiyal basıncın artması, toksik ajanlar ve gen defektleri gibi nedenler rol oynar. Vakaların %25-30'unda "idiyopatik DKM" olarak ifade edilir. DKM, vakaların %70'inde sporadik, %30'unda kalıtsal (ailesel) olarak ortaya çıkar (4). Sarkomerik proteinler, hücre iskeleti proteinleri ve nüklear membran proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların kalıtsal ve sporadik DKM'ye neden olduğu belirtilmiştir (5).

Sarkomerik bir protein olan troponin T'yi kodlayan TNNT2 geninde ki R141W ve ΔK210 gen mutasyonlarının, DKM ile ilişkili olduğu literatürde bildirilmektedir (6-8). Bu mutasyonlar, fenotipik olarak DKM'nin erken yaşlarda başlamasına, bebeklik ve çocukluk döneminde konjestif kalp yetmezliğine, şiddetli ventriküler dilatasyona yol açmaktadır (6-8). Buna bağlı olarak, DKM'nin etyopatogenezinde rol aldığı bildirilen TNNT2 gen mutasyonlarının ve genin fonksiyonel olarak önemli iki bölgesinde oluşması muhtemel yeni mutasyonların dilate kardiyomyopati çocuklarda incelenmesi amaçlanmaktadır. Genin önemli fonksiyonel alanlarının analizi ile hem yeni bir mutasyon bulma ihtimalinin yükseleceği, hem de bulunacak varyasyonun(ların) genin fonksiyonu açısından önemli olacağı hipotezi ile yola çıkılmaktadır.

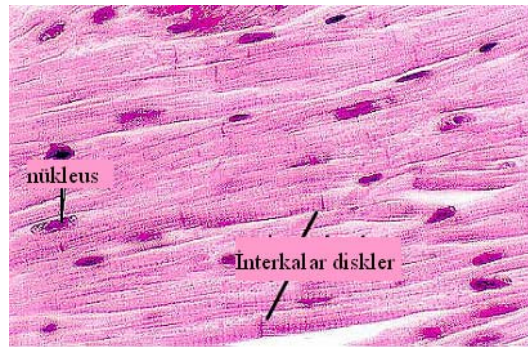
Kardiyak TNNT2 gen mutasyonlarının, DKM'li olgularda incelenmesinin ardından mutasyon elde edilmesi durumunda bu mutasyonunun sıklığının tespit edilmesi, klinik bulgular ile arasında ilişki kurulması ve riskli bireylere erken tanı ve tedaviye yönelme olanağının sağlanması bu projenin ana amacını oluşturmaktadır. Ayrıca, kardiyak Troponin T mutasyonları açısından Türk toplumu analiz edilerek, mutasyon sıklığı belirlenecek ve TNNT2 gen mutasyonlarının DKM ile ilişkisi desteklenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Kardiyomiyosit Yapısı ve Hücresel Fizyolojisi

Kalp kası, enine çizgilenmeler gösteren ve birbirine paralel uzanan kardiyomiyosit adı verilen özel hücrelerden meydana gelir. Kas lifleri, birbirine paralel çok sayıda miyofibrillerden oluşur. Her miyofibril sarkomer adı verilen temel kontraksiyon ünitelerinden ibarettir. Bunlar, tek bir hat halinde sadece kalp kasında bulunan interkalar diskler ile uç uca bağlıdır. İnterkalar disklerde; *fasia (zonula adherens)* (*N-cadherin, catenins ve vinculin* proteinlerini içerir), *macula adherens (desmozom)* (*dezmin, desmoplakin, desmocollin ve desmoglein* proteinlerini içerir) ve *gap junction (konneksin* proteinini içerir) olmak üzere üç temel bağlantı bulunur. Kardiyomiyosit nükleusları 1-2 adet olup, merkezi yerleşimlidir (Şekil 2-1). İskelet kası ve kalp kası miyositlerinde kontraktıl proteinlerin yapı ve fonksiyonları birbirine benzerdir. Kalp kası istemsiz, düzenli ve ritmik şekilde kasılır (9,10).

Kalp içinde; atriyum kası, ventrikül kası ve ileti kas lifleri olmak üzere üç tip kas yer alır. Atriyum kası ve ventriküler kas arasında farklar vardır. Atriyal kas daha az T tübüllerine sahiptir ve kardiyomiyositler daha küçüktür. Bunun yanında, iki tip kasta da miyofilamentlerin düzenlenmesi birbirine benzemektedir. Kardiyomiyositler, çok sayıda mitokondri içermektedir ve sitoplazmanın % 40'ından fazlasını oluşturmaktadır (9).

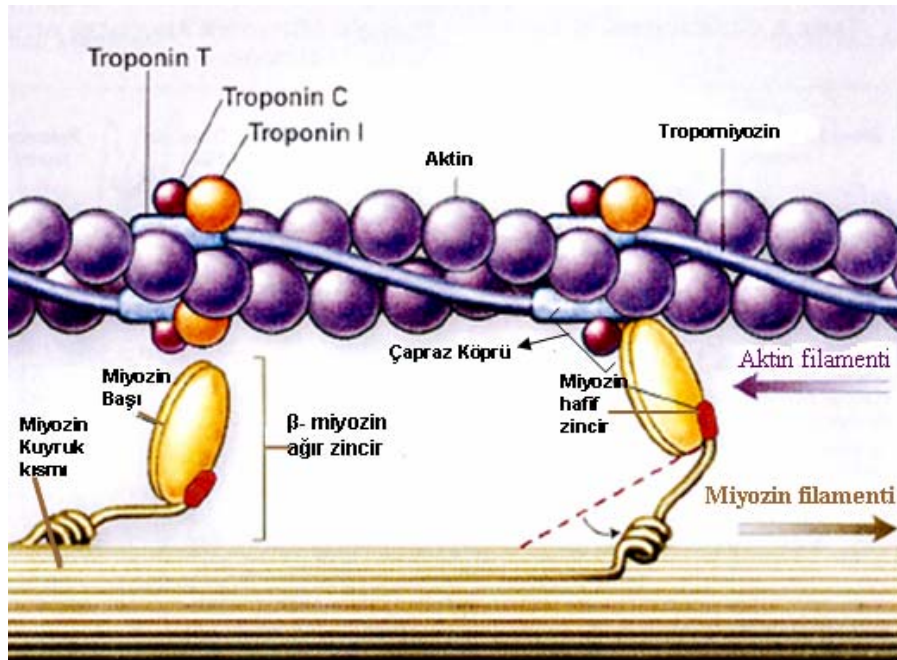


**Şekil 2-1: Kalp kasının boyutuna kesiti.**

İnterkala diskler aracılığıyla birbirine bağlanan kas hücreleri ve bu kas hücrelerinin merkezi konumlu nükleuslarının şematik görünümü (<http://w3.tvi.edu/~bsailer/muscle.html>)

### 2.1.1 Sarkomerin yapısı ve sarkomerik hücre iskeleti proteinleri

Kalp kasılmasının moleküler temelini anlamak için ilk önce kardiyak miyofibrillerin anatomisini ve organizasyonunu anlamak gereklidir. Kardiyomiyositler ince bir membran olan sarkolemma ile çevrilidir. Her bir miyosit iç kısmında boylamasına paketlenmiş biçimde düzenlenmiş miyofibrillerden oluşmaktadır. Miyofibriller bu düzen sayesinde karakteristik özelliği olan çizgili görünümünü kazanırlar. Fibrillerdeki kasılma birimlerine sarkomer adı verilir. Sarkomerler üst üste uzanan iki çift miyofilamentin düzenlenmesi ile oluşur (şekil2-2). Aktin filamenti (ince filament); aktin, troponin ve tropomyozin proteinlerinden oluşmuş bir komplekstir (şekil 2-2). Aktin molekülü, filamentin bel kemiğini oluşturur ve globular aktin (G-aktin) monomerleri ile birleşerek çift heliks şeklinde biribiri etrafında dolaşmış uzun ipliksi polimerlerden (F-aktin) ibarettir. Her bir G-aktin monomeri, miyozin bağlanma bölgesi içerir. Aktin filamentinin diğer yapı taşı olan tropomyozin molekülü çift heliksli iki alt üniteden meydana gelir (9,10).



**Şekil 2-2: Aktin ve miyozin filamentlerinin şematik görünümü.**

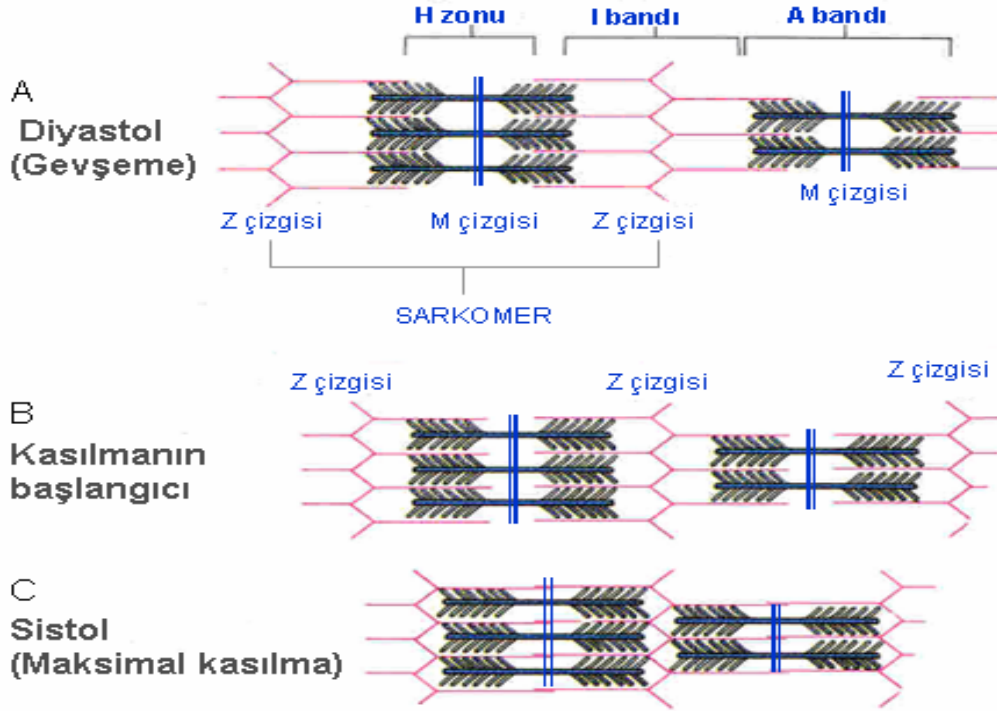
Aktin filamenti (ince filament) oluşturan; troponin T,I,C  $\alpha$ -tropomyozin molekülleri. Miyozin filament (kalın filament) oluşturan; miyozin molekülleri (Kamisago 2000'den düzenlendi.)

Uzun linear bir molekül olan tropomiyozin F-aktin iplikleri ile zayıf bir şekilde birleşmekte, F-aktin sarmalının dış yüzeyine spiral olarak sarılmaktadır. Aktin filametini oluşturan diğer bir protein ise troponin molekülüdür. Troponin globüler bir moleküldür ve tropomiyosin bu molekülün ucuna eklenir. Troponin, gerçekte her biri kas kasılmasının kontrolünde rol oynayan üç proteinden oluşmuş bir komplekstir. Bu kompleks, aktine bağlanan troponin I, kalsiyum iyonlarını bağlayan troponin C ve troponin kompleksini tropomiyozine bağlayan troponin T'den oluşur. Tropomiyosin ve troponin kompleks proteinleri kontraktıl proteinler olmayıp, aktin-miyozin etkileşimini aktive veya inhibe eden ve kasılma mekanizmasında düzenleyici rol oynayan proteinlerdir. Aktin ve miyosin arasındaki reaksiyon, kalsiyuma bağlı olarak troponin ve tropomiyosin tarafından kontrol edilir (9,10).

Miyozin filamenti (kalın filament); birçok miyozin molekülünden (~ 200 miyozin molekülü/miyozin filamenti) oluşmaktadır. bir miyozin molekülü, iki ağır zincir ve dört hafif zincir olmak üzere altı polipeptid zincirinden oluşur. Molekül, globular bir baş kısmı ve spiral olarak uzanan bir kuyruk kısmı içerir (şekil 2-2). Miyozin moleküllerinin kuyrukları demet halinde toplanarak filametın gövdesini oluştururken, gövdeden dışarı sarkan yapı ise baş kısmını oluşturur. Dışarı sarkan bu yapı "miyozin başı" olarak isimlendirilir. Miyozin başı kas kasılmasında ATP hidrolizinde rol oynar. Ayrıca, her miyozin molekülünün baş kısmı yana doğru uzanarak G-aktin monomerleri ile çapraz köprüler oluşturur. (şekil 2-2). Bu çapraz köprüler kas kasılmasında önemli rol oynar (9,10).

Aktin (ince) ve miyozin (kalın) filamentlerinin özgün düzenlenmesi ile oluşan sarkomer, iki Z çizgisi arasında kalan miyofibrilli bölümü kapsar ve her bir sarkomer bir A bandı içerir. Her sarkomerdeki miyozin filamentleri, geniş ve koyu sabit uzunlukta (1.5 $\mu$ ) A bandı ile gösterilir (şekil2- 3A). Sabit miyozin filament üniteleri miyozin filamentlerinin orta noktalarından diğer miyozin filamenti ile bağ yaparak birbirlerine tutunurlar. Miyosin ünitelerinin etrafında, sabit uzunluğu 1.0  $\mu$  olan aktin filamentleri bulunur. Bunlar koyu Z çizgisinde sarkomerin ucuna tutunur. Z bandları ve interkalar diskler, yeni sarkomerlerin oluşumunda işlev görürler. (9,10,11).

Açık renkli bantlar sadece aktin filamentini içerir ve I bandı olarak tanımlanır. Değişik boyutlardaki açık renk I bandının orta kısmında yer alan aktin filamentlerinin etrafı sabit miyozin iskeletiyle çevrelenmiştir (şekil 2-3).



**Şekil 2-3: Sarkomerin şematik görünümü.**

A: kas diyastol esnasına bir miyofibrili oluşturan miyofilamentlerin sarkomerdeki görünümü, B: sarkomerin boyunun kısılması, C: kas sistol esnasında sarkomerin boyunun en kısa hali.

Fizyolojik şartlar altında bütün sarkomer uzunluğu kardiyak siklusta 1.5-2.2  $\mu\text{m}$  arasında değişiklik gösterir. İki Z çizgisi arası, mesafe diyastol sonu lif gerginliğinin derecesine ve kontraksiyon sırasındaki kısılma mesafesine bağlıdır. İskelet kasında akut aşırı gerilim durumunda, miyokardiyumda ise daha az bir derecede gerilme sonucunda ortaya patolojik bir geniş H zonu çıkar. Bu, kalın ve ince filamentlerin parsiyel olarak serbest kaldığını gösterir. Bunun tersi bir durumla ventrikülün kronik ileri derecede dilatasyonunda miyofibrillerin kayması ve yer değiştirmesi şeklinde duruma karşılaşılr (11).

Diyastolde sarkomerin boyu (kas lifinin boyunun) normal, sistolde (tam gergin) sarkomerin boyu 2 mikrometredir. Sistolde aktin filamentleri miyozin filamentlerinin üzerine doğru kayar ve karşılıklı olarak birbiri üzerine gelirler (şekil 2-3C).

*Titin* ve *Miyomesin*, sarkomerdeki temel kasılma proteinleri olan aktin ve miyozin filamentlerinin yapı iskeletinin oluşmasında rol alan sarkomerik hücre iskeleti proteinleridir. *Titin*, miyozin ile aktin moleküllerini bir arada tutan ipliksi bir moleküldür. *Titin*, Z çizgisinden M çizgisine kadar uzanarak sarkomer organizasyonuna ve kardiyak fibrillerin esnekliğine katkıda bulunur. *Miyomesin*, Z diskinde kafes biçiminde olan, miyosin I ve II olarak iki formu bulunan ve *titin* ile etkileşen bir moleküldür. *Miyomesin*, *titin* moleküllerinin ters biçimi ile, komşu sarkomerlerdeki miyofilament düzeninin korunmasında rol alır. Aktinin, filamin, nebulette, telethonin ve miyotolin miyofilament organizasyonunun korunmasında önemli olan diğer Z diski proteinleridir (10).

### **2.1.2 Ekstrasarkomerik hücre iskeleti proteinleri**

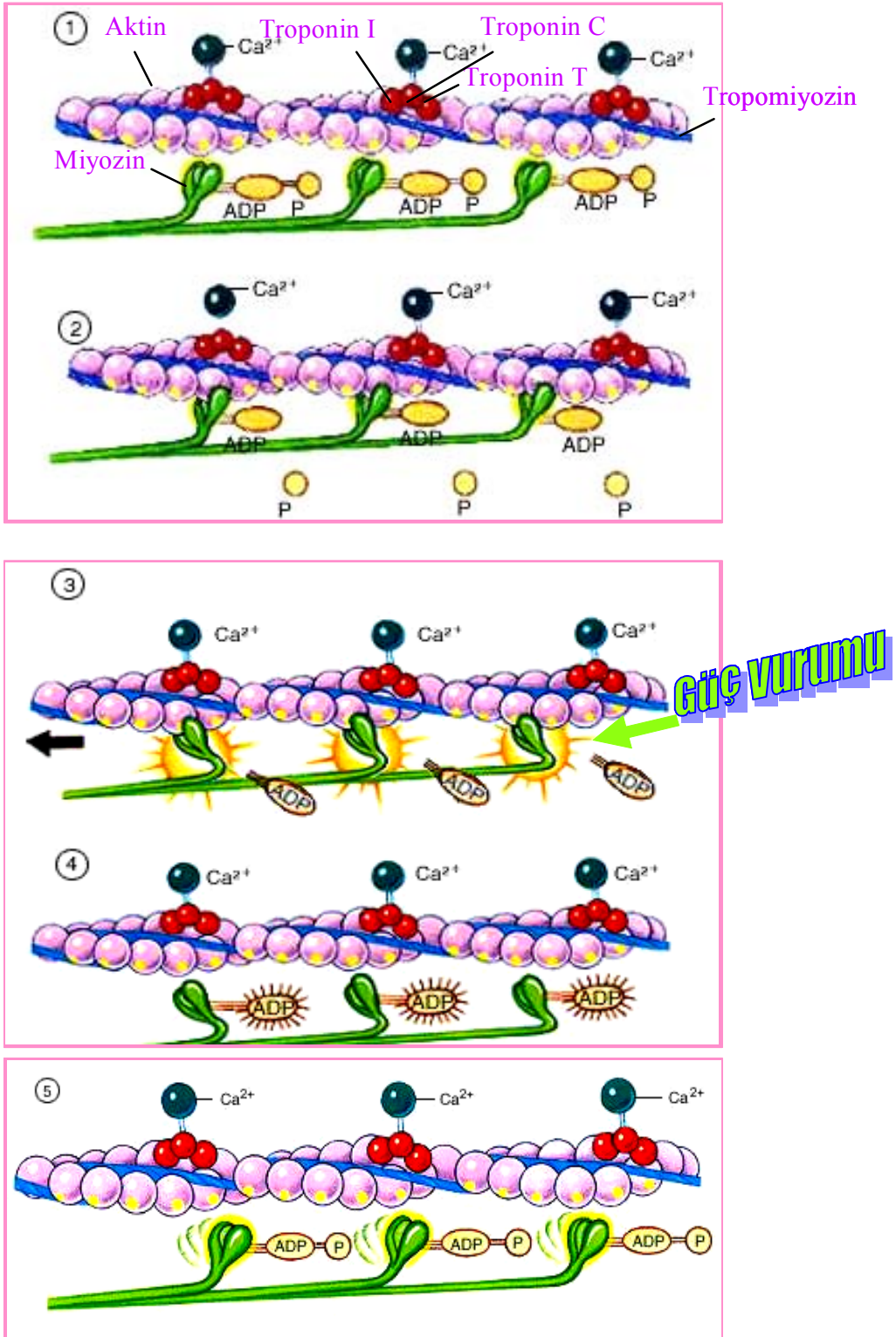
Ekstrasarkomerik hücre iskeleti, sarkolemma ve hücre dışı matriks proteinlerini sarkomere bağlayan proteinlerden oluşan ağsı bir yapıdır. Bu yapı, hücreler arasında kimyasal ve mekanik sinyallerin iletimini sağlar. İntermiyofibriler hücre iskeleti, ara (intermediate) filamentler, mikrofilamentler ve mikrotübüllerden oluşur. *Desmin*, önemli bir ara filament proteinidir. Z disklerini çevreleyen desmin bitişik sarkomerin Z diskleriyle subsarkolemmal kostamerler ile yandan bağlantılar oluştururlar. *Tubulin*, mikrotübüllerin polimerize olan ve polimerize olmayan formlarında bulunan hücresel bir proteindir. Kostamerler, sarkolemma'nın sitoplazmik kısmı boyunca uzanan sarkolemma ve sarkomer bağlantı ağları arasında iç bağlantıyı sağlayan subsarkolemmal yapılardır. Distrofin, distrofin ilişkili glikoprotein kompleks ( $\alpha$  ve  $\beta$  distroglikanlar ve  $\alpha, \beta, \delta, \gamma$ - sarkoglikanlar, distrobrevin) diğer ekstrasarkomerik proteinlerdir (9,10).

## 2.2.Kalp Kasılmasının Moleküler Mekanizması

Kasılma kısaca, aktin filamentinin miyozin filamenti üzerine kayması sonucunda sarkomer boyunun kısılmasıdır. Bu olay, miyozin filamentlerinin çapraz köprüleri ile aktin filamentlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. Aktin ve miyozin arasındaki etkileşim “kürek hareketi hipotezi” veya “kayan filament hipotezi” ile açıklanır. 1957’de Huxley’in ileri sürdüğü kayan filament kasılma teorisine göre, kasın kasılması, aktin (ince) filamentleri sabit miyozin (kalın) filamentine doğru hareket eder, aktinin aktif kısmı ile miyozin arasındaki çapraz köprüler oluşur ve aktin ile miyozin etkileşir. Kasılma esnasında, iki filamentin uzunluğu değişmeden kalır ancak sarkomerin boyu kısalmır (9,10,11) (Şekil 3).

Miyozin filamentlerinin aktin filamentleri arasında kaymasını, miyozin filamentlerinin çapraz köprüleri ile aktin filamentlerinin etkileşimi sonucunda oluşan mekanik güçler sağlar. Bu durum “kürek hareket” teorisi ile açıklanır. Kasılma başlamadan önce, miyozin çapraz köprü başları ATP ile bağlanır ve miyozin başının ATPaz aktivitesi sayesinde ATP molekülü hidrolizlenir. Hidroliz sonucu, açığa çıkan ADP ve inorganik fosfat (Pi), gevşek bir şekilde miyozin filamentinin aktif bölgesine bağlı halde kalır (şekil 2-4,1). Bu durumda başın biçimi dikey konumdadır ve aktin filamentine doğru uzanmakla birlikte, henüz aktine bağlanmamıştır. Troponin-tropomiyozin kompleksine kalsiyum iyonu bağlanınca, aktin filamenti üzerindeki aktif bölgeler açılır ve miyozin bağlanır (şekil 2-4,2). Çapraz köprü başının aktin filamentinin aktif bölgelerine bağlanması, başla gövde arasında 45 derecelik açı oluşmasına sebep olur. Bu, aktin filamentini çekmek için güç vurumu (power stroke) sağlar (Şekil 2-4,3). Güç vurumu ATP molekülünün hidrolizi sırasında depolanmıştır. Güç vurumu gerçekleştikten sonra, miyozin başına bağlanmış olan ADP ve Pi salınır. Miyozin başına yeni bir ATP bağlanır. ATP molekülünün bağlanması başın aktin filamentinden ayrılmasına neden olur (şekil 2-4,4). Baş aktin filamentinden ayrıldıktan sonra, yeni bir ATP molekülü hidroliz edilir. Açığa çıkan enerji başı dikey pozisyonuna, yeni bir güç vurumu döngüsüne başlamak üzere hazır hale getirir (Şekil 2-4,5). Daha sonra ATP’den sağladığı depo enerjisi ile hazırlanmış baş, yeni bir aktif aktin filamenti bölgesi ile bağlandığı zaman yeniden güç vurumu yapar.

Kalp kasılmasının moleküler mekanizması, sarkomerik proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile mümkün olmaktadır (9,10).

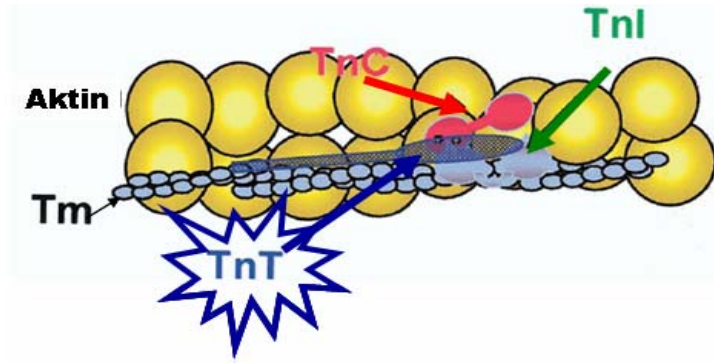


**Şekil 2-4: Kalp kasılmasının şematik görünümü.**

Kürek hareketi hipotezi ile kalp kasılması esnasında,  $Ca^{2+}$ 'nın Troponin C'ye, ATP'nin miyozin başına bağlanması ve hidrolizi (1), Miyozin filamentinin aktin filamentindeki aktif bölgelere bağlanması çapraz köprü oluşumu ve ADP'de Pi'nin ayrılması (2), miyozin filamentini ile aktin filamentinin etkileşimi ile güç vurumunun oluşumu ve ADP'nin ayrılması (3), miyozin filamentinin aktin filamentinden ayrılarak yeni döngü için ATP molekülü hidrolize etmesi (4), başın yeni bir güç vurumu döngüsü için dikey hale gelmesi (5).

### 2.3. Kardiyak Troponin T Proteini

Kardiyak Troponin T (cTnT), tropomiyozin ile etkileşime giren troponin kompleksinin bir üyesidir (12). Kas kasılmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan troponin kompleksi, troponin T (TnT), ince ve kalın filamentin etkileşimini baskılayan troponin I (TnI) ve bu etkileşimin ortadan kalkması için gerekli kalsiyum iyonlarını bağlayan troponin C (TnC) proteinleri içerir. TnT, bu kompleksi tropomiyozine bağlar ve miyofilamentlerin kalsiyum konsantrasyonuna bağlı ATPaz aktivitesi kazandırır (13-15). Troponin kompleksini oluşturan bu proteinler, aktin filamenti boyunca 1:1:1 oranında ve yedi aktin monomerinde bir kompleks bağlanacak şekilde düzenlenirler (12)(şekil 2- 5).



**Şekil 2-5: Troponin kompleksi ve troponin T**

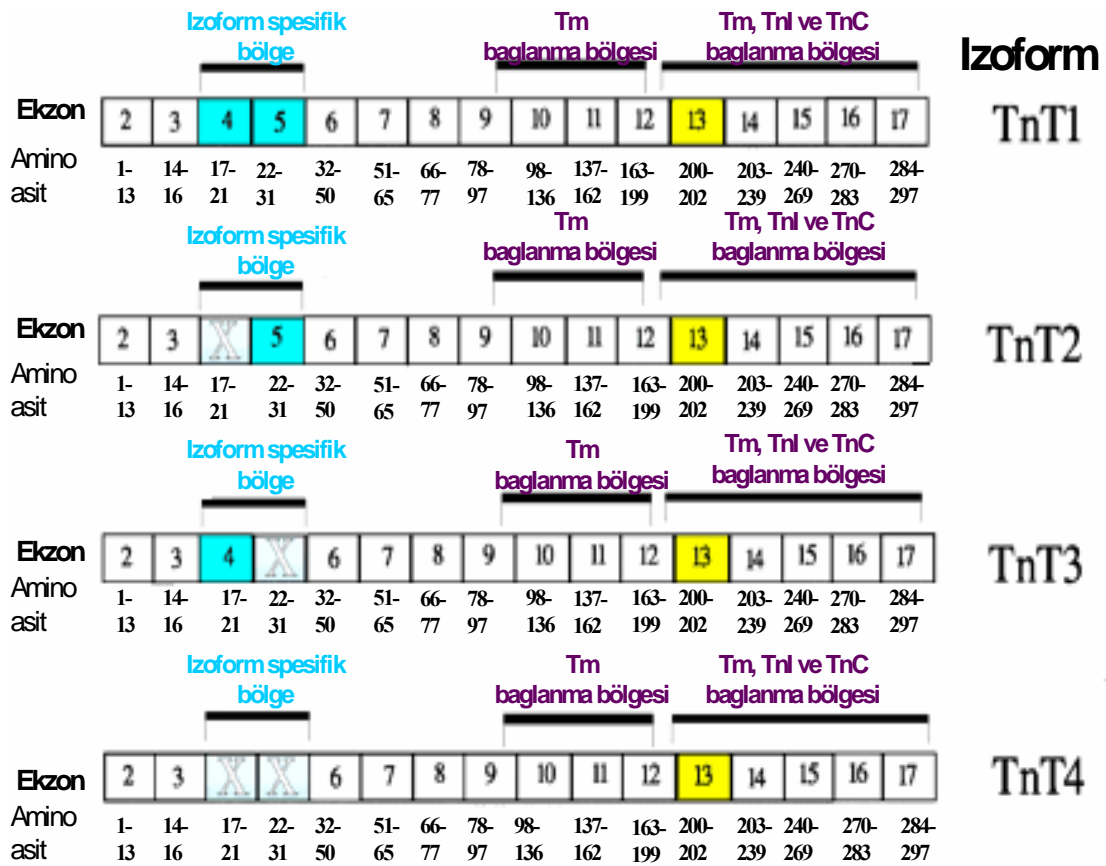
Aktin filamentini oluşturan aktin molekülü, Troponin kompleksi (TnT; troponin T, TnC; troponin C, TnI; troponin I), Tm; tropomiyozin. (Parmecik 2002'den düzenlendi.)

Pek çok memeli türünde, kuşlarda ve omurgasızlarda, TnT'nin iskelet ve kalp kasındaki temel yapısı tanımlanmıştır (15). Elektron mikroskopisi çalışmalarında, TnT'nin 185-205 Å uzunluğunda, virgül şeklinde bir molekül olduğu belirlenmiştir. TnT, aktin heliks oluşuna yerleşerek, aktin filamenti boyunca devam eden ~35-kD'luk asimetrik bir proteindir (12,16).

Moleküler klonlama yöntemi kullanılarak, insan ve diğer omurgalılarda 3 farklı Troponin T geni (TNNT) tanımlanmıştır. Kalp kasında TNNT2, yavaş çizgili kasda TNNT1 ve hızlı çizgili kasda TNNT3 genleri, dokuya özgü eksprese olmaktadır (17). Bu genlerin her biri, “*alternatif splicing* (alternatif kırılma)” ile TNNT geninin dokuya özgü izoformlarıdır. Kalbe özgü TnT ve hızlı çizgili kasa özgü TnT proteinleri arasında N-terminal bölgeleri açısından önemli farklar vardır. Bu farklar, iskelet kası izoformunun kardiyak izoformdan yaklaşık 30 aminoasid daha kısa olması ve kardiyak

izoformunda iskelet kası izoformuna göre asidik aminoasitlerinin (glutamik asit) sayısının daha fazla olmasıdır (17).

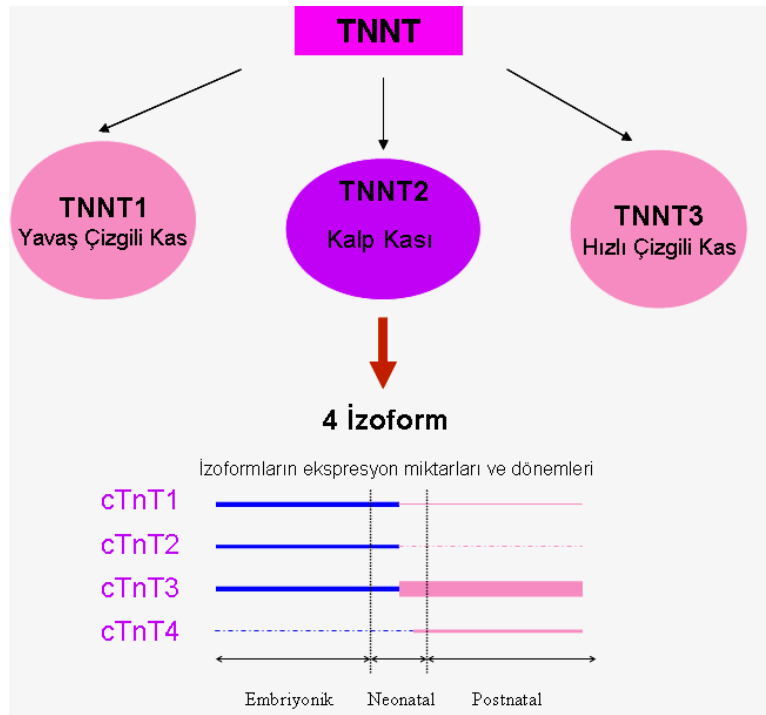
Memeli kalp kasında, kardiyak TnC (cTnC) ve kardiyak TnI (cTnI) tek bir izoform olarak eksprese olmalarına rağmen, kardiyak TnT birden fazla izoform halinde eksprese olmaktadır (18,19). Yapılan farklı çalışmalarda, insan kalp kasında, cTnT'nin dört izoformu tanımlanmıştır (20,21). İnsanda cTnT1, cTnT2, cTnT3, cTnT4 olarak adlandırılan bu izoformlar, kodlama bölgesinin 5' kısmına yakın bulunan 4. (15bç) ve 5. (30bç) ekzonlarının alternatif kırılımları sonucu oluşur. İzoform cTnT1, 4. ve 5. ekzonların her ikisini içerirken, izoform cTnT2 sadece 5. ekzonu içerir. İzoform cTnT3 sadece 4. ekzonu içerirken, izoformun cTnT4 ise 4.ve 5. ekzonların ikisini de içermemektedir (20,21) (şekil2-6). Bu izoformlar, embriyonik gelişim döneminde önem taşımaktadır.



**Şekil 2-6: Kardiyak Troponin T izoformları ve izoformların ekzon dağılımı**

Amino asit numaraları insan kardiyak TnT1 dizisini gösterir. X; ekzon delesyonu gösterir. Sarı renkli ekzon *alternatif splicing* bölgesini işaret eder (Gomes 2002'den düzenlendi)

Çeşitli çalışmalarda, normal ve kalp yetmezliği gözlenen kalplerde cTnT izoformlarının ekspresyonlarının farklı seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Embriyonik dönemde her izoformun ekspresyonunun olmasına rağmen cTnT2'nin ekspresyon seviyesinin çok düşük olduğu, cTnT3 ve cTnT1'nin ise, daha yüksek seviyelerde ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (20-22). Embriyonik kalp gelişim sürecinde cTnT1 izoformunun ekspresyonu giderek azalırken, cTnT3 izoformunun ekspresyonu artar. Postnatal dönemde ise, cTnT4 izoformunun ekspresyonu çok az iken, cTnT3 izoformunun ekspresyonu daha fazladır (şekil 2-7). Yetişkin dönemde kalpte sadece cTnT3 izoformu eksprese olur (20-23). Yetişkin dönemde embriyonik izoformların (cTnT1, cTnT2) varlığının kalbin kasılma fizyolojisinde değişikliğe neden olmasıyla birlikte kalp yetmezliği meydana geldiği bildirilmiştir (24). Fakat bu izoformların ekspresyonlarının kalp yetmezliğine nasıl etki ettikleri bilinmemektedir.



**Şekil 2-7: Troponin T izoformları ve kardiyak troponin T' izoformlarının ekspresyon düzeyleri**

TNNT1 yavaş çizgili kas'ta, TNNT2 kalp kasında, TNNT3 hızlı çizgili kasda eksprese olur. cTnT1 ve cTnT3 izoformları, embriyonik gelişim döneminde yoğundur. Postnatal dönemde, TnT3 izoformunun ekspresyonu fazladır, cTnT4 izoformu çok az miktarda ekspresyon gösterir ve cTnT1 ile cTnT2 izoformlarının ekspresyon seviyeleri yoktur. Mavi çizgiler, embriyonik dönem ekspresyonlarını, pembe çizgiler postnatal ekspresyon düzeylerini gösterir.

Normal kalp kasılmasının sürdürülebilmesi, kas hücrelerindeki  $Ca^{+2}$  homeostazına ve miyofilamentlerin  $Ca^{+2}$  iyonlarına karşı oluşturduğu tepkiye bağlıdır. İnsanda, TnT izoformları kalsiyuma duyarlılığında değişikliğe yol açarak kalp kasılmasını etkiler. Embriyonik cTnT1 izoformu, fonksiyonel olarak yetişkin dönemdeki izoformdan farklıdır ve kardiyak kas kasılmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (23). TnT1 ve TnT2 izoformlarının kalsiyum iyonlarına duyarlılığı, yetişkin dönemde ekspresyonu gözlenen TnT3 ve TnT4'e göre daha fazladır (24). İzoform TnT1 ve TnT2'nin postnatal dönemde miyofilamentlerde eksprese olmaya devam etmesi ile, miyofilamentlerin kalsiyum iyonlarına duyarlılığının artışı ve diyastolik fonksiyon bozukluğu gözlenmiştir (24).

Farklı cTnT izoformlarındaki ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin önemi, kalp yetmezliği gözlenen insan sol ventriküler miyokardiyumda, miyofibrillar ATPase aktivitesi ve izoform ekspresyonu arasında bir ilişkinin varlığının gösterilmesi ile desteklenmiştir (20).

Aktin filamentleri için önemli bir regülatör protein olması sebebiyle, kalp gelişimi esnasında TnT izoformlarının ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin, miyokardiyal kasılmanın kalsiyum regülasyonunda önemli olabileceği ileri sürülmüştür. Sağlıklı insan kalp dokusunun eldesi zor olması nedeniyle bu konuda az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, TnT izoformlarının ekspresyonlarındaki değişikliklerin kardiyak hipertrofi, diyabet ve konjenital kalp hastalıkları ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (25,26). Kalp yetmezliğine neden olan cTnT izoformlarının ekspresyonlarındaki değişikliklerin normal kasılma işlevini gerçekleştiremeyen kalbin, kasılmasının devamı için önemli olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte idiyopatik kardiyomiyopati hastalarından alınan kalp dokusunda cTnT izoformlarının ekspresyon düzeylerinde farklılıklar saptanmıştır (20).

### 2.3.1 Troponin T'nin Kas Kasılmasındaki Rolü

Virgül şeklinde asimetrik bir uzantı olan TnT molekülü, troponin I, troponin C, tropomiyozin ve aktin arasındaki bağlantıyı sağlar (16). TnT'nin C-terminal kısmı globüler bir domaindir. Bu domain, tropomiyozin, aktin ve troponin kompleksi ile etkileşime girer. TnT'nin N-terminal kısmı virgül şeklinin kuyruk kısmını oluşturan uzun bir domaindir. Bu domain, tropomiyozin ile interaksiyona girdiği ve komşu tropomiyozin dimerlerinden birinin C-terminali ile diğerinin N-terminali ile bir bağlantı oluşturur. Böylece TnT, iki komşu tropomiyozin molekülünün etkileşimini, tropomiyozinin polimerizasyonunu ve aktinle tropomiyozinin etkileşimini sağlar (13). Aktin ve tropomiyozinin etkileşiminde TnT'in nasıl etki ettiğinin anlaşılması için yapılan çalışmalarda, TnT proteindeki ilk 150 aminoasitlik bölgesi delesyona uğratılmış mutant TnT içeren troponin kompleksinin, normal TnT içeren troponin kompleksine göre aktin ve tropomiyozinin etkileşimini daha az etkilediği gösterilmiştir (13). Bu da TnT'nin N-terminal kısmında kısa ekzonların olması ve bu ekzonlarında “alternatif splicing”den dolayı çeşitlilik göstermesine dayanır. cTnT, sadece troponin kompleksinin yapısal bütünlüğünü sağlamakla kalmayıp aynı zamanda troponin kompleksinin sarkomerin yapısına girmesinde ve kardiyak kasılmada gerekli bir proteindir (27).

TnT, aktin-tropomiyozin filamentine troponin kompleksinin sabitlenmesinin yanında aktomiyozin ATPaz aktivitesinin düzenlemesinde de önemli bir rol oynar. TnT,  $Ca^{+2}$  yokluğunda aktomiyozin ATPaz'ın inhibisyonu sağlarken  $Ca^{+2}$  varlığında aktomiyozin ATPaz'ın aktivasyonunu sağlamaktadır (28). TnT'nin TnC ile direk interaksiyona girmesi böyle bir aktive edici etkisinin olduğunu desteklemektedir.

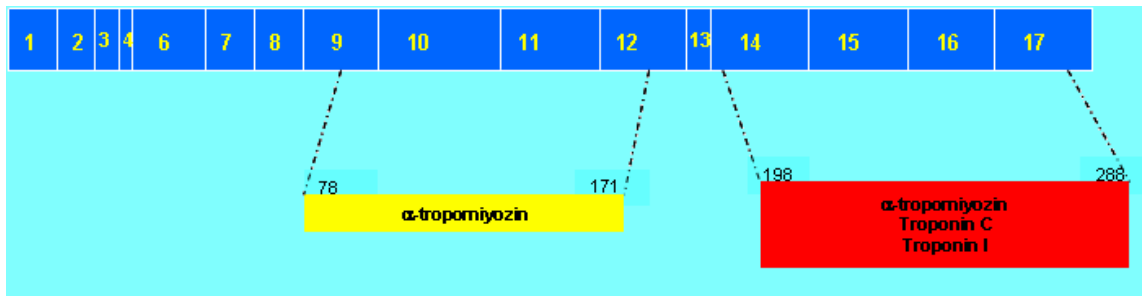
Kalsiyum konsantrasyonu, cTnC-cTnT arasındaki etkileşimi etkiler. cTnC-cTnT arasındaki meydana gelen etkileşim aktin ve miyozin filamentleri arasında kayma hızının kontrolü için gereklidir (12,29).

Kas gevşek haldeyken aktin filamentlerindeki aktif bölgeler, troponin-tropomiyozin kompleksi tarafından baskılanır veya kapatılır. Baskılanan bölgeler miyozin filamentlerinin başlarına tutunamaz. Aktin filamentleri Troponin-tropomiyozin kompleksi olmadığı zaman, ATP ve miyofibrilde bol miktarda bulunan magnezyum iyonları varlığında miyozin molekülleri başlarına bağlanma eğilimindedir. Kasılmanın meydana gelebilmesi için aktin filamentleri üzerindeki troponin-tropomiyozin

kompleksinin baskılayıcı etkisi engellenmelidir. Bu durumda kalsiyum iyonlarının miktarının artması sonucunda troponin-tropomiyozin kompleksinin aktin filamenti üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar.  $Ca^{+2}$  troponin kompleksindeki troponin C'ye bağlanır ve troponin C'nin N-terminal kısmında yapısal bir değişiklik meydana getirir. Bu değişim sonucunda aktin filamenti ile troponin I'nın etkileşimi zayıflar ve troponin I aktin filamentinin aktif bölgesinden uzaklaşır. Troponin I uzaklaşırken belli bölgelere doğru hareket eder. Böylece aktin filamenti üzerindeki troponin T'nin pozisyonunu etkileyerek yeniden bir düzenlenme oluşturur. Bu düzenlenme sonucu Troponin T'ye bağlı olan Tropomiyozin molekülü, aktin filamenti üzerindeki pozisyonunu değiştirerek iki aktin ipliği arasındaki oluğa çekilir. Böylece aktin filamentinin aktif bölgeleri açığa çıkar. Aktif hale gelen aktin filamenti ile miyozin filamentinin başı birbirine bağlanır ve kasılma meydana gelir. Troponin T kasılmanın başlayabilmesi gereklidir (12,29-31).

## 2.4 TNNT2 Geni

Kalp kasında eksprese olan Kardiyak troponin T (TNNT2) geni, 1q32 kromozomal bölgesine lokalizedir (32). TNNT2 geni, 17 ekson ve 16 intron içermektedir (33). Eksonların uzunlukları, 9 ila 117 baz çifti arasında değişmektedir. Genin tamamı 17 kb uzunluğundadır (33). Yetişkin kalp dokusunda eksprese olan izoformu (TnT3), 288 amino asit uzunluğundadır (33). İnsan TNNT2 geni, sıçan ve tavuk genomik dizileri karşılaştırıldığında aynı genomik organizasyonu göstermektedir. Bu türler arasında sadece intron uzunlukları farklılık göstermektedir (33). Genin 4, 5, 10 ve 13 ekzonları "alternatif splincing" bölgelerini kapsar (22-24).

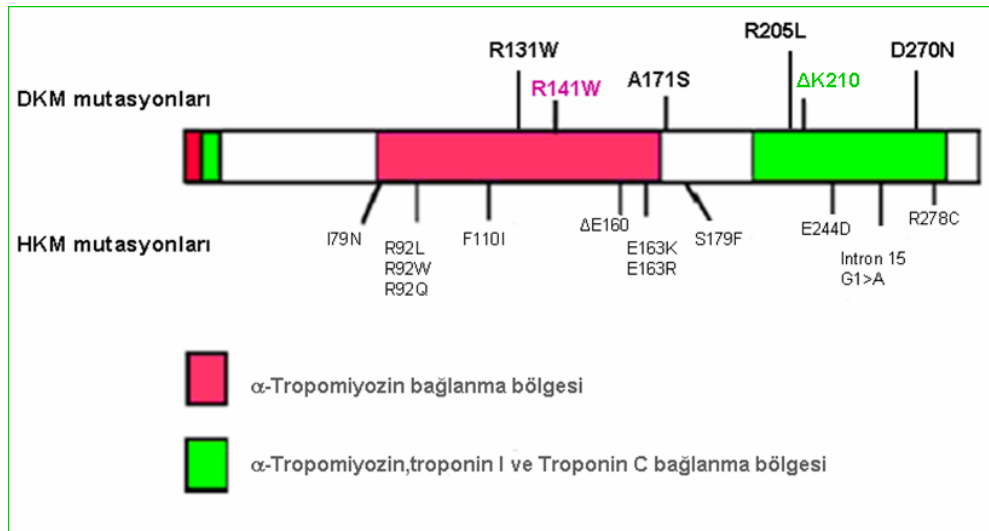


**Şekil 2-8: TNNT2 geni ekzonik yapısı.** 78-171 amino asitleri,  $\alpha$ -tropomiyozin bağlanma bölgesini (sarı kutu) , 198-288 amino asitleri,  $\alpha$ -tropomiyozin, troponin C ve troponin I bağlanma bölgeleri gösterir (kırmızı kutu).

### 2.4.1 TNNT2 gen mutasyonları

Kardiyak TNNT2 gen mutasyonları, mutasyonun tipine ve lokalizasyonuna bağlı olarak hipertrofik kardiyomiyopati (HKM) ve dilate kardiyomiyopati (DKM) gibi miyopatilere neden olmaktadır. HKM, kardiyak hipertrofi ve bozulmuş diyastolik fonksiyon ile karakterize bir miyokardiyum hastalığıdır (1). DKM ise, kardiyak dilatasyon ve azalmış sistolik fonksiyon ile karakterize miyokardiyum hastalığıdır (1). TNNT2 geninin fonksiyonel olarak önemli bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar DKM ve HKM'ye yol açtığı daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bu mutasyonlar içinde TNNT2 gen mutasyonları, HKM hastalarında yaklaşık olarak % 5-10 oranında bulunmuştur (34). Yapılan son çalışmalardan birinde, TNNT2 geninde bir *de-nova* mutasyonun, üçüncü bir fenotip olarak infantil restriktif kardiyomiyopatiye neden olduğu bildirilmiştir (35). Restriktif kardiyomiyopati, ventriküler doluluk hacminin bozulması sonucu meydana gelen anormal diyastolik fonksiyon, ventriküler diyastol sonu basıncında artış ve dilated atria ile karakterize edilen nadir bir kardiyomiyopati tipidir (1).

TNNT2 gen mutasyonları, sarkomer tarafından oluşturulan güç üretiminde kalsiyum duyarsızlığına neden olmaktadır (36). "TNNT2'deki allelik mutasyonlar, farklı kardiyak fenotiplere nasıl sebep olur?" sorusundan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, DKM'ye neden olan mutasyonların kalp kasılmasında sarkomerik proteinler tarafından oluşturulan güç üretiminde eksiklik meydana getirdiği buna karşılıklı HKM'ye sebep olan mutasyonların ise güç üretiminin artışına neden olduğu savunulmuştur (36-38).

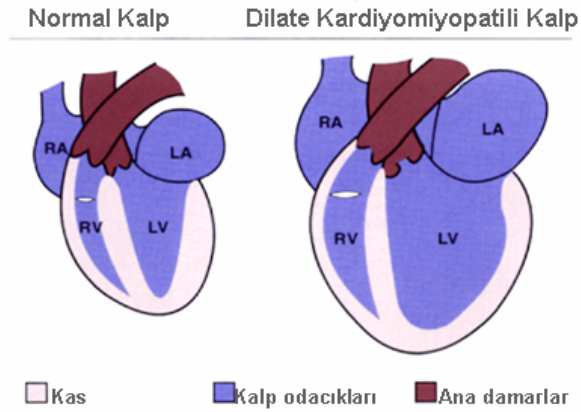


**Şekil 2-9: DKM ve HKM'ye neden olan TNNT2 gen mutasyonlarının şematik görünümü.** Yeşil bölümler; Troponin T'nin tropomyozin, troponin I ve troponin C ile etkileşime girdiği bölgeleri, kırmızı bölümler; Troponin T'nin tropomyozin ile etkileşime girdiği bölgeleri göstermektedir. R141W(pembe) ve ΔK210 (yeşil) mutasyonları tez çalışması kapsamında incelenen mutasyonlardır. (Stefanelli 2004'den düzenlendi.)

## 2.5 Dilate Kardiyomyopati (DKM)

### 2.5.1 Tanımı ve Prevalansı

Dilate kardiyomyopati (DKM), artmış ventriküler dilatasyon (Şekil 2-10), sistolik fonksiyonda bozulma ve ilerleyici refrakter kalp yetmezliği ile karakterize edilen miyokardiyal bir hastalıktır (1). Dilate kardiyomyopati, kardiyomyopatiler içinde en sık (%60) görülen tip olup genel populasyonda sıklığı 100.000 de 40 ile 50 arasındadır (2). Dilate kardiyomyopatinin, bilinen bir nedeni yoksa ve sporadik olarak gelişmiş ise idiyopatik dilate kardiyomyopati (İDKM) olarak adlandırılır. İDKM bütün yaş gruplarında gözlenir. Fakat çocuklarda ve bebeklerde daha az sıklıkla rastlanır (39,40). Çocuklarda idiyopatik DKM'nin prevalansı 2,6/100.000 olarak bildirilmiştir (40). İdiyopatik dilate kardiyomyopatinin insidansı, her yıl 100.000 de 5-8 vaka olarak tahmin edilmektedir (41).



**Şekil 2-10: Normal ve dilatasyon bulunan kalbin şematik görünümü.**

### 2.5.2 Septomları

Hastalığın klinik bulguları, başlangıç döneminde belirsizdir. Etkilenmiş kişilerde yorgunluk, halsizlik, dispne veya çarpıntı gözlenir. Hastalık ilerledikçe kasılma işlevinde gerileme, kalp yetmezliği, atrial ve ventriküler aritmiler gibi kötüleşen bulgular gözlenir (42). Hastaların 1/3’de göğüs ağrısı gözlenir. Hastalık progresiftir. Hastaların çoğu semptomlar başladıktan sonra genellikle 5 yıl içinde ölür (5). Hastalığın belirli bir patolojik bulgusu olmamasına rağmen kardiyak küttele artışı ve ventriküler duvar hipertrofisi gözlenir. Bununla birlikte hiç klinik septom da gözlenmeyebilir. Sol ventriküler dilatasyon ve sistolik fonksiyonda bozukluk olmasına rağmen bireyler aseptomik görünür. Bu bireylerde septomlar ekzersiz durumlarında kendini gösterir (42). Prematür ölümler, pompalamanın tamamıyla bozulması, tromboembolik olaylar ve aritmi gibi bozukluklardan dolayı meydana gelir. DKM’nin tanısında kontraksiyon işlevinin azalmasına bağlı olarak kardiyak sistolik ve diastolik boyutunda artma en temel bulgudur (5).

### 2.5.3 Etiyolojisi

Etiyolojisinde kalp kasına ait bozukluklar, miyokardit, iskemik kalp bozukluğu, inflamasyon, infeksiyon, miyokardiyal basıncın artması, toksik ajanlar ve gen defektleri gibi nedenler rol oynar. Aile çalışmaları ve ekokardiyografik ölçümler göstermiştir ki gen mutasyonları sonucu oluşan DKM’nin %25-30’u “idiyopatik DKM” olarak ifade edilir (4). DKM, vakaların %70’nde sporadik %30’nda ailesel olarak ortaya çıkar (4). Ailesel DKM’de, otozomal dominant, otozomal resesif, X’e bağlı ve mitokondrial kalıtım tipleri gözlenmesine rağmen en sıklıkla otozomal kalıtım paterni gözlenir. Son yıllarda DKM’nin etiyojisinin ve patogenezinin daha iyi anlaşılması, Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) kardiyomyopatileri yeniden tanımlanmasına ve sınıflandırmasına neden olmuştur. DSÖ’ye göre Dilate kardiyomyopatiler idiyopatik, ailesel (genetik orijinli), viral (otoimmün orijinli) ve alkolik (toksik orijinli) olmak üzere dört alt gruba ayrılmıştır (1).

Hastalığın orta yaşlardan sonra başlaması ve tam olmayan penetrans, aile bireylerinde tanıyı zorlaştırır. Bu faktörlere ek olarak prematür ölümler ve yeterli sayıda aile bireyinin olmaması genetik analizleri güçleştirir. Bağlantı analizi ve aday gen yaklaşımı gibi metodlar kullanılarak yapılan büyük aile çalışmaları sonucunda DKM ile ilişkili 20’den fazla gen ve lokus tanımlanmıştır (Tablo 1). Ailesel DKM’de tam

olmayan (incomplete) penetrans (mutasyonu taşıyan bireylerin klinik semptom göstermemesi), ekspresivite değişkenliği, lokus ve allelik heterojenite göstermesi tanıda zorluk yaratır (43).

#### **2.5.4 Tanısı ve sınıflandırılması**

Dilate kardiyomyopatinin tanısı noninvazif olarak kardiyak görüntüleme yöntemleriyle yapılır. Genellikle iki boyutlu ekokardiyografi kullanılır (44).

Ekokardiyografide, hastaların tümünde sol ventriküler boşlukta dilatasyon, normal veya incelmış ventriküler duvar ve global olarak sistolik azalma, diastolik fonksiyonda bozukluk ve genellikle kan dolum basıncında artış gözlenir. DKM'nin tanısı, "World Health Organization/International Society ve Federation of Cardiology"nin belirlediği kriterlere göre yapılır.

Ailesel DKM tanısı için probandın 2 veya daha fazla sayıda etkilenmiş akrabalarının olması (DKM tanısı için gerekli kriterleri taşıyan) ve probandın bir akrabasında 35 yaşından önce nedeni açıklanmayan ani ölüm olması, ailesel DKM olarak tanımlanabilir. Ailesel DKM'de aile üyeleri etkilenmiş, etkilenmemiş ve bilinmeyen olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırmanın temelinde minör ve major kriterler önem taşır (44).

Bireyin etkilenmiş olarak tanımlanması için; 1) 2 major kriter veya 2) sol ventrikülde dilatasyon ve bir minör kriter veya 3) 3 minor kriter taşıması gerekmektedir.

Majör kriterler;

- 1) Kısalma fraksiyonunun (KF), %25'den ve ejeksiyon fraksiyonunun (EF) %45'den daha az olması,
- 2) Sol ventrikülde diyastol sonu çapının (LVEDD) %117'den daha yüksek olması,

Minör kriterler;

- 1) Açıklanamayan supraventriküler aritmiler (atriyal fibrilizasyon) veya 50 yaşından önce ventriküler aritmi,
- 2) Sol ventrikül dilatasyonu (>%112),

- 3) Nedeni açıklanmayan sol ventrikül fonksiyon ve kardiyak ileti sistemi bozukluğu,
- 4) 50 yaşından önce inme ve açıklanmayan ani ölüm,

İntraventriküler ileti defektleri veya iskemik kalp hastalığının yokluğunda segmental duvar hareketi anormalliklerinden 3 tanesi probandın akrabalarında varsa etkilenmiş olarak kabul edilir.

Aile öyküsünden başka klinik parametre yoksa ailesel formdan ailesel olmayan formu ayırt etmek zordur. Bazı vakalarda genetik olarak etkilenmiş bireyler asemptomatik olabilmektedir. Bu vakalar çoğunlukla rastgele kardiyak inceleme sonucu ortaya çıkar. Ailesel DKM'li bireylerde tanı, ailesel olmayan bireylere göre daha erken yaşlarda konulmaktadır (44).

DKM, yaşa bağlı penetrans ve klinik heterojenite göstermesine göre de alt klinik gruplara ayrılır: 1) Tek başına dilate kardiyomiyopati, 2) İleti sistem hastalıklarının eşlik ettiği dilate kardiyomiyopati (sinus bradikardisi, atrioventriküler iletim bloğu, atrial taşiaritmiler), 3) İskelet kası miyopatilerinin eşlik ettiği dilate kardiyomiyopati veya hem miyopati hemde ileti sistem bozukluluğunun eşlik etmesi, 4) Sensorinöral işitme kayıplarının eşlik ettiği dilate kardiyomiyopati (42).

## 2.6 DKM ile ilişkili genler ve kromozomal lokusları

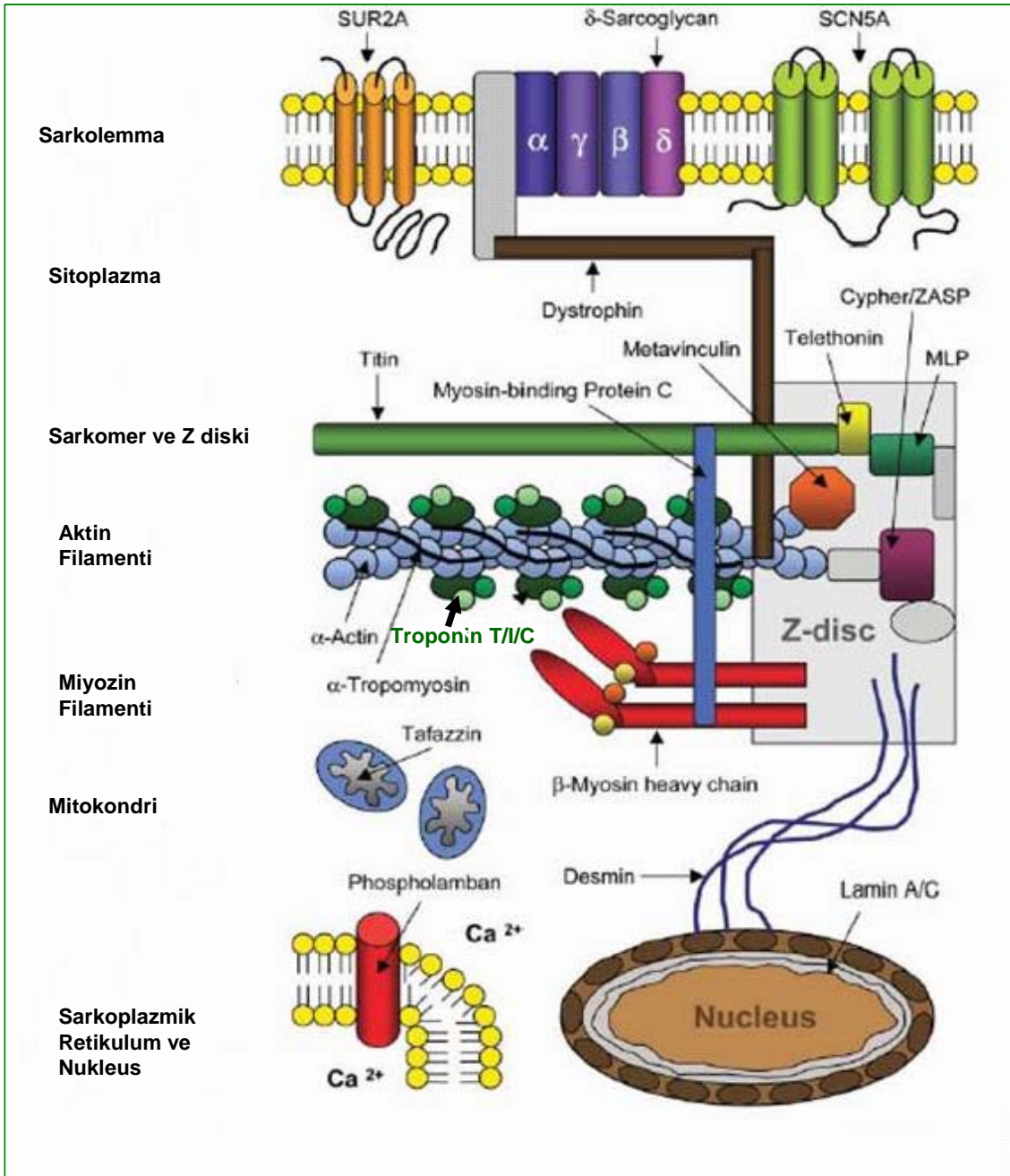
Geçen birkaç yılda Long QT sendromu, hipertrofik ve dilate kardiyomyopatiler gibi bir çok kardiyovasküler hastalığın genetik temeli anlaşılmaya başlanmıştır. Dilate kardiyomyopatili büyük ailelerde genom-wide bağlantı analizi ve küçük ailelerde aday gen yaklaşımı gibi yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu DKM ile ilişkili birçok gen tanımlanmıştır. Bu genlerin kodladığı protein ürünlerinin işlevlerine göre DKM'ye neden olan proteinler beş temel katagoriye ayrılır (5) (şekil 2-11):

- 1- Sarkomerik proteinler; kardiyak aktin, kardiyak troponin T, miyozin binding protein C,  $\alpha$ -tropomyozin,  $\beta$ -miyozin ağır zincir vb.
- 2- Miyosit hücre iskeleti proteinleri; desmin, titin,  $\delta$ -sarkoglikan, plakoglobin, dystrophin, kas LIM protein,  $\alpha$ -aktinin-2, metavinculin vb.
- 3- Nükleer membran yapısına katılan proteinler; lamin A/C, emerin vb.
- 4- Kalsiyum homeostazını düzenleyen proteinler; Sur2a, fosfolamban
- 5- Mitokondriyal genler

Bu proteinleri kodlayan genlerin kalıtım paternine bağlı olarak da DKM, otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı ve mitokondriyal olmak üzere dört gruba ayrılır. (Tablo 1)

Bağlantı analizi ile otozomal dominant kalıtımla ilişkili olarak tanımlanan genlerin dışında sekiz kromozomal lokus tanımlanmıştır. Tanımlanan dört lokusun hepsinde kardiyak dilatasyon gözlenmiştir (45-48). Bu dört lokusun ikisinde, kardiyak dilatasyonun dışında mitral valp prolapsusu (46) ve sensorinöral işitme kaybında azalma (47) gözlenmiştir. Tanımlanan diğer üç lokusta, ileti sistemi bozuklukları ile beraber gözlenen dilate kardiyomyopati görülmüştür (49-51). En son tanımlanan lokus da sadece dilatasyon gözlenmiştir (52). Bu lokuslardaki genler henüz tanımlanmamıştır.

DKM genetik ve fenotik olarak heterojen bir hastalıktır. Henüz etiyolojisi ve patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır. Pozisyonel klonlama ve aday gen yaklaşımı ile DKM yol açan yeni genlerin tanımlanmasına devam edilmektedir. Kardiyak bozuklukların eşlik ettiği iskelet miyopatilerine neden olan, kalpain3, laminin  $\alpha$ -2, miyotonin-protein kinaz ve emerin proteinlerini kodlayan genlerin DKM için aday gen olduğu bildirilmiştir (42).



**Şekil 2-41: Dilate kardiyomiyopatiye yol açan proteinlerin kardiyomiyosit içinde hücresel yerleşimi.** Sarkomer ve hücre iskeleti proteinleri ile nukleus membranı ve sarkolemmadaki proteinlerdeki mutasyonlar dilate kardiyomiyopatiye neden olmaktadır. (Osterziel 2005'den düzenlendi.)

Tablo 2-1: DKM'ye neden genlerin listesi.

Dilate kardiyomyopati ile ilişkili genler					
Kalıtım paterni	Lokus	Gen	Protein	Pretein işlevi	Kaynaklar
	15q14	ACTC	Kardiyak aktin	Sarkomerik protein; kas kasılması	53
	2q35	DES	Desmin	Distrophin ilişkili glikoprotein komplek protein; kasılmanın güç iletimi.	54
	5q33-34	SGCD	$\delta$ - sarkoglikan	Distrophin ilişkili glikoprotein komplek protein; kasılmanın güç iletimi.	55
	14q12	MYH7	$\beta$ -Miyozin ağır zincir	Sarkomerik protein; kas kasılması	56,6
	1q32	TNNT2	Kardiyak troponin T	Sarkomerik protein; kas kasılması	6-8
	15q22.1	TPM1	$\alpha$ - tropomiyozin	Sarkomerik protein; kas kasılması	57
	2q31	TTN	Titin	Sarkomerik yapı	58
	10q22.1-23	VCL	Metavinkülin	Sarkomerik yapı; inretkaladisk	60
	11p11.2	MYBPC	Miyosin bağlayıcı protein C	Sarkomerik protein; kas kasılması	56
	1q21.2-3	LMNA	Lamin A/C	Nüklear membran proteini;	60
	11p15.1	MLP/CSRP3	Kas LIM protein	Sarkomer stretch sensör /Zdisk	61
<b>Otozomal Dominant kalıtım</b>	1q42-q43	ACTN2	$\alpha$ -Actinin-2	Sarkomerik yapı; miyofibrillar aktin için destek	62
	6q22.1	PLN	Phosholamban	Sarkoplazmik retikulum Ca <sup>+</sup> düzenleyicisi; SERCA2 pompasını baskılar	63
	10q22.2-23.3	ZASP/LBD3	Cyber/LIM bağlayıcı domain 3	Hücre iskeletinin bir arada tutulması	64
	12p12.4	ABCC	SUR2A	Kir6.2'nin regülatör subuniti;	65
	14q12	MYH6	$\alpha$ - Miyozin ağır zincir	Sarkomerik protein; kas kasılması	66
	3p21.3-p14.3	TNNC1	Kardiyak troponin C	Sarkomerik protein; kas kasılması	67
<b>Otozomal resesif kalıtım</b>	19q13.4	TNNI3	Troponin I	Sarkomerik protein, kas kasılması	68
<b>X'e bağlı kalıtım</b>	Xp21.2	DMD	dystrophin	Distrophin ilişkili glikoprotein kompleksin primer proteini, kasılmanın iletilmesi	69,70
	Xq28	TAZ/G4.5	Tafazzin	Bilinmiyor.	71
<b>Mitokondrial kalıtım</b>					72

## 2.7 Ailesel Dilate Kardiyomiyopati

### 2.7.1 Otozomal dominant kalıtlı olanlar

Ailesel dilate kardiyomiyopatilerde, ~ %90 sıklıkla otozomal dominant kalıtım paterni gözlenmektedir (73). Otozomal dominant DKM'ye neden olan 17 gen tanımlanmıştır (Tablo 2-1). DKM'de ilk olarak, sarkomerik bir proteini kodlayan "kardiyak aktin" geni hastalıkla ilişkili bulunmuştur. İkinci olarak hücre iskeleti proteini kodlayan "desmin" geni ilişkilendirilmiştir. Fakat idiyopatik DKM ve ailesel DKM için aktin ve desmin gen mutasyonlarının sıklığı (<%1) oldukça nadirdir (74) Daha sonra diğer sarkomerik protein genleri incelenmiş ve  $\beta$ -miyosin ağır zincir, kardiyak troponin T,  $\alpha$ -tropomiyozin, kardiyak miyozin bağlayıcı protein C ve titin genleri de DKM ile ilişkili bulunmuştur. Lamin A/C ve  $\beta$ -miyosin ağır zincir genlerindeki mutasyonların sıklığı diğer otozomal dominant kalıtıma neden olan genlerin sıklığından daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (75). Bu hastalıkta hem lokus hem de allelik heterojenite gözlenmektedir. Aynı genlerde meydana gelen farklı mutasyonlar hem dilate kardiyomiyopati hem de hipertrofik kardiyomiyopati, left ventriküler non kompaksiyon, musküler distrofi ve aritmiye neden olmaktadır. Otozomal dominant kalıtımda çoğunlukla tam olmayan penetrans gözlenmesine rağmen bir çalışmada %100 penetrans bildirilmiştir (67).

### 2.7.2 X'e Bağlı Kalıtımı olanlar

Ailesel dilate kardiyomiyopatili vakaların yaklaşık % 5-10'unda X'e bağlı kalıtım paterni gözlenmektedir (73,75). Bu durumda genellikle distrofin gen mutasyonları sonucu meydana gelmektedir. İdiyopatik dilate kardiyomiyopati tanımlı erkek hastalarda distrofin gen mutasyonları tanımlanmıştır (76). Ayrıca G4.5 (tafazzin) gen mutasyonları da X'e bağlı kalıtım paternine yol açmaktadır. Bu gen mutasyonları X'e bağlı dilate kardiyomiyopatinin non-sendromik ve letal infantil formlarında gözlenmektedir (71).

### 2.7.3 Otozomal resesif kalıtlı olanlar

Otozomal resesif kalıtım, dilate kardiyomiyopatinin yaygın bir nedeni değildir. Kardiyak troponin I geninde bir mutasyonun DKM ile ilişkisi tanımlanmıştır. (68). Otozomal resesif DKM, belli etnik gruplarda ve özellikle erken başlangıçlı (10 yaşından önce) vakalarda daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (77).

### 2.7.4 Mitokondriyal kalıtmı olanlar

Mitokondriyal nokta mutasyonlar veya delesyonlar idiyopatik DKM ve ailesel DKM olgularında rapor edilmiştir (72,78,79). Bununla birlikte kontrol gruplarında da mutasyonlar rapor edilmiştir. Mitokondriyal gen mutasyonları, hastalığın primer nedeni olmasa da hastalığın gelişiminde rol almaktadır. Mitokondriyal gen mutasyonları infantil dönemdeki DKM'li çocuklarda daha yaygın olarak görülür (79).

### 2.8 Dilate Kardiyomyopatiye TNNT2 Gen Mutasyonları

$\Delta$ K210 (Lys210del) mutasyonu, DKM'ye yol açtığı bildirilen, TNNT2 genindeki ilk mutasyondur (56). Bu mutasyon, proteinin karboksi ucunda meydana gelmiştir. Mutasyonun meydana geldiği bu bölge troponin T'nin troponin C ile etkileşime girdiği bölgedir (7,56). Troponin T proteinin, troponin C ile bağlandığı bu bölgede altı adet korunmuş lizin aminoasiti bulunur. Bu bölgedeki korunmuş üç aminoasit (208,209 ve 210. amino asitleri) temel aminoasitlerdir ve troponin C ile troponin T'nin sıkı bir ikili kompleks oluşturmalarına katkı sağlar (56). Housdusse ve grubu bu sıkı bağlantının troponin C'nin yüzeyinde yerleşen asidik aminoasitlerin bir halka ile tamamlayıcı etkileşimi aracılığıyla meydana geldiğini gösterdi (56). Troponin T'nin bu korunmuş bölgesinde bulunan 210. lizin aminoasidinin delesyonu proteinin iyonik etkileşimi azaltır. Aynı zamanda kalsiyum iyonlarının varlığında uyarılan aktomyozin ATPaz'ın aktivasyonunu bozar. Bu mutasyon, kardiyak kas kasılmasında  $Ca^{+2}$  duyarlılığında azalmaya yol açarak kalp kasılmasında meydana gelen güç vurumunda azalmaya neden olur (36,37).

R141W (Arg471Trf) mutasyonu, DKM'ye yol açtığı bildirilen, TNNT2 genindeki ikinci gen mutasyonudur (7). Bu mutasyon, troponin T'nin tropomyozin ile etkileşime girdiği bölgede meydana gelmiştir (7,38). Bu mutasyon, kardiyak kas kasılmasında TnT'nin tropomyozine olan afinitesinde artmaya ve  $Ca^{+2}$  duyarlılığında azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir (36-38).

TNNT2 geninde, DKM ile ilişkili üçüncü mutasyon A171S gen mutasyonudur (80). Troponin T'nin  $\alpha$ -tropomyozin ile etkileşime girdiği korunmuş bir bölgede meydana gelen bu mutasyon, hidrofobik bir amino asit yerine hidrofilik bir aminoasit yer değişimine neden olur (80).

R141W mutasyonu gibi A171S mutasyonunda, troponin T'nin  $\alpha$ -tropomiyozin ile etkileştiği 70-170 aminoasitlik bölgeyi kapsayan kuyruk kısmında meydana gelir. Kuyruk kısmı, tropomiyozine bağlanmada ve oluşan troponin T-tropomiyozin kompleksinin aktin filamenti üzerindeki pozisyonun belirlenmesinde önemlidir (81). Kas kasılmasında Troponin T-tropomiyozin kompleksinin oluşması ile, miyozin başı ve aktinin etkileşebilme yeteneğini düzenlenir.

Son zamanlarda yapılan diğer çalışmalarda, R131W, R205L, ve D270N mutasyonların DKM'ye neden oldukları bildirilmiştir (67). Tanımlanan bu yeni mutasyonların, troponin kompleksindeki proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri ve aynı zamanda bu kompleksin tropomiyozin ve aktin proteinleri ile de etkileşimleri için gerekli olan korunmuş bölgelerde meydana geldiği bildirilmiştir (67).

TNNT2 geninde Arg92Trp ve Lys273Glu gen mutasyonlarının hipertrofik formdan dilate forma geçişle ilgili olduğu bildirilmiştir (82,83).

## 2.9 Genotip-Fenotip İlişkisi

DKM mutasyonları, HKM' ye neden olan aktin filamenti mutasyonlarının tersine, miyofibril fonksiyonlarını baskılamaktadır. Miyofibril fonksiyonlarının kalp kasılmasındaki işlevi düşünülürse DKM'ye neden olan mutasyonların, kalbin kasılma fonksiyonunda azalma ile kalbin diyastolik ve sistolik fonksiyonda bozulma gibi klinik fenotipleri tetiklediğini desteklemektedir (84).

R141W mutasyonlarının saptandığı aileler ile  $\Delta$ K210 mutasyonlarının saptandığı ailelerin hastalık şiddeti açısından benzer olduğu ve mutasyon bulunan hasta bireylerin önemli bir kısmının, yaşamlarının 2. ve 3. dekatlarında kardiyak nedenle erken ölüme yol açtığı ve bu nedenle kardiyak transplantasyon gerektirdiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (6,7). Aynı çalışmalarda, hastalığın ekspresyonunun çeşitlilik gösterdiği gözlenmiş ve mutasyon taşıyan ileri yaşlardaki bireylerde septomlarının hiçbirinin gözlenmediği sağlıklı kişiler olduğu rapor edilerek mutasyonların penetransının tam olmadığı ileri sürülmüştür (6,7). Mogensen ve grubu tarafından yapılan çalışmalarda, TNNT2 gen mutasyonlarının penetransının %100 olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, troponin kompleksindeki üç proteinde gözlenen gen mutasyonlarının sanıldığından daha sık DKM'ye neden olduğu bildirilmiştir (67). Etiyolojisinde TNNT2 genindeki, R141W veya  $\Delta$ K210 mutasyonları gözlenen DKM'li

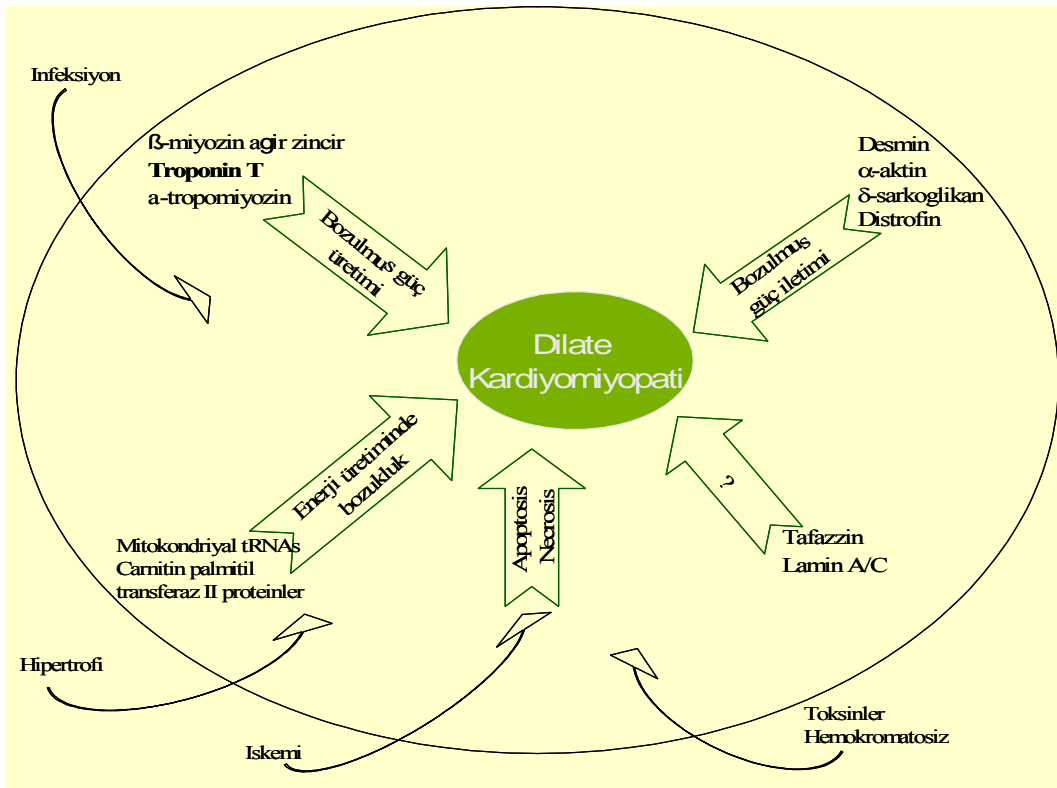
bireylerde hastalığın kötü prognozlu seyrettiği ve yüksek penetrans gösterdiğini ifade etmişlerdir (67). Ayrıca hayvan deneylerinde, infantil kardiyomyopatilere yol açan R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarının fetal isoform olan TnT1 üzerine etkileri araştırılmış ve bu mutasyonların infantil dilate kardiyomyopatinin şiddetini arttırdığı bildirilmiştir (85). R141W mutasyonu, aile bireyleri arasında fenotipik olarak çeşitlilik göstermektedir. Kardiyak septomlar mutasyonu taşıyan bazı bireylerde 20li yaşlarda başlarken, bazı bireylerde 40 yaşlarına gelmelerine rağmen hala ekokardiyografik DKM bulgusu tanımlanmamıştır (6).

Stefanelli ve grubu tarafından rapor edilen A171S mutasyonu, otozomal dominant kalıtım paterni göstermesine rağmen erkek ve kadınlar arasında hastalığın şiddeti açısından farklılıklar göstermektedir. Mutasyonu taşıyan erkek hastalarda, sol ventriküler dilatasyon ve sistolik fonksiyonda bozulmanın kadınlara göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. A171S mutasyonunun, 20 yaşın üzerindeki bireylerde gözlenmediği bildirilmiştir (80).

Hipertrofik kardiyomyopatili hastalarda sistolik fonksiyon normaldir ve sol ventriküler dilatasyon gözlenmez. Sol ventriküler dilatasyonlu kalp yetmezliği ve ejeksiyon fraksiyonunda azalma DKM'nin klinik bulgusu olmasına rağmen HKM hastalarının yaklaşık %10'unda da gözlendiği bildirilmiştir (86). HKM'den DKM fenotipe geçişle ilgili olarak troponin T, alfa tropomyozin, beta miyozin ağır zincir, miyozin bağlayan protein C genleri ve mitokondrial genomda bilinen birkaç spesifik mutasyon belirlenmiştir (82,83,87-88)

## 2.10 DKM' nin patofizyolojisi

Belirli genlerdeki farklı mutasyonlar birçok farklı patofizyolojik mekanizmalar ile DKM'ye yol açmaktadır. Dilate kardiyomyopatiye neden olan patofizyolojik mekanizmalar, güç üretiminde (force generation) azalma, güç iletiminde (force transmission) bozulma, enerji üretiminde yetersizlik ve son olarak da nedeni hala belirlenemeyen durumlar olmak üzere dört hipotez ile açıklanır (Şekil 2-12) (89).



**Şekil 2-52: DKM'ye yol açan çeşitli mekanizmaların şematik görünümü.** Güç üretimi ve iletiminde bozulmalar, enerji üretiminde yetersizlik, ve apoptosis/nekroz mekanizmalarının her biri ventriküler dilatasyona ve kalp kasılmasında defektlere neden olur. DKM'ye neden olan yolaktaki tek gen mutasyonları (çemberin içi), bazı çevresel nedenler (çemberin dışı) gösterilmektedir. ?, etki mekanizmaları bilinmeyen mutasyonlardır. (Schönberger 2001'den düzenlendi.)

Güç üretimde (Force generation) azalma hipotezi;

Kardiyak kasılma, kas hücrelerinde temel kasılma birimi olan sarkomer tarafından üretilen güççe bağlıdır. Sarkomerin, yapısında bulunan proteinlerde meydana gelen mutasyonların aktin molekülü ve miyozin molekülü arasındaki etkileşimi bozarak kasılmanın başlaması için gerekli olan güç vurumunu engelleyerek dilate kardiyomiyopati'ye neden olduğu ileri sürülmektedir. Troponin kompleksi, kas kasılmasında, kalsiyum-bağımlı aktomyozin ATPaz aktivitesini düzenler. Bu kompleksin bir üyesi olan troponin T'deki defektler, aktin-miyozin interaksiyonundaki bağlanma ve ayrılma için gerekli olan enerjin üretilmesini baskılayarak sarkomer içindeki kasılma gücünü azaltır (43). Kardiyak troponin T genindeki Lys 210 delesyonu, kardiyak troponin T'nin kardiyak troponin C ile etkileşime girdiği bölgede meydana gelmekte ve iyonik etkileşimi zayıflatmaktadır. Etkileşimin zayıflaması, kalsiyum-bağımlı aktomyozin ATPaz'ın kalsiyuma duyarlılığında azalmaya neden olur. Kalsiyum duyarlılığında azalma, aktin molekülü ile miyozin molekülünün etkileşimi bozarak güç vurumunun oluşumunu engellemektedir (36-38). Böylece, azalma dilatasyona ve sistolik fonksiyonda bozukluğa neden olur .

R141W mutasyonu, troponin T'nin tropomyozine olan afinitesinde artış göstermesi ile ilişkili bulunmuştur. Troponin T, aktin filamenti ile troponin I'nın etkileşimini sağladığı için troponin T'nin tropomyozine olan afinitesindeki bu artış aktin ile troponin I'nın etkileşimini güçlendirmektedir. Buna bağlı olarak kalsiyum iyonlarınca uyarılan troponin C ile troponin I'nın etkileşimini azaltarak kasılmanın bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir (81).

A171S mutasyonu, DKM'ye neden olan diğer iki mutasyon gibi miyositlerde kalsiyum iyonları ile düzenlenen güç üretiminde kalsiyum iyonlarına karşı cevabın azalmasına neden olur. A171S mutasyonu, troponin T'nin tropomyozin ile etkileşime girdiği karboksi terminal bölgesinde meydana gelir. Buna bağlı olarak tropomyozinin bağlanmasını direk etkileyebileceği düşünülmektedir. Kalsiyum iyonlarına cevapta bu anormallikler kardiyak fonksiyonda sistolik ve diyastolik anormalliklere neden olabilir (80).

Miyozin molekülü'nün aktin molekülü ile bağlanma bölgesinde yer alan mutasyonların, kasılmanın güç vurumunun (pover stroke), başka bir deyişle aktin molekülü ile miyozin molekülü arasındaki etkileşim sonucu açığa çıkan güç'ün

baskılanmasına yol açmaktadır. Miyozin molekülünün diğer bağlantı bölgelerinde ki amino asit değişimlerine neden olan mutasyonların kasılma döngüsü esnasında miyozin filamentleri boyunca hareketin devamı ve yönünü etkileyen yapısal değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (89).

Gücün iletilmesi (Force transmisson) bozulma hipotezi:

Kalp kasılmasının fizyolojisinde, sarkomer tarafından üretilen gücün etkili biçimde ekstrasellular matrikse iletimi gerekmektedir. Hücre iskeleti, hücre içinde bir yapısal iskelet oluşturarak sarkomer tarafından oluşturulan kasılma gücünün (force) sarkomerden ekstrasellular matrikse iletilmesinde önemli rol oynamaktadır. Böylece, hücre iskeleti proteinlerinde meydana gelen mutasyonların gücün iletilmesinde (force transmissionunda) azalmaya neden olarak DKM'ye yol açtığı ileri sürülmektedir. Sarkomerin merkezinde yer alan kardiyak aktin, gücün üretilmesine katkı sağladığı gibi hücre iskeleti proteinleri ile de bağlantılı olmasında dolayı oluşan gücün iletilmesine katkı sağlar. Kardiyak aktin geninde, erken başlangıçlı otozomal dominant dilate kardiyomyopatiye neden olan iki mutasyonun, aktinin hücre iskeleti proteinleri ile etkileşime girdiği bölgelerde meydana geldiği bildirilmiştir (54). Bu mutasyonların, aktinin hücre iskeleti proteinleri ile etkileşime girdiği amino asitlerde değişimlerine neden olarak, sarkomerden hücre iskeletine gücün iletilmesini azalttığı ve böylece dilate kardiyomyopatiye yol açtığı bildirilmiştir (89).

Alfa-tropomiyozini kodlayan gende, tanımlanan DKM ile ilişkili iki mutasyonun (57), tropomiyozinin aktin ve troponin kompleksinin bileşenlerinin oluşturduğu aktin (ince) filamentinin bütünlüğünü bozarak güç iletiminde defektlere neden olduğu bildirilmiştir (89).

Hücre iskeletinin, sarkolemmaya bağlandığı bölgede kostamer lokalizasyonunu sağlayan desmin ve Z diski bileşenlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların güç aktarımında probleme neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu mutasyonlar ya kostamerlerdeki kararlılığın bozulmasına ya da Z diskindeki uzama aşamasında defektlere sebep olduğu düşünülmektedir (89). Ayrıca DKM'ye neden olan,  $\delta$ -sarkoglikan, metavinculin ve distrofin genlerinde tanımlanan mutasyonlarında gücün iletilmesinde bozulmaya neden olduğu desteklenmektedir (55,59,69).

TNNT2 genindeki DKM ile ilişkili R141W ve ΔK210 mutasyonları, kalsiyum duyarlılığında azalmaya neden olurken HKM ile ilişkili mutasyonlar kalsiyum duyarlılığında artış ile ilişkilidir (38,90). Bu mutasyonlar, kasılmada kalsiyuma karşı cevabının azalmasına, kalp kasılmasında azalmaya ve kardiyak dilatasyona yol açar Aynı gendeki farklı mutasyonlar kalsiyum duyarlılığında artışa neden olarak anormal kuvvetli bir kasılmaya, orta dereceli hipertrofiye ve aritmiye yatkınlığa sebep olur (81).

#### Enerji üretiminde yetersizlik hipotezi:

Roe ve Ding tarafından yapılan çalışmalarda, kardiyak yağ asitlerinin β-oksidasyonunda yer alan enzim ve transport proteinleri kodlayan genlerdeki resesif mutasyonların dilate kardiyomyopatiye neden olduğu bildirilmiştir (89). Enerji yokluğunda, mitokondriyal β-oksidasyon önemli bir enerji kaynağıdır. Mitokondriyal β-oksidasyon etki yolundaki hatalar yetersiz enerji sebebiyle dolaylı veya oksidasyondaki ara metabolitlerin zararlı etkisi sebebiyle doğrudan miyokardiyuma zarar verir.

*Carnitin*, uzun-zincirli yağ asitlerinin mitokondriye alımı için gereklidir. *Carnitin* eksikliği uzun zincir yağ asitlerinin mitokondri içine alınması engeller. *Carnitin* aktarımında ve metabolizmasında rol oynayan proteinlerdeki mutasyonlar dilate kardiyomyopati ile ilişkili bulunmuştur ve bu mutasyonların resesif bir kalıtıma neden olduğu Roe ve Ding tarafından bildirilmiştir (89).

#### Mutasyonların mekanizmalarının açıklanamadığı durum:

Tafazzin (G4.5), lamin A/C (LMNA) gen mutasyonlarının da dilate kardiyomyopatiye yol açtığı bildirilmiştir (59,70). Lamin A ve C, hücrede iç nükleer lamina da bulunan ara filament proteinleridir. Nükleer membranın bütünlüğünün korunmasında yapısal bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Lamin A ve C kardiyak miyositlerde hem gücün iletiminde hem de gücün üretiminde doğrudan katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir fakat bunun nasıl olduğu henüz açık değildir (89). Tafazzin, işlevi henüz tam olarak bilinmeyen bir proteindir. G4.5 geni tarafından kodlanır. Bu gen mutasyonları sonucu dilate kardiyomyopatinin klinik özelliklerini taşıyan Barth sendromu gelişir. Asiltransferaz gen ailesinin bir üyesi olan tafazzin, fosfolipit biyosentezinde yer alır fakat diğer yapısal proteinlerle ilişkisi henüz bilinmemektedir (89). Bu nedenle DKM'ye nasıl yol açtığı da açık değildir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereçler

##### 3.1.1 Hasta Grubu

Hasta grubu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı'nda fizik inceleme elektrokardiyografik (EKG), ekokardiyografik, telekardiyografik incelemeler ve laboratuvar tetkikleri sonucunda idiyopatik dilate kardiyomyopati tanısı konmuş 23 hastadan oluşturuldu. Tanıda DSÖ kriterleri esas alındı. Bu hastalarda, dilate kardiyomyopatinin etyolojisinde yer alan metabolizma hastalıklarını dışlamak için viral seroloji, aritmi, idrar ve kan aminoasitleri, T3, T4, TSH, karnitin, selenyum, privat laktat, ve kan gazı laboratuvar tetkikleri yapıldı ve herhangi bir patoloji saptanmadı. İdiyopatik DKM tanısı alan hastalardan, 10 ml venöz kan örneği vakumlu steril EDTA'lı tüplere alındı ve toplanan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılarak DNA bankası oluşturuldu.

##### 3.1.2 Kontrol Grubu

Kontrol grubu olarak DKM bulgularına sahip olmayan 100 sağlıklı bireyden oluşturulan DNA bankası kullanıldı. TNNT2 geninin, allelik heterojenite göstermesinden dolayı saptanan değişim veya değişimlerin DKM spesifik olduğunun ispatlanması için daha önceden hipertrofik kardiyomyopati bireylerden oluşturulan DNA bankasından 50 hipertrofik kardiyomyopati birey TNNT2 gen mutasyonları açısından incelendi. Hipertrofik kardiyomyopati 50 bireyin 16'sında hastalık ailesel olarak ortaya çıktığı gözlemlendi.

### 3.1.3 Bilgilendirilmiş Onay Formu

#### 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 dilate kardiyomyopati hastası ile 100 sağlıklı gönüllü yer alacaktır.

Yapılması planlanan genetik incelemeler için sizden maddi destek talep edilmeyecektir.

### 3.1.4 Onay Formu

#### 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,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı, İmzası

### 3.1.5. Kimyasallar

Agaroz

Akrilamid

Amonyum asetat

Amonyum klorid

Amonyum persülfat

Glasiyal Asetik asit

Bisakrilamid

Borik asit

Bromo fenol blue

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)

Etidium bromid

Etil alkol

Formaldehit

Formamid

Gliserol (%100)

Gümüş nitrat

Ksilen siyanol

Mineral yağ

Potasyum klorid (KCl)

Sodyum klorid (NaCl)

Sodyum hidroksid (NaOH)

Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Tetrametiletildiamin (TEMED)

Tris – HCl

### 3.1.6 Kullanılan Cihazlar

PZR cihazı	(Eppendorf , Pelkin Elmer)
Yatay elektroforez aleti	(Bio-Rad)
Güç kaynağı	(EC Appatus corporation)
CCD kamera- bilgisayar donanımı	(Mitsubishi, Macintosh centis 650)
UV-transilluminatör	(Fotodyne)
Yatay çalkalayıcı	(Edmund Bühler, WS-5)
Dikey elektroforez aleti	(Owl Separation Systems)
Dikey soğutucu	(Polyscience)
Horizontal beyaz ışık kaynağı	(Fotodyne)
Spektrofotometre	(Biotech)
Çalkalamalı su banyosu	(Memmert)
Çeker ocak	(Kermanlar)
Hassas Terazı	(Shimadzu)
Mikropipetler	(Gilson, Eppendorf)
Vorteks	(Kermanlar)
Isı bloğu	(VWR-scientific)
Masaüstü mini santrifüj	(Eppendorf)
Buzdolapları ve dondurucular (+4 <sup>0</sup> C ve -20 <sup>0</sup> C)	(Uğur, arçelik)
Distile su cihazı	(Milipore)
Hibridizasyon fırını	(Techne)
PH metre	(Corning)
Soğutmalı santrifüj	(Heraus)

### 3.1.7 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

#### DNA İzolasyonu için kullanılan çözeltiler

**EDTA 0,5 M** (1000 ml)

186,1g EDTA distile su ile 1000ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

**Tris-HCl 1 M** (1000 ml, pH 8.0)

121,1 g Tris-HCl distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH HCl ile 8.0'a ayarlandı ve otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

**Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Stok Çözeltisi %10** (50 ml)

5 g SDS distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon, 0.2-0.45 µm'lik membran ile filtre edilerek yapıldı. Oda ısısında muhafaza edildi.

**Sodyum Klorür – NaCl 5M** (100 ml)

29,22 g NaCl distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

**Amonyum asetat - NH<sub>4</sub>Ac 9.5 M** (1000 ml)

770 g NH<sub>4</sub>Ac distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 0.2-0.45 µm membran ile filtre edilerek oda ısısında muhafaza edildi.

**Tris-EDTA (TE) Tamponu** (100 ml, pH 8.0)

1 ml 1M Tris-HCl ve 2 ml 0,5 M EDTA distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

**Proteinaz K** (1ml, 20 mg/ml)

0,02 g proteinaz K 1 ml'ye steril distile su ile tamamlandı ve -20 °C'de saklandı.

**Eritrosit parçalama çözeltisi (RBL)** (1000 ml, pH 7.4)

1 g KHCO<sub>3</sub>, 200 µl 0,5 M EDTA, 8,74 g NH<sub>4</sub>Cl distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH NaOH ile 7.4'a ayarlandı ve otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

**Lökosit parçalama çözeltisi ( WBL) (400 ml)**

10 ml 4M NaCl, 20 ml 0,5 M EDTA distile su ile 400 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

**Agaroz Jel Elektroforez Çözeltileri**

**Etidyum Bromür**

Steril distile su ile 10 mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

**6X Agaroz Jel Yükleme Tamponu (10 ml)**

10 ml steril distile su içinde %0,25 bromofenol mavisi, %30 Gliserol olacak şekilde 6X konsantrasyonda hazırlandı ve oda ısısından muhafaza edildi.

**50X TAE (Tris-asetat EDTA) (1000 ml)**

292 gr Tris base, 57,1 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

**Poliakrilamid Jel Elektroforez Çözeltileri**

**5X TBE (Tris baz-Borik asit- EDTA) (1000 ml)**

60,57 gr Tris base, 30,9 gr Borik asit ve 3,75 gr EDTA distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

**%12'lik Non denatüre edici poliakrilamid jel stok çözelti (99 :1) (100 ml)**

11,88 gr Akrilamid, 0,12 gr N,N'Methylene-bis-Bisakrilamid, 10 ml %100 gliserol ve 10 ml 5X TBE distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Oda ısısında saklandı. Kullanımdan önce membran filtre kağıdı ile süzüldü.

**%8'lik Non denatüre edici poliakrilamid jel stok çözelti (99 :1) (100 ml)**

7,92 gr Akrilamid, 0,08 gr Bisakrilamid, 10 ml %100 gliserol ve 10 ml 5X TBE distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Oda ısısında saklandı. Kullanımdan önce membran filtre kağıdı ile süzüldü.

**Amonyum Persülfat (APS) %10 stok çözelti (50 ml)**

10 g amonyum persülfat steril distile su ile 50ml'ye tamamlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi

**2X Denatüre edici poliakrilamid jel yükleme tamponu** (1000 µl)

980 µl formamid (%95), 5 µl bromofenol mavisi (%5), 5 µl ksilen siyanol (%5) ve 10 µl EDTA (25 mM) toplam hacim 1000 µl olarak hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

**Gümüş Boyama Çözeltileri**

Fiksasyon Çözeltisi (A Solüsyonu) 10X (300 ml)

15 ml Glasiyal asetik asit, 285 ml % 95 etil alkol distile su ile 300ml'ye tamamlandı.

Boyama Çözeltisi (B Solüsyonu) 10X (300 ml)

3 g AgNO<sub>3</sub> (%1) distile su ile 300ml'ye tamamlandı.

Geliştirme Çözeltisi (C Solüsyonu) 1X (300 ml)

4,5 gr NaOH, 0,03 gr NaBorat ve 1,2 ml formaldehit distile su ile 300ml'ye tamamlandı. (Taze hazırlanır.)

Sabitleme Çözeltisi D solüsyonu 10X (300 ml)

22.5 g NaHCO<sub>3</sub> distile su ile 300ml'ye tamamlandı.

### **PZR Reaksiyonu için Kullanılan Cözeltiler**

<i>Taq</i> DNA polimeraz (rekombinant)	(5U/ µl) MBI Fermantas -20 °C’de muhafaza edilir.
PZR Tampon (10X)	100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0,8 nonidet P40 -20 °C’de muhafaza edilir.
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM) -20 °C’de muhafaza edilir.
dNTP	100 mM’lık deoksi-nükleotid trifosfatların her birinden 10 mM içerecek şekilde stok karışım hazırlanır. -20 °C’de muhafaza edilir.
Primerler	Hazır liyofilize şekildeki primerler, 100 µM stok çözelti hazırlanacak şekilde otoklavlanmış filtreden geçirilmiş distile su içerisinde vorteks ile çözülür. -20 °C’de muhafaza edilir.

### **RFLP için Kullanılan Kimyasallar**

Restriksiyon Enzimi:	<i>Hpa II (MspI)</i> 10 U/µl, MBI Fermantas, -20 °C’de muhafaza edilir.
İnkübasyon ısısı	37°C
İnkübasyon süresi	4 saat
Tanım bölgesi	5’...C – CGG...3’ 3’...GGC – C...5’
Buffer Y+/Tango	33 mM tris-asetat pH 7.9, 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0,1 mg/ml BSA, -20 °C’de muhafaza edilir.

**Kullanılan Kitler****PZR Purifikasyon Kiti (Roche)**

Bağlama solüsyonu: (Binding Buffer )

3M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, % 5 Etanol, pH 6,6

Yıkama solüsyonu: (Wash Buffer) :

% 20 Etanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5

Elisyon solüsyonu : (Elution Buffer)

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1 Periferik kandan DNA izolasyonu

1) 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit parçalama solüsyonu (RBL) eklendi. + 4°C'de 10 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

2) Örnek, santrifüjden alınarak süpernatant kısmı atıldı. Pellet kısmı vortekslendi ve üzerine 1:3 oranında RBL solüsyonu eklenip 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası işlem tekrarlandı.

3) Pellet iyice vortekslenerek üzerine 10 ml lökosit parçalayıcı solüsyon (WBL), 500 µl SDS (%10'luk), ve 50 µl proteinaz K (20mg/ml) eklenerek gece boyu 56 °C'de inkübe edildi.

4) İnkübasyon sonrası örnekler 3700 µl Amonyum asetat (9,5 M) ilave edilip iyice homojenize edildi. 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.

5) Santrifüj sonrası süpernatant kısmı steril falkon tüpe alınarak üzerine 1:2 oranında %100 etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi.

6) Toplanan DNA steril 1.5'luk eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine %70'lik etanol eklenerek 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip DNA çöktürüldü. Üst faz pipet yardımıyla alındı ve tüpler 56 °C de ısıtıcı bloklara konularak kalan alkolün uçması sağlandı.

7) Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100-300 µl TE (Tris-EDTA) tamponu eklenerek DNA'nın çözünmesi için 56 °C'de 1 saat bekletildi ve DNA + 4°C'de saklandı.

#### 3.2.2 DNA konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü. Stok DNA örneğinden 10 µl örnek 0.5 ml'lik eppendorf tüpüne konuldu. Üzerine 190 µl TE tamponu eklenerek örneğimiz 1/20 oranında sulandırıldı. Hazırlanan örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçüldü.

DNA miktarı ve saflığı formüle göre hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon} = 20 (\text{dilüsyon oranı}) \times 50 (\text{sabit}) \times \text{OD } 260 = \text{ng}/\mu\text{l DNA}$$

DNA'nın saflığı;

$$\text{OD } 260/280 > 1.8 \text{ RNA,}$$

$$\text{OD } 260/280 < 1.8 \text{ protein, kontaminasyonu olarak değerlendirildi.}$$

### 3.2.3 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Kardiyak troponin T (TNNT2) geninin daha önceki çalışmalarda mutasyon bulunan 10. ve 13. eksonlarını amplifiye etmek için [NM\\_000364](#) dizisi üzerinden "FastPCR" (Microsoft Visual Studia 6.0, Visual Basic 6.0 SP6) primer dizayn programı kullanılarak forward ve reverse primer çiftleri dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerin "BLAST" programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırıldı ve başka genlere uymadığı saptandı.

Hasta ve kontrol örneklerine ait genomik DNA'lar kardiyak TNNT2 geninin 2 ekzon bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Her reaksiyon için forward ve reverse olmak üzere iki çift primer kullanıldı. (şekil )

#### Ekzon 10

```
gtgtgacct cegtggagct ggttgaaagt ggagcccttg gaggccgggc
accattcttc aagactctgg aaggaacct ccccaggaa ttcctttgc
caccce atgc aggtttctgt acctgcgagt gtcaccttct cccatgcac
acctgggtgc gtttgccttt cgtccttagg agaaacgtcg ggcagagcgg
gcccagcagc agcgcctccg gaatgagcgg gagaaggagc ggcagaaccg
cctggctgtg agtgacctt agcccaggcc catggaggcc ccccatgctc
ccagctcctg ctgggcccc aggccctct ctattcatca acatgaaatga
aatcagtc aa gagacaatatt
```

#### Ekzon 13

```
ctcctgcagg cettgctcca ccccagggg gtttggggag ggttagggga
cagggaggg gcaatctggc cagt ttactc tgcttcccac acctccaga
cagagcggaa aagtgggaag aggcagactg agcgggaaa gaagaagaag
attctgctg agaggaggaa ggtgctggcc attgaccacc tgaatgaaga
tcagctgagg tggggctgg gaggaatggt cctggggcac tgcctcctc
tgctctggga ggggtcggc caaggcact tcttctgtg agccaccaga
gggcaggact gctcacata tttcccatg gcaagtttgg tgggaccaga
gctgggcccc agcaggtegg gccaactcct ttctgggctt tgctgatggg
gaaaagaaac tgaacaggtg cccaccct ctgaacttca cctaccacc
```

Şekil 3-0-1: TNNT2 geni 10. ve 13. ekson dizileri ve primer yerleşimi.

**Pembe bölümler:** eksonları, **sarı bölümler:** forward ve revers primerleri, altı çizili ve italik kısımlar; çoğaltılan bölgeyi göstermektedir (NM\_000364).

**Tablo 3-1: TNNT2 geni 10. ve 13. ekzonların PZR primer çiftleri.**

<b>Primerler:</b>	
<b>Ekzon 10</b>	
TNNT2 10 Forward	5'- ATGCAGGTTTCTGTACCTGCGATG – 3'
TNNT2 10 Reverse	5'- TGATGATGAATAGAGFAGGGGCCTG – 3'
<b>Ekzon 13</b>	
TNNT2 13 Forward	5'- TTA CTCTGCTTCCCACAC – 3'
TNNT2 13 Reverse	5'- ATCAGCAAAGCCCAGAAAGG – 3'

**Tablo 3-2: TNNT2 geni 10. ve 13. ekzonlarının PZR koşulları.**

<b>PZR Reaksiyon içeriği</b>	<b>Miktar</b>	<b>PZR reaksiyon koşulları</b>	
<b>Ekzon 10</b>			
10X tampon	2.5 µl	Predenatürasyon	95 °C 5'
dNTP's	2 µl	Denatürasyon	95 °C 1'
Primerler	1µl	Bağlanma (Anneling)	62 °C 30''
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C 30''
Taq polimeraz (MBI)	0,1µl	Tamamlanma	72 °C 10'
DNA (100ng)	0,5 µl	Döngü sayısı	35
<b>Ekzon 13</b>			
10X tampon	2.5 µl	Predenatürasyon	94 °C 5'
dNTP (2mM)	2 µl	Denatürasyon	94 °C 1'
Primerler (10pmol)	1,5 µl	Bağlanma (Anneling)	58 °C 30''
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C 30''
Taq polimeraz (MBI)	0,1µl	Tamamlanma	72 °C 10'
DNA (100ng)	0,5 µl	Döngü sayısı	35

### **3.2.4 Agaroz Jel Elektrofrez**

Toplam 25 µl volümde gerçekleştirilen PZR ile çoğaltılmış bölgenin kontrolü amacı ile 10 µl örnek alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele Puc-Mix (MBI) size marker ile birlikte yüklenen PZR ürünleri, 85 miliamper akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. UV ışık altında CCD kamera ile görüntüler bilgisayara aktarıldı.

### **Agaroz Jelin Hazırlanması**

% 2 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1 g agaroz tartılarak 50 ml TAE solüsyonu içinde bir beherde çözündürüldü. Karışım mikrodalga fırında homojenize olana dek kaynatıldı. Takiben 56<sup>0</sup>C'ye kadar soğutularak içerisine 10mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1 µl çeker ocak altında eklendi. Sıvı haldeki agaroz elektrofrez tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve jelin donması için beklendi. Tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektrofrez tankına yerleştirildi.

### **Agaroz Jelin Yüklmesi- Elektrofrez- Görüntülenmesi**

Daha önce hazırlanan agaroz jeli, içinde yürütme tamponu TAE bulunan yürütme tankına, kuyular negatif kutba yakın olacak şekilde yerleştirildi. PZR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara çökmesini sağlamak amacıyla 6X brom fenol mavisi içeren yükleme tamponundan 1µl, PZR ürününden 10 µl örnek karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Bütün örnekler ve Puc-Mix (MBI) size marker yüklenmesini takiben tankın elektrotları güç kaynağına takıldı ve 80-90 V akımda örnekler yaklaşık 15-30 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel UV ışığı altında CCD kamera ile görüntülendi. Görüntüler bilgisayara aktarıldı ve thermal kağıda bilgisayar çıktıları alındı.

### 3.2.5 Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi / SSCP (Single Strand Conformation polymorphism-)

Tek bazlık değişimlere hassas bir teknik olan SSCP analizinde PZR reaksiyonu sonucu çoğaltılan ürünlerin non-denatüre poliakrilamid jel elektroforezinde mobilite farklılıklarına göre bantların ayrılması sağlanacak ve görüntüleme için de gümüş boyama yöntemi uygulanacaktır. SSCP analizinde kullanılan poliakrilamid solüsyonuna gliserol eklenmesi ilk şarttır. Jele yüklenecek PZR ürünleri yükleme öncesi denatüre edilmelidir. Denatürasyon amacıyla örnekler formamid içeren yükleme tamponu ile karıştırılarak 94 °C'de denatüre edilmelidir. Denatüre edilen örnekler buz üstüne alınarak DNA'nın tek iplikli halde kalması sağlanmalıdır. SSCP analizinin hassasiyetinin 350-400 bp uzunluğunu aşan DNA örneklerinde azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle örneklerin çoğalma boyutu 200-320 bp arasında tutulmuştur. Örnekler sabit volt ve ısıda yürütüldü. Jel gümüş nitrat ile boyanarak örneklere ait bantlar analiz edildi.

#### **Poliakrilamid Jelin Hazırlanması**

Jelin döküleceği cam yüzeyler, spacer'lar ve taraklar deterjanla iyice yıkandı, durulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Cam çiftleri araya spacer yerleştirilerek karşılıklı getirildi ve özel mandallarla sabitlendi. Önceden hazırlanmış ve filtre edilmiş poliakrilamid solüsyonundan 2 ml ayrı bir falkona tüpe alındı. İçerisine polimerizasyon için 40 µl APS ve polimerizasyonun hızlanması için 2 µl TEMED eklendi, karıştırıldı ve camların alt kısmına pipet yardımı ile aktarıldı. Böylece hızla donma eğiliminde olan jelden bir bariyer oluşması sağlandı.

Elde edilen cam aparatın yüzey alanı ve araya konulan 0.8 mm'lik spacer sebebiyle 25 ml sıvı alacağı bilindiğinden yine ayrı bir falkon tüpte 25 ml poliakrilamid içerisine 250 µl (1:100) APS ve 25 µl (1:1000)TEMED eklendi, karıştırıldı ve cam aparata arada hava boşluğu kalmamasına dikkat edilerek boşaltıldı. Hızlıca tarak yerleştirildi ve jel yatay pozisyonda 2 saat oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

#### **Poliakrilamid Jelin Yüklmesi- Elektroforezi- Görüntülenmesi**

Polimerizasyon sonrası camlar elektroforez cihazına yerleştirildi, yürütme tamponu olarak 0.5 X TBE tamponu ilave edildi. PZR ürünlerinin jele yüklemeyen önce denatüre edilmesi amacıyla 3:1 PZR ürünü, 9 l formamid (final konsantrasyon %75 v:v) içeren 2X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 10 dakika süre ile 95 °C'de denatüre

°C) alındı. Böylece örneklerin renatüre olması engellenmektedir. Örnekler jelle hızlı bir şekilde yüklendikten sonra dikey elektroforez sisteminin elektrodları yerleştirildi. Farklı voltaj, akım ve yürütme süreleri denenerek SSCP işlemi her ampikon için özel olarak optimize edildi. Bunun yanı sıra yüksek gerilim altında yürütülen örneklerin bu sebeple oluşacak ısı değişikliklerinden etkilenerek konformasyon değiştirmelerini önlemek amacıyla da elektroforez süresince dikey jel sisteminde sabit bir ısı aralığı sağlanması gerekmektedir. Çalışmalarımızda dikey elektroforez sistemlerimizde soğutucu yardımıyla sabit ısı altında çalışılmıştır. Optimize edilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi. Hasta ve kontrol örneklerine ait TNNT2 geninin 10. ve 13. eksonlarının SSCP analizinde kullanılan poliakrilamid jel solüsyon içerikleri ve koşulları tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 3-3: SSCP taraması için poliakrilamid jel konsantrasyonları ve yürütme şartları**

	PAG (%)	Gliserol (%)	Isı (°C)	Volt	Akım (Miliamper)	Yürütme zamanı (saat)
Ekzon 10	12	10	23	600	200	4,5
Ekzon 13	8	10	20	450	200	2,5

### **Poliakrilamid Jelin Gümüş Nitrat ile Boyanması**

PZR ürünlerinin görüntülenebilir hale getirilmesi amacıyla yapılan gümüş boyamada kullanılan solüsyonlarda ve boyama esnasında kullanılan suyun kalitesi önemlidir. Bu nedenle kaliteli distile su kullanıldı. Yürütmesi sonlanan jel tek cam yüzeyi üzerinde tutunacak şekilde uygun bir kap içine alınarak 6 dakika 300 ml 1X A solüsyonu içerisinde hafifçe çalkalanarak tutuldu. Ardından 100 ml distile su ile durulandı. Daha sonra jel 300 ml 1X B solüsyonunda 15 dakika çalkalandı ve yine 100 ml distile su ile durulandı. Bundan sonra jel, bantlar görünür hale gelene dek taze olarak hazırlanan 300 ml 1X C solüsyonunda bekletildi. Bantların iyice belirginleşmesiyle jel son defa distile su ile durulandı ve D solüsyonu ile renk fikse edildi. Boyaması

tamamlanan jeller nemli olarak asetat arasına alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

### 3.2.7 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Mutasyon Taraması

TNNT2 geninin 10. eksonunda Arg141Trp (C471T) mutasyonu için Hpa II restriksiyon enzimi tanıma bölgesi içermektedir. 471. nükleotiddeki C'nin T'ye dönüşümü Hpa II restriksiyon enziminin 5'...C – CGG...3' olan tanıma bölgesinin değişmesine neden olmaktadır. Böylece mutasyonlu örneklerde restriksiyon kesimi meydana gelmemektedir. Mutasyonun taranması amacı ile çoğaltılan örnekler tablo 3-4'te belirtilen şartlarda Hpa II restriksiyon enzimi kesimi yapıldı (tablo 3-4).

**Tablo 3-4: Hpa II restriksiyon enzim kesimi şartları**

Reaksiyon karışımı	Miktarı
Y+/Tango Buffer	2,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,7 µl
Enzim	0,3 µl
PZR ürünü	15,0 µl
Toplam hacim	20,0 µl

37<sup>0</sup>C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında örnekler reaksiyonun sonlanması için -20<sup>0</sup>C'ye konuldu. Kesim ürünlerinin bant boyutlarının birbirine yakın olması nedeni ile örnekler % 5 agaroz jel elektroforezinde size markerla kontrol edildi.

Ayrıca örnek boyutlarının yakın olması nedeniyle enzim kesim örnekleri %10'luk poliakrilamid jel elektroforezinde size markerla kontrol edildi. Görüntüleme için gümüş boyama uygulandı.

### **3.2.6. Dizileme Analizi**

#### **Dizilenecek Örneklerin Seçimi**

SSCP yönteminde mobilite farklılığı yaratan örnekler nükleotid değişimlerinin tanımlanması amacı ile dizi analizi yapıldı. Dizilemeye, farklılık gözlenen ve kontrol amacıyla değişim göstermeyen örnekler gönderildi.

#### **Dizilenecek Örneklerin Purifikasyonu (saflaştırılması)**

Dizilemeye gönderilecek DNA örneklerine 100µl'lik PZR yapıldı. PZR ürünlerinin saf ve temiz olması gereklidir. Bu nedenle ortamda arta kalan PZR bileşenlerini uzaklaştırmak amacıyla PZR ürünleri, purifikasyon kiti (Roche) kullanılarak saflaştırıldı.

100 ml PZR ürününe 500 ml bağlanma solüsyonu eklendi. Örnekle solüsyon homojenize olması için iyice karıştırıldı. Karışım toplama tüplerinin içine yerleştirilen filtreli tüplere aktarıldı ve 13.000 rpm'de 30-60 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yeni toplama tüpü içine filtreli tüplere aktarılıp, 500 ml yıkama solüsyonu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası aynı işlem tekrar edilerek 200 ml yıkama solüsyonu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtreli tüpler steril 1,5ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 100 ml elisyon solüsyonu eklenerek, 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamanın sonrasında örnekler saf halde elde edildi. Saflaştırılan ürünler %2lik agaroz jel elektroforezinde ΦX174 markerıyla yürütülerek yoğunlukları hesaplandı ve dizileme analizine gönderildi. Örnekler dizileme analizine kadar +4 °C'de saklandı.

#### **Dizileme Örneklerinin Bilgisayar Analizleri**

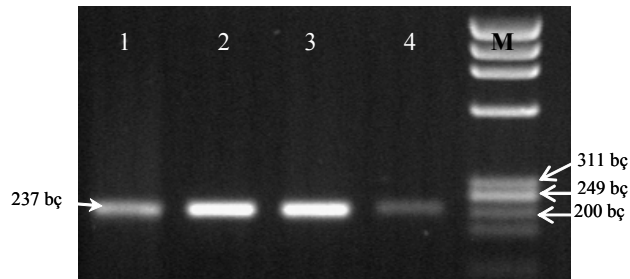
Dizileme sonuçları Chromas MFC Application 2.3.0.0 Software kullanılarak analiz edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada, idiyopatik dilate kardiyomyopati (DKM) hastalarının etyolojik nedenlerinin araştırılmasının bir basamağı olarak TNNT2 gen mutasyonlarının ve bu mutasyonların fenotip-genotip ilişkilerinin incelenmesi amaçlandı. Hasta grubu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediyatrik Kardiyoloji Bilim Dalı'nda "idiyopatik DKM" tanısı konulmuş yaş ortalaması yaklaşık olarak 2 olan 23 hasta seçildi. Hastalardan, 10 ml venöz kan örneği alındı ve kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak DNA bankası oluşturuldu. Sağlıklı kontrol örnekleri için daha önceden oluşturulmuş DNA bankasından 100 birey kullanıldı. Ayrıca, TNNT2 geninin genetik heterojenite göstermesi nedeni ile 50 hipertrofik kardiyomyopati (HKM) birey ikinci bir kontrol grubu olarak incelendi. Hasta ve kontrol gruplarında, TNNT2 geninin 10. ve 13. ekzonları bilinen ve yeni mutasyonlar açısından incelendi.

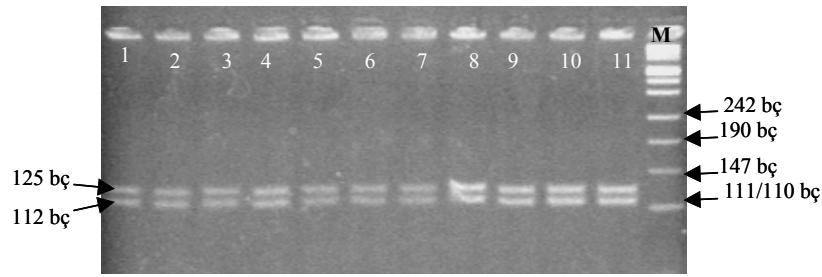
##### TNNT2 Geni 10. Ekzon Analiz Sonuçları

TNNT2 geninin 10. ekzonu PZR ile uygun şartlarda çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4-1). PZR ile çoğaltılan 237 bç'lik bölgede ilk olarak Hpa II restriksiyon enzim ile R141W mutasyonu araştırıldı. Daha sonra bu bölgede yeni mutasyon olması ihtimaline karşı tek iplik konformasyon analizi (SSCP) yapıldı.

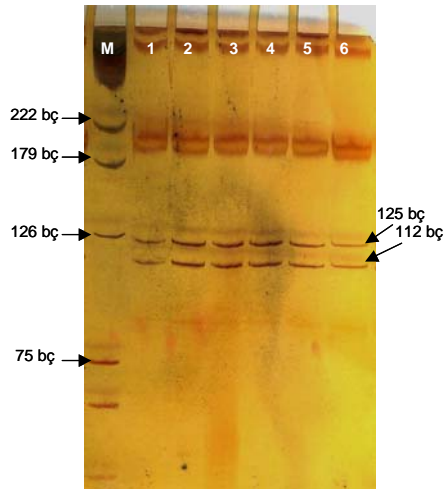


**Şekil 4-1: TNNT2 geni ekzon 10 jel elektroforez görüntüsü.** TNNT2 geni, 10. ekzon PZR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforezinin UV ile görüntülenmesi. 1-4; PZR ile çoğaltılan hasta ve kontrol örnekleri, M;  $\phi$ X174 moleküler ağırlık markeri.

Hasta ve kontrollerde, R141W mutasyonu, PZR-RFPL (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile analizi edildi. R141W mutasyonu olan bireylerin DNA'larında Hpa II restriksiyon enziminin kesim bölgesinde (5'...C – CGG...3') C/A nükleotid değişimi olmaktadır. Buna bağlı olarak mutasyonlu bireylerde enzim kesimi gerçekleşmezken, mutasyon olmayan örneklerde bu enzimin tanıma bölgesi korunmaktadır. Hpa II restriksiyon enzim kesim sonucu 125 ve 112 bç'lik uzunlukta ürün oluşmaktadır. Şekil 4-2'de Hpa II restriksiyon enzimi ile kesimleri yapılan PZR ürünlerinin, %5'lik agaroz jel elektroforezi gösterilmektedir. Ayrıca enzim kesim ürünlerinin boylarının birbirine yakın olması nedeni ile örnekler % 10'luk poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4-3). Çalışmamızda, 100 sağlıklı bireyde 23 DKM'li ve 50 HKM'li hastada R141W mutasyonu araştırıldı ancak hiçbirinde bu mutasyon tespit edilmedi

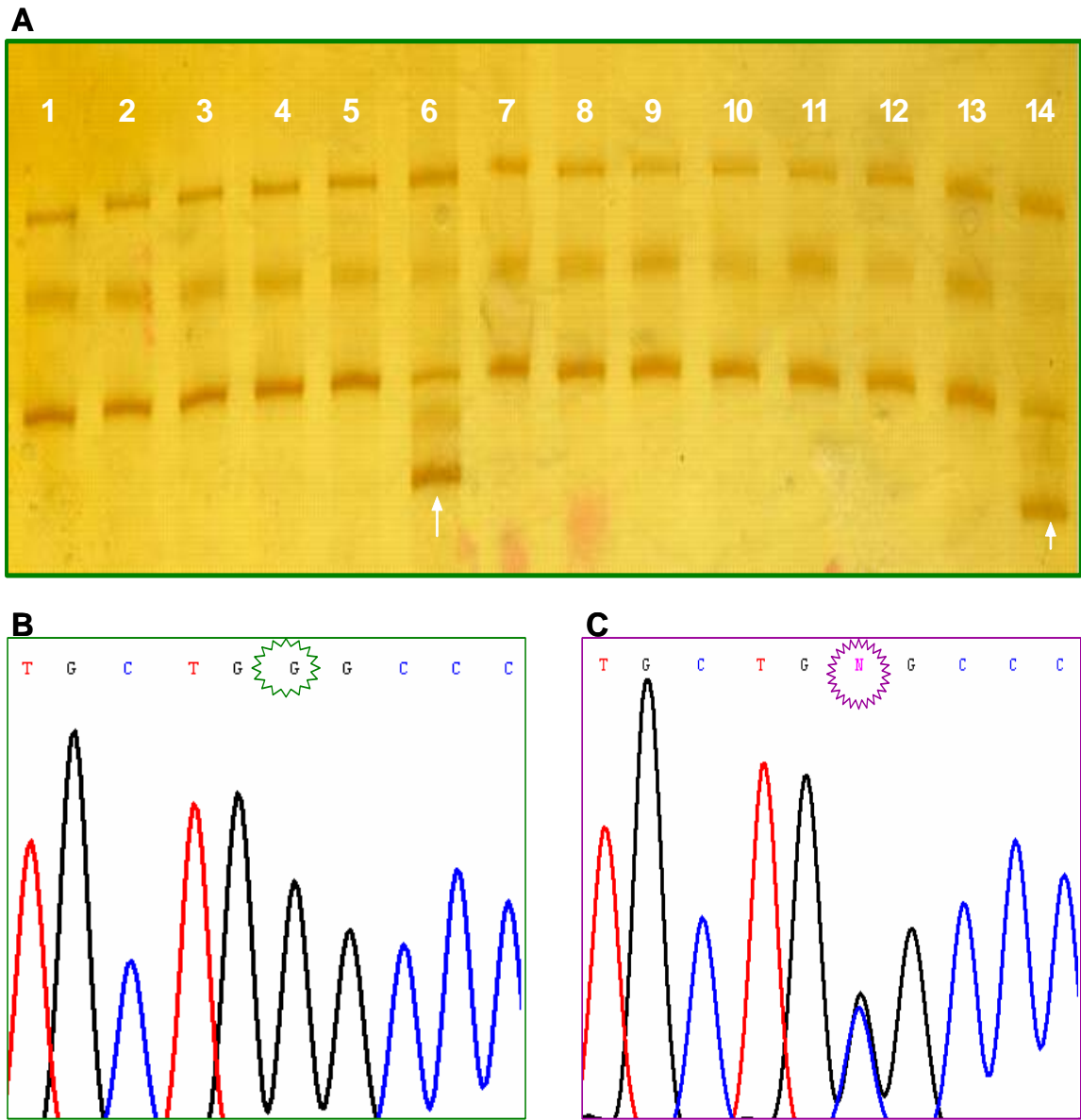


**Şekil 4-2: 10 ekzon RFPL analizi jel elektroforez görüntüsü.** PZR ile çoğaltılan TNNT2 geni 10. ekzonun RFLP analizi. Hpa II restriksiyon enzimi ile kesilerek R141W mutasyonunu taşımadığı tespit edilen örneklerin (1-11) % 5 agaroz jel elektroforezinde Puc mix 8 marker (M) ile gösterilmesi.



**Şekil 4--3: 10. ekzon RFPL poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü.** Hpa II restriksiyon enzim kesim ürünlerinin % 10'lik denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezi ardından gümüş boyama ile görüntülenmesi. 1-6; Hpa II enzimi ile kesilen örnekler, M: pGEM DNA Marker.

R141W mutasyonunu saptayabilmek için yapılan PZR ile çoğaltılan gen bölgesinde muhtemel yeni mutasyonlar SSCP yöntemi ile araştırıldı. Tek bazlık değişimlere hassas bir teknik olan SSCP analizinde PZR reaksiyonu sonucu çoğaltılan ürünlerin denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde mobilite farklılıklarına göre bantların ayrılması sağlandı. Görüntüleme için gümüş boyama yöntemi uygulandı. (Şekil 4-4A). SSCP analizi sonucunda, 23 DKM'li hastanın ikisinde, sağlıklı bireylerin üçünde ve 50'li hipertrofik kardiyomyopati hastanın birinde farklı bant paternine rastlandı. Farklı bant paterni gösteren örnekler ile sık rastlanan bant paterni gösteren örnekler tekrar PZR ile çoğaltıldı ve %2'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Çoğaltılan PZR ürünlerini saflaştırmak için PZR-Purifikasyon Kiti (Roche) kullanıldı. saflaştırılan örnekler %2'lik agaroz jelde  $\phi$ X174 Marker'ı ile yürütüldü. Örneklerin,  $\phi$ X174 Marker'a göre yoğunlukları tayin edildikten sonra, farklı bant paternine neden olan değişikliğin tanımlanması için örnekler dizileme analizine gönderildi. SSCP analizinde sık rastlanan yürüme paternine sahip örneklerin dizileme analizi şekil 4-4B'de, farklı mobilitelere sahip olanlar, şekil 4-4C'de gösterilmiştir. Buna göre farklı bant paterni oluşturan örneklerin TNNT2 geninin 1966 (ENSG00000118194) nükleotid de G  $\rightarrow$  C değişiminin olduğu ve bu bireylerin GC genotipine sahip oldukları belirlendi.

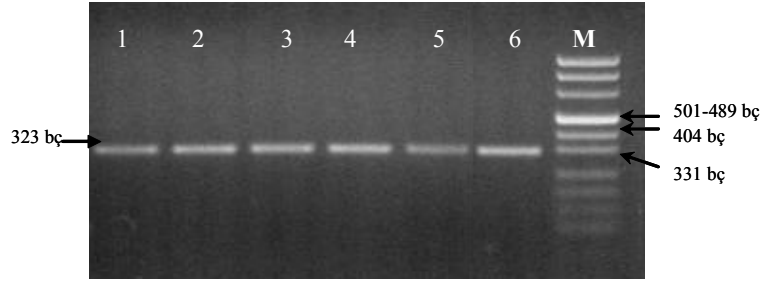


**Şekil 4-4: 10. ekzon SSCP ve dizileme analiz sonuçları.** (1-14) %12'lik poliakrilamid jel elektroforezi. mobilite farkından oluşan iki farklı bant paterni. A; TNNT2 geni 10. ekzonun PZR ile çoğaltılan örneklerin (1-14) gümüş boyama ile görüntülenmesi. B; 1-5, 7-13 nolu örneklerin dizileme analizi. C; 6 ve 14 nolu örneklerin dizileme analizi sonucu kromatogramlarının görüntülenmesi.

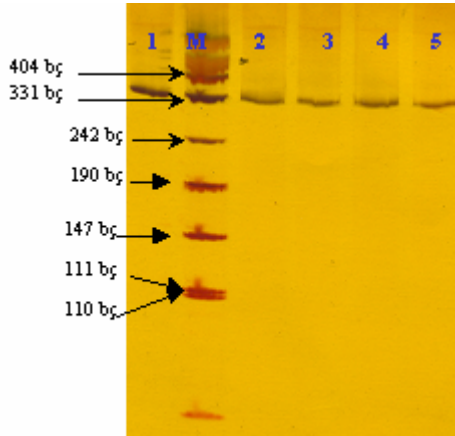
### TNNT2 Geni 13. Ekzon Analiz Sonuçları

TNNT2 geninin 13. ekzonu PZR ile uygun şartlarda çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4-5). Hasta ve kontrollerde PZR ile çoğaltılan 323 bç'lik bölgede üç nükleotidlik delesyona neden olan  $\Delta K210$  mutasyonunun taranması amacı ile ayırım gücünün fazla olmasından dolayı % 10 denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde yapıldı (Şekil 4-6). Hasta ve kontrollerde,  $\Delta K210$  mutasyonu saptanmadı.

Daha sonra bu bölgede yeni mutasyon olması ihtimaline karşı tek iplik konformasyon analizi (SSCP) yapıldı (Şekil 4-7).

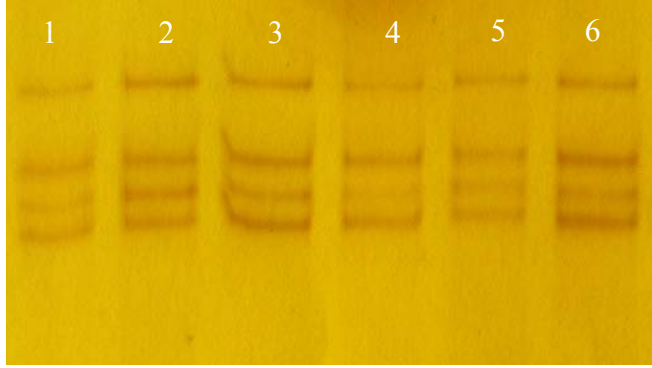


**Şekil 4-5:TNNT2 geni ekzon 13 agaroz jel elektroforz görüntüsü.** 13. ekzon PZR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforezinin UV ile görüntülenmesi. 1-6; PZR ile çoğaltılan hasta ve kontrol örnekleri, M; pUC mix 8 marker.



**şekil 4-6: TNNT2 geni ekzon 13 poliakrilamid jel görüntüsü.** 13. ekzon PZR ürünlerinin % 10'lik non denatüre poliakrilamid jel elektroforezi ardından gümüş boyama ile görüntülenmesi. 1-5; örnekler M: pUC mix 8 marker.

Tek bazlık değişimlere hassas bir teknik olan SSCP analizinde, PZR reaksiyonu sonucu çoğaltılan ürünlerin denatüre olmayan poliakrilamid jel elektroforezinde mobilite farklılıklarına göre bantların ayrılması sağlandı. Görüntüleme için de gümüş boyama yöntemi uygulandı. (Şekil 4-7). Uygulanan SSCP analizi sonucunda, 23 DKM’li hastada, 100 sağlıklı ve 50 HKM hasta farklı bir bant paternine rastlanmadı.



**şekil 4-7: TNNT2 geni ekzon 13 SSCP görüntüsü.** (1-6) örneklerin SSCP analizi, TNNT2 geni 13. ekzonun, %8’lik poliakrilamid jel elektroforezinin gümüş boyama ile görüntülenmesi. Mobilite farklılığı saptanmamıştır.

**Tablo 4-1: DKM hastaların EKG, EKO ve telekardiyografi bulguları**

Hasta NO	E/K	Yaş	Ani ölüm öyküsü	KY	Tele KM	EKG			EKO		
						Aritmi	LVH	ST-T Değişikliği	EF (%)	KF (%)	LVEDD >%117
1	1	7 aylık	-	+	+	-	+	+	17	8	+
2	1	2,5 aylık	-	+	+	-	+	+	24	10	+
3	1	1 yaş	-	+	+	-	-	-	40	15	+
4	0	6 aylık	-	-	+	-	+	-	34	13	+
5	1	14 aylık	-	-	+	-	-	-	41	20	+
6	1	2 yaş	-	-	+	-	-	+	34	16	+
7	0	3 aylık	-	+	+	-	+	-	36	13	+
8	1	2,5 yaş	-	+	+	-	+	-	30	14	
9	0	10 aylık	-	-	+	-	+	-	40	27	+
10	1	1,5 yaş	-	+	+	-	-	+	44	20	+
<b>11</b>	<b>1</b>	<b>10 yaş</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>23</b>	<b>11</b>	<b>+</b>
<b>12</b>	<b>0</b>	<b>5 aylık</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>+</b>
<b>13</b>	<b>1</b>	<b>7 aylık</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>42</b>	<b>22</b>	<b>+</b>
14	0	1,5 yaş	-	+	+	-	+		45	25	+
15	1	10 aylık	-	-	-	-	-	-	42	16	+
16	0	7 aylık	-	-	+	-	+	-	19	8	+
17	1	7 yaş	-	-	+	-	+	+	28	15	
18	0	6 aylık	-	+	+	-	-	-	48	24	-
19	0	7 aylık	-	-	-	-	-	-	41	21	+
20	1	2 yaş	-	+	+	-	-	-	44	17	+
21	0	3 yaş	-	+	+	-	+	-	42	16,5	+
22	1	8 yaş	-	+	+	-	+		29	10	+
23	0	1,5 yaş	-	+	-	-	+	-	28	13	+

E/K; cinsiyet 0; erkek, 1; kız, KY; kalp yetmezliği, KM; kardiomegali, LVH; sol ventriküler hipertrofi, ST-T değişimi, EF; ejeksiyon fraksiyonu, KF; kısalma fraksiyonu, LVEDD; sol ventrikül sonu diyastolik çap, (-); %117 az, (+); %117'den fazla.

**Tablo 4-2: EKO parametrelerinin hasta grubunda dağılımı.**

Parametreler	Ortalama	Min.	Max.
Yaş	2	2,5 aylık	10 yaş
EF	33,82	13	50
KF	16,89	8	36

## 5. TARTIŞMA

Troponin T, kas kasılması esnasında aktin ve miyozin arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde rol olan sarkomerik bir proteindir. Bu tez kapsamında, bu proteini kodlayan kardiyak TNNT2 gen mutasyonlarının vaka-kontrol çalışması ile Türk toplumunda analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Dilate kardiyomiyopati (DKM), artmış ventriküler dilatasyon, sistolik fonksiyonda bozulma ve ilerleyici refrakter kalp yetmezliği ile karakterize edilen miyokardiyal bir hastalıktır. Dilate kardiyomiyopatinin, bilinen bir nedeni yok ise ve sporadik olarak gelişmiş ise idiyopatik dilate kardiyomiyopati (İDKM) olarak adlandırılır. İdiyopatik dilate kardiyomiyopati kalp yetmezliğinin genç yaşlarda en sık nedenidir ve kalp transplantasyonu gerektiren durumların başında gelir. DKM'nin patofizyolojisinin iyi bilinmesine rağmen altında yatan genetik mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Hastalık oluşumu inflamasyon, otoimmün olaylar ve genetik yatkınlık ile gelişmekte ancak tek bir mekanizmayla açıklanamamaktadır (41).

DKM vakalarında penetransın tam olmaması nedeniyle ailelerde etkilenmiş bireylerin sayısı azdır ve yeterli genişlikte aile ağacı oluşturulamaz. Bu nedenle, pek çok çalışmada idiyopatik DKM ile ilişkili genlerin tanımlanmasında, aday gen yaklaşımı, bağlantı analizine göre daha sık kullanılmıştır. DKM'ye neden olabileceği tahmin edilen aday genlerde olası mutasyonlar SSCP (single strand conformation polymorphism) veya DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) gibi mutasyon tarama yöntemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntemlerle tanımlanan mutasyonlar, fonksiyonel analizler ve vaka kontrol çalışmaları ile analize edilip, hastalık patogenezi ile ilişkisi araştırılır.

Çeşitli çalışmalarda, mutasyon tanımlama yöntemleri kullanılarak TNNT2 geninin dilate kardiyomiyopati (DKM) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. DKM'li ailelerde yaptığı çalışmalarda Kamisago ve grubu, TNNT2 geninde  $\Delta K210$  (del210lys) delesyonunu belirlemiştir (6). Bir başka önemli çalışmada ise geniş bir ailede yaptıkları analizlerde Li ve grubu da yine aynı gende R141W (Arg471Trf) mutasyonunu tanımlamışlardır (7). Bu belirlenen iki mutasyon, genin fonksiyonunu yerine getirmesinde önemli rol oynayan 10. (R141W) ve 13. ( $\Delta K210$ ) ekzonlarında

bulunmaktadır. Proteinin fonksiyonuna göre yönelik dizayn edilmiş çalışmalar ile bu mutasyonların TNNT2 aktivitesinin de azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.

Kamisago ve grubu, TNNT2 geninde  $\Delta K210$  delesyon mutasyonunu ilk defa dilate kardiyomyopati ile iki ailede tanımlamışlardır (6). Bu çalışmada, ailesel DKM gözlenen toplam 19 aile incelenmiş ve bunlardan ikisinde  $\Delta K210$  gen mutasyonu bulunmuştur (6). Bu mutasyonu taşıyan 13 bireyin ikisi infantil, üçü 10'lu yaşlarda, dördü 20'li, geri kalanlar ise daha ileri yaşlarda hastalık tanısı almışlardır. Kamisago'nun hasta grubunda özellikle ani ölüm frekansının yüksek oluşu dikkat çekicidir. Daha sonra Hanson ve grubu, DKM'li 61 ailesel ve 53 idiyopatik bireyde, TNNT2 gen mutasyonlarının varlığını araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda, yedi üyeli bir ailede  $\Delta K210$  mutasyonu saptanmıştır (8). Hastalığın başlangıç yaşının erken olması ve şiddetinin artması Kamisago'nun çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca Hanson'un  $\Delta K210$  mutasyonunu tanımladığı bireylerde fenotipik olarak ani kalp ölümleri, atriyal fibrilasyon ve atrioventriküler blok içeren ileti sistemi hastalıkları ve kalp yetmezliği gözlemlenmektedir.

Bir başka çalışmada, Li ve grubu 72 üyeli bir ailenin 20 bireyinde DKM ile ilişkili TNNT2 geninde R141W mutasyonunu tanımlamışlardır (7). R141W mutasyonunun tanımlandığı ailede, 20 bireyin 14 tanesi hayattadır. Yaşları 1 ila 5 arasında değişen beş çocuk hayatta değildir ve 2,5 yaşında bebekte otopsi sonucu DKM tanısı doğrulanmıştır. Hayatta olan 14 aile üyesinin 12 tanesinde ekokardiyografik sonuçlar 10 yaşından önce ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada aynı aile içinde farklı fenotipler oluşturmaktadır. Kardiyak septomlar, bu mutasyonu taşıyan bazı bireylerde 20'li yaşlarda saptanmışken, bazı bireylerde 40'li yaşlara gelmelerine rağmen DKM bulgusuna rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmaların karakteristik özelliği, mutasyon verilerinin geniş ailelerin kullanıldığı çalışmalarda elde edilebilmesidir. Özellikle bu gene ait mutasyonlar bu araştırmalarda çalışılan ailelerin sadece bir ya da ikisinde belirlenebilmiş diğerlerinde rastlanmamıştır. Bu durum mutasyonun ailelere özgü kaldığına işaret etmektedir. R141W ve  $\Delta K210$  mutasyonlarının sadece birkaç ailede belirlenmesi ve populasyonda rastlanmaması ailelerdeki homojen fenotiplerle açıklanabilir.

Çeşitli grupların yaptığı çalışmalarda da bu gene ait mutasyonların saptandığı ailelerin fenotiplerinin mutasyon görülmeyen ailelerden farklı olması gendeki mutasyonların ailelere özgü olduğu savını destekler niteliktedir. Belirlenen ve belirlenmeyen ailelerdeki fenotipik farklılıkta bu durumu açıklamaktadır.

Çalışmada, ilk olarak TNNT2 geninde  $\Delta$ K210 ve R141W mutasyonlarının hasta ve kontrol gruplarında varlığı araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda idiyopatik DKM tanısı konulmuş 23 DKM'li çocuk (yaş ortalaması 2) hastada ve kontrol grubu olarak 100 sağlıklı bireyde TNNT2 geni incelenmiştir. Ayrıca, TNNT2 gen mutasyonlarının HKM'ye de yol açmasından dolayı ikinci bir kontrol grubu olarak 50 HKM hastası da araştırma kapsamına dahil edilerek incelenmiştir. Çalışmanın bu ilk bölümünde, hasta ve kontrol grubunda R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonları taranmıştır. Yapılan ilk analizler sonucunda hasta ve kontrol gruplarında R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarına rastlanmamıştır.

İncelenen hasta grubu, akraba olmayan 23 sporadik çocuk olgudan oluşmakta ve çalışmada büyük aileler yer almamaktadır. Fenotipleri itibari ile bu hastalar bir birlerine benzerlik göstermekte ve homojen bir grup niteliği taşımakta olmasına rağmen mutasyon tanımlanan ailelerdeki hastaların fenotipleri ile benzerlik göstermemektedirler. Dolayısı ile elde ettiğimiz veriler R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarının belirli fenotipten sorumlu olabileceği yönündedir. Özellikle geniş katımlı, homojen klinik gösteren aile çalışmaları ve bağlantı analizi çalışmaları ile bu mutasyonların etkileri irdelenebilir.

Kalp kasılmasının düzenlenmesinde troponin T molekülünün önemli bir rolü vardır. Kasılmada, aktin ve miyozin filamentleri arasındaki etkileşimin olabilmesi için öncelikle aktin filamentini oluşturan troponin kompleksi bileşenleri ile tropomiyozin arasındaki etkileşimin gerçekleşmesi gerekmektedir. Kardiyak troponin T'nin, alfa-tropomiyozin ve troponin C ile bağlandığı bölgeler bu açıdan önemli bölgedir. Bahsi geçen bağlanma bölgelerini kodlayan ekzonlar oldukları için, TNNT2 genine ait 10. ve 13. ekzonlarının fonksiyonel bir protein kodlaması açısından önemli olacağını öne sürmek mümkündür. Elimizdeki olguların fenotiplerine, R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarından farklı mutasyonların neden olma ihtimali bulunmaktadır. Bu ihtimal göz önünde bulundurularak 10. ve 13. ekzonlar PZR-SSCP yöntemi ile incelenmiştir. Seçilen SSCP yöntemi ile kullanılan fragmanın stabilitesine bağlı olarak %60-80

doğruluk oranında mutasyon taraması yapmak mümkün olabilmektedir (91). SSCP açık bir sistem olduğu için yöntemi etkileyen pek çok fizik, çevre ve ortam (sıcaklık, voltaj, jel konsantrasyonu, solüsyon pH değerleri vb.) faktörü bulunmaktadır (91). Bu faktörlerin tümünün laboratuvar şartlarında sabitlenmesi ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak bunların tümünde tam bir kontrol sağlanması durumunda bile yönteme bağlı hata payının yine de çalışmayı etkileyebileceği literatürde de tartışılmaktadır.

Oluşturulan hasta ve kontrol gruplarında, TNNT2 geninin 13. ekzonu SSCP analizi ile incelenmiş ve bir farklılık saptanmamıştır. TNNT2 geninin 10. ekzonunun SSCP analizi sonucunda ise, incelenen idiyopatik DKM'li hasta grubu içinden üç olguda ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerde ve HKM'li kontrol grubunun bir bireyinde farklı bir bant paterni saptandı. Bu bant paterninin tanımlanması için dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonucunda, bu bant paterninin TNNT2 geninin 10. intronik bölgesinde G>C transversiyonu sonucu yeni bir varyant (IVS10 +57 G>C) olduğu tespit edildi. Farklı bant paternine sahip olan örneklerde bu baz değişimi heterozigot (GC) iken normal paterne sahip olan örneklerde homozigot (GG) genotipine sahip olduğu belirlendi.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediyatrik Kardiyoloji Bilim Dalı'nda takipli edilen 23 hastanın üçünde tespit edilen bir baz değişimi, TNNT2 geninin kodlanmayan bölgesinde meydana gelmektedir. Ayrıca genin *splicing* bölgesinde de bulunmamaktadır. Bu GC değişiminin sıklığı hastalarda %13 (n=23) kontrol grubunda ise %2 (n=100) olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistik değerlendirmeler sonucunda hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunduğu gösterilmiştir (p= 0.003). Elde edilen bu bulgular, saptadığımız IVS10 +57 G>C değişiminin DKM fenotipi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Tespit edilen bu değişiminin sağlıklı kontrol grubunda da saptanmasından dolayı bu değişim polimorfizm olarak da tanımlanabilir. Klinik septomların şiddetinde bir farklılık oluşturabileceği düşünülerek bu polimorfizmin hasta grubumuzdaki klinik bulgularla bağlantısı incelenmiştir. Bu değişimi GC heterozigot olarak taşıyan bir hastada aritmi gözlenmektedir. Diğer hiçbir hastada aritmi yoktur. Bu hastada kalp yetmezliği bulunmamaktadır. Ayrıca, sol ventriküler hipertrofi ve kardiyomegali bulunmaktadır. Diğer iki hastanın birinde kalp yetmezliği, sol ventrikül hipertrofisi

bulunmazken kardiyomegalisi olduğu gözlenmiştir. Diğer bir hastada ise, kardiyomegali ve sol ventriküler hipertrofi gözlenirken kalp yetmezliği gözlenmemiştir. Her ailede farklı mutasyonların olabileceği göz önünde bulundurularak hasta ailelerinin bu varyant açısından incelenmesi gerekmektedir.

Çalışmamız idiyopatik DKM'nin etyolojik nedenlerinin incelenmesi açısından az sayıda hasta içermektedir. TNNT2 gen mutasyonları ailesel kalıtılan DKM'ye neden olduğu bildirilmiştir. Olgularımızda ise hastalık ailesel olarak gelişmemiştir. Türk toplumu için ailesel DKM'nin görülme sıklığı üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, hasta grubundaki olgu sayısının azlığı ve olgularda ailesel dilate kardiyomiyopati olmaması sebebiyle yeterince veriye ulaşılamamış olabilir. Diğer yandan, TNNT2 gen mutasyonlarının, penetrans düşüklüğü göstermesi sebebiyle mutasyon taşıyan tüm aile bireylerinin bulgu vermiyor olabileceği ihtimalini de göz ardı etmemek gerekmektedir.

İdiyopatik DKM'nin genetik nedenlerinin araştırılmasında mutasyon bulma olasılığının artırılması için doğru gen ve yöntem seçilmelidir. Gen seçiminde hastalığın fenotipik bulguları göz önünde tutulmalıdır. Özellikle, mitokondriyal genlerin, distrofin geninin, troponin kompleksindeki diğer aday genlerin infantil ve sporadik DKM'nin patogenezinde rol aldığına ilişkin çalışmalar vardır.

Ailesel DKM'lerin %16'sında resesif kalıtım gözleendiği rapor edilmiştir. Fakat resesif kalıtım modeli için fazla bir gen tanımlanmamıştır. Murphy ve grubu (2000) resesif idiyopatik dilate kardiyomiyopati için troponin I (TNNI3) genini tanımlamışlardır (68). TNNI3 gen mutasyonu tanımlanan probandın ebeveynlerinin ve bir kız kardeşinin mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı ve elektrokardiogramlarında hiçbir klinik bulgu göstermediği gözlenmiştir. Fakat probandın diğer kız kardeşinde aynı mutasyonun homozigot olarak taşıdığı ve klinik olarak DKM bulgularına sahip olduğu gözlenmiştir.

Ruppert ve grubu (2004) ailesel olmayan kardiyomiyopati hastalarının mitokondriyal DNA'(mtDNA)larında farklılık gösterip göstermediği ve mutasyonların mitokondriyal genomda nasıl dağılım gösterdiğini incelemiştir. Bu grup, mtDNA'da toplam 458 dizi değişikliği tanımlamıştır. DKM'li hastalarda, normallere göre birçok yeni dizi değişimleri saptanmıştır. DKM'li hastalarda kontrollere göre, NADH dehidrogenaz alt ünitelerini kodlayan genlerde belirlenen mutasyonların sayısında

önemli artış ( $P<0,05$ ) belirlenmiştir. Sonuç olarak, DKM’li hastaların mtDNA’larında meydana gelen mutasyonların kontrollerin mtDNA’larında meydana gelen mutasyonlardan daha sık olarak meydana geldiği gösterilmiştir (92). Bulunan mutasyonların bazıları DKM’nin patogenezinde etkin rol oynayabilir. Çünkü bu mutasyonlar evrimsel olarak korunmuş aminoasitlerde değişimlere neden olmaktadır ve değişen aminoasitler ise protein alt ünitelerinin fonksiyonlarında değişimlere neden olabilmektedir. Bu mutasyonların solunum fonksiyonunda rol alan enzim alt ünitelerinde de değişime neden olabilmesi sebebiyle mitokondriyal değişikliklerin DKM’nin patogenezi ile ilişkisi tartışılmaktadır. (92).

Shimizu ve grubu tarafından DKM li erkek hastalarda distrofin mutasyonlarının prevalansı %4,4 (3/68) olduğu bildirilmiştir. Sporadik vakalarda da distrofin mutasyonları saptanmıştır (93).

Çocuklarda DKM’nin, infeksiyöz miyokardit, perinatal asfiksi, doğumsal metabolizma bozuklukları, nöromusküler hastalıklar, koroner arter anomalileri ve DKM’nin kalıtsallığı gibi birçok etyolojik nedeni olabilir. Çocukluk dönemindeki DKM, genellikle daha ciddi bir prognoza sahiptir. Buna dayanarak yeni doğan ve genç fare modelleri oluşturularak kardiyak dilatasyon ve kalp yetmezliğine yol açan nedenler birçok çalışma grubu tarafından araştırılmıştır. Hall ve grubu tarafından oluşturulan hayvan modellerinde koneksin 43 seviyesinin azalması ile hastalığın septomlarının erken başladığı ve bozulmuş kardiyak fonksiyondan önce kasılma defektlerinin oluştuğunu göstermişlerdir (94). Aynı çalışmada, koneksin 43 seviyesinin azalması ile kalp yetmezliğine yol açan kasılma defektinin başlangıç zamanı arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (94). Farklı bir çalışmada, trombomodulin aşırı ekspresyonunun şiddetli DKM geliştirdiği ve erken doğum sonrası dönemde genellikle ölüme yol açtığını bildirmişlerdir (95). Bu durumda çocukluk çağındaki DKM’li hastalarda koneksin 43 ve trombomodulin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların araştırılması hastalığın etiyolojinin aydınlatılmasında daha açıklayıcı olabilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ile literatürdeki bilgiler karşılaştırıldığında, ortaya çıkan tablo mtDNA, distrofin, troponin I, troponin C, koneksin 43 ve trombomodulin genleri mutasyonlar yönünden ayrıntılı araştırılması gerektiğine işaret etmektedir. Buna yönelik yapılacak diğer çalışmalar DKM fenotipine etki eden mekanizmaları belirleme yönünde yeni bulgular verebilir.

Çalışmamızda, DKM'li çocuk hastalarda TNNT2 gen mutasyonları araştırıldı. TNNT2 geninin 10. intronik bölgesinde G>C tranversiyonu sonucu yeni bir varyant (IVS1057G>C) bulundu. Bu varyantın hastalarda sıklığı %13 (n=23), sağlıklı kontrol grubunda %2 (n=100) olarak bulundu. İstatistiksel olarak hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark (P=0,003) olduğu gözlemlendi. Bu varyantı taşıyan hasta ve sağlıklı olduğu düşünülen kişiler tekrar kardiyolojik muayeneye tabi tutulduktan sonra varyantın klinik etkisi aydınlatılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Richardson P, Mckenna W, Bristow M, Maisch B. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;**93**:841-842
2. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population- based study of Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989; **80**:564–572.
3. Arola A, Jokinen E, Ruuskanen O, Saraste M, Pesonen E, Kuusela AL ve ark.. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathies in children and adolescents. A nationwide study in Finland *Am J Epidemiol* 1997;**146**:385-393
4. Grunig E., Tasman J.A., Kucherer H., Franz W., Kubler W. ve Katus H.A., Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**:186-194.
5. Osterziel KJ, Perrot A. Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes. *Eur Heart J*. 2005;**26**:751-4.
6. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B ve ark. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;**343**:1688 –96.
7. Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzalez O, Tapscott T, Karibe A, Durand JB ve ark.. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001;**104**:2188 –93.
8. Hanson EL, Jakobs PM, Keegan H, Coates K, Bousman S, Diemel NH ve ark.. Cardiac troponin T lysine 210 deletion in a family with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2002 ;**8**:28-32.
9. Hayr nnisa  ve ark., *Tibbi Fizyoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi; 2001.
10. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanism of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002;**82**:945-980.
11. Sodeman TM, içinde  m rl  K. editor, *Sodeman's Fizyopatoloji*. T rkiye Klinikleri Yayınevi:1991. pp 295-303

12. Parmacek MS, Solaro RJ. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis.* 2004;**47**:159-76.
13. Perry SV. Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 1998;**19**:575-602.
14. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000; **80**:853- 924.
15. Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1987;**16**:535-559.
16. Flicker PF, Phillips GN, Cohen CJ. Troponin and its interactions with tropomyosin: An electron microscope study. *J Mol Biol* 1982;**162**:495-501.
17. Cooper T.A., and Ordahl C.P., A single troponin T gene is governed by two different regulatory programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 1984; **226**:979-982
18. Toyota N, Shimada Y, Bader D. Molecular cloning and expression of chicken cardiac troponin C. *Circ Res* 1989;**65**:1241-1246.
19. Murphy AM, Jones L II, Sims HF, Strauss AW. Molecular cloning of rat cardiac troponin I and analysis of troponin I isoform expression in developing rat heart. *Biochemistry.* 1991;**30**:707-712.
20. Anderson PAW, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD. Troponin T isoform expression in humans: a comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res.* 1991;**69**:1226-1233.
21. Townsend PJ, Barton PJ, Yacoub MH, Farza H. Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: Expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**:2223-2236.
22. Mesnard L, Logeart D, Taviaux S, Diriong S, Mercadier JJ, Samson F. Human cardiac troponin T: cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart. *Circ Res.* 1995;**76**:687-92.
23. Gomes AV, Venkatraman G, Davis JP, Tikunova SB, Engel P, Solaro RJ ve ark.. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca(2+) sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *J Biol Chem.* 2004;**279**:49579-87

24. Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM ve ark.. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res*. 1995;**76**:681-6.
25. Akella AB, Ding XL, Cheng R, Gulati J. Diminished Ca<sup>2+</sup> sensitivity of skinned cardiac muscle contractility coincident with troponin T-band shifts in the diabetic rat. *Circ Res*1995;**76**:600-606.
26. Gulati J. Akella A.B. Nikolic S.D. Starc V. ve Siri F. Shifts in contractile regulatory protein subunits troponin T and troponin I in cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**202**:384-390.
27. Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, Walker C, Fishman M, Stainier DY: Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* 2002;**31**: 106–110.
28. Farah CS, Miyamoto CA, Ramos CHI., da Silva ACR., Quaggio RB, Fujimori K ve ark. Structural and regulatory functions of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J Biol Chem* 1994; **269**:5230-5240.
29. Perry SV. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem* 1999;**190**:9-32
30. Perry SV. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 2001;**22**:5-49
31. Hinkle A, Goranson A, Butters CA, Tobacman LS. Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation: a deletional study of cardiac troponin T. *J Biol Chem* 1999; **274**:7157-7164
32. Townsend PJ, Farza H, MacGeoch C, Spurr NK, Wade R, Gahlmann R, ve ark. Human cardiac troponin T: identification of fetal isoforms and assignment of the TNNT2 locus to chromosome 1q. *Genomics* 1994;**21**:311-6.
33. Farza H, Townsend PJ, Carrier L, Barton PJ, Mesnard L, Bahrend E ve ark. Genomic organisation, alternative splicing and polymorphisms of the human cardiac troponin T gene. *J Mol Cell Cardiol* 1998 ;**30**:1247-53.
34. Watkins H., McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R. O'Donoghue A, ve ark. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl.J. Me.* 1995;**332**:1058–1064.
35. Peddy SB, Vricella LA, Crosson JE, Oswald GL, Cohn RD, Cameron DE ve ark.. Infantile restrictive cardiomyopathy resulting from a mutation in the cardiac troponin T gene. *Pediatrics*. 2006 M;**117**:1830-3.

36. Morimoto S, Lu QW, Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Ohta M, ve ark. Ca<sup>2+</sup>- desensitizing effect of a deletion mutation deltaK210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *PNAS* 2002;**99**:913–918.
37. Robinson P, Mirza M, Knott A, Abdulrazzak H, Willott R, Marston S ve ark.. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 2002;**277**:40710-6.
38. Redwood C Lu QW, Morimoto S, Harada K, Du CK, Takahashi-Yanaga F, Miwa YT ve ark. Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated ardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca<sup>2+</sup> desensitization. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:1421-7.
39. Caforio A, Stewart J, McKenna W. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *British Medical Journal.* 1990;**300**:890-8
40. Schowengerdt K, Towbin J. Genetic basic of inherited cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 1981; **36**:35-48.
41. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1994;**331**:1564-75
42. Franz WM., Müller OJ, Katus HA, Cardiomyopathies:from genetics to the prospect of treatment. *The Lancet* 2001;**358**:1627-37.
43. Seidman JG, Seidman C, The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;**104**:557–567.
44. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, Schwartz K, Charron P, Rocco C, ve ark. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. *Eur Heart J* 1999; **20**: 93– 102.
45. Krajinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, Vatta M, Severini GM, Milasini J, ve ark. Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. *Am JHum Genet* 1995;**57**: 846–852.
46. Bowles KR, Gajarski R, Porter P, Goytia V, Bachinski L, Roberts R, ve ark. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21–23. *J Clin Invest* 1995; **98**:1355–1360

47. Schonberger J, Levy H, Grunig E, Sangwatanaroj S, Fatkin D, MacRae C ve ark..Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndromethat maps to 6q23-24. *Circulation*. 2000;101:1812-8.
48. Sylvius N, Tesson F, Gayet C, Charron P, Benaiche A, Peuchmaurd M, ve ark. A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16. *Am J Hum Genet* 2001;**68**:241–246
49. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet* 1997;**61**:909–917
50. Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J Clin Invest* 1996;**97**:528-32.
51. Jung M, Poepping I, Perrot A, Ellmer AE, Wienker TF, Dietz R, ve ark. Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy de.nes a novel locus on chromosome 2q14-q22.*AmJ Hum Genet* 1999;**65**:1068–1077.
52. Schönberger J, Kühler L, Martins E, Lindner TH, Cardoso JS, Zimmer M. A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1. *Hum Genet* 2005;**118**: 451–457
53. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998;**280**:750 – 2.
54. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA ve ark. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;100:461-4.
55. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L ve ark. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2000;106:655-62.
56. Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, Gille C, Froemmel C, Hummel M ve ark.. Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**298**:116 –20.
57. Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:723–32.

58. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S ve ark.. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002;**14**:14.
59. Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002;**105**:431–7.
60. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M ve ark. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 1999;**341**:1715–24.
61. 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**:943–55.
62. Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG ve ark. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* 2003;**80**:207–15.
63. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U ve ark. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* 2003;**299**:1410–3.
64. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z ve ark. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular noncompaction. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:2014–27.
65. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F ve ark. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* 2004;**36**:382–7.
66. Carniel E, Taylor MR, Fain P, et al. Molecular screening of  $\alpha$ -myosin heavy chain in patients with dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;**108**:IV263.
67. Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, Bahl A, Redwood C, Watkin H, ve ark. Severe disease expression of cardiac troponinC and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;**44**:2033–2040.

68. Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2004;**363**:371–2.
69. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A ve ark. Brief report: Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1993;**329**:921–5.
70. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS ve ark. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993;**87**:1854–65.
71. D’adamo P, Fassonel L, Gedeon A, Janssen E, Bione S, Bolhuis PA, ve ark.. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet* 1997;**61**: 862–867.
72. Silvestri G, Santorelli FM, Shanske S, Whitley CB, Schimmenti LA, Smith SA ve ark. A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 1994;**3**:37-43.
73. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Di Lenarda A, Miodini S, ve ark. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. *J Am Coll Cardiol* 1999;**34**:181–90.
74. Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmaurd M, Bouchier C ve ark. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a European population of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2000;**21**:1872– 6.
75. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;**45**:969-81.
76. Muntoni F, Di Lenarda A, Porcu M, Sinagra G, Mateddu A, Marrosu G, ve ark. Dystrophin gene abnormalities in two patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart* 1997;**78**:608 –12.
77. Seliem MA, Mansara KB, Palileo M, Ye X, Zhang Z, Benson DW. Evidence for autosomal recessive inheritance of infantile dilated cardiomyopathy: studies from the Eastern Province of Saudi Arabia. *Pediatr Res* 2000;**48**:770 –5.
78. Li YY, Maisch B, Rose ML, Hengstenberg C. Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1997;**29**:2699 – 709.

79. Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L, Somer H. Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 1992;**340**:1319–20.
80. Stefanelli CB, Rosenthal A, Borisov AB, Ensing GJ, Russell MW. Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity. *Mol Genet Metab*. 2004;**83**:188-96.
81. Schwartz K, Mercadier J.-J. Cardiac troponin T and familial hypertrophic cardiomyopathy: an energetic aVair, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 652–654.
82. Fujino N, Shimizu M, Ino H, Okeie K, Yamaguchi M, Yasuda T, ve ark. Cardiac troponin T Arg92Trp mutation and progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol*. 2001;**24**:397-402.
83. Fujino N, Shimizu M, Ino H, Yamaguchi M, Yasuda T, Nagata M ve ark. A novel mutation Lys273Glu in the cardiac troponin T gene shows high degree of penetrance and transition from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2002;**89**:29-33.
84. Mirza M, Marston S, Willott R, Ashley C, Mogensen J, McKenna W, ve ark. Dilated cardiomyopathy mutations in three thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype. *J Biol Chem* 2005;**280**:28498-506.
85. Venkatraman G, Gomes AV, Kerrick WG, Potter JD. Characterization of troponin T dilated cardiomyopathy mutations in the fetal troponin isoform. *J Biol Chem*. 2005;**280**:17584-92.
86. Spirito P, Maron BJ, Bonow RO, Epstein SE. Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1987;**60**:123-9.
87. Regitz-Zagrosek V, Erdmann J, Wellnhofer E, Raible J, Fleck E. Novel mutation in the alpha-tropomyosin gene and transition from hypertrophic to hypocontractile dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2000;**102**:112-6.
88. Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, ve ark. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with “typical” hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**309**:391– 8.
89. Schönberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2001;**69**:249-60.

90. Venkatraman G., Harada K., Gomes A.V., Kerrick W.G., Potter J.D., Different functional properties of troponin T mutants that cause dilated cardiomyopathy, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41670–41676.
91. Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat.* 2002 ;**19**:334-42
92. Ruppert V, Nolte D, Aschenbrenner T, Pankuweit S, Funck R, Maisch B. Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;**318**:535-43.
93. Shimizu M, Ino H, Yasuda T, Fujino N, Uchiyama K, Mabuchi T ve ark. Gene mutations in adult Japanese patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 2005;**69**:150-3.
94. Hall DG, Morley GE, Vaidya D, Ard M, Kimball TR, Witt SA ve ark. Early onset heart failure in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Res.* 2000;**48**:36-42.
95. Sussman MA, Welch S, Cambon N, Klevitsky R, Hewett TE, Price R, ve ark. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to dilated cardiomyopathy in juvenile mice. *J Clin Invest* 1998;**101**:51–61

## 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 dilate kardiyomyopati 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,...)

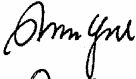
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

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

**ETİK KURUL KARARI****İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

**Toplantı Tarihi:** 08.09.2004  
**Toplantı Yeri :** Behçet Kütüphanesi Pembe Salonu  
**Toplantı Sayısı:** 08  
**Prot.No.Sayısı :**

Sorumlu araştırmacılığını Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nihan Erginel Ünaltuna'nın,üstlendiği Biyolog Filiz Güçlü'nün yürüteceği "Troponin T gen mutasyonlarının Türk populasyonundaki dilate kardiyomyopati hastalarda taranması" 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.Ahmet **GÜL** 


Prof.Dr.Mübeccel **DEMİRKOL** 

Prof.Dr.Berrin **UMMAN** 


Prof.Dr.Cahide **GÖKKUŞU**

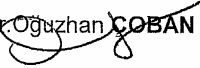
Prof.Dr.Koray **ACARLI**

Prof.Dr.Selim **BADUR**

Prof.Dr.Aykan **CANBERK** 

Prof.Dr.Pınar **SAİP**

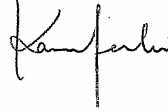
Prof.Dr.Beyhan **ÖMER** 

Prof.Dr.Oğuzhan **COBAN** 

Prof.Dr.Veli **UYSAL**

Prof.Dr.Kamil **PEMBECİ**

Prof.Dr.Nuran **YILDIRIM**



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Filiz	<b>Soyadı</b>	Güçlü
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	28.04.1979
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	25723325414
<b>Email</b>	filizguclu@yahoo.com	<b>Tel</b>	

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Programı	2006
<b>Lisans</b>	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2001
<b>Lise</b>	Erenköy Kız Lisesi	1996

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü	2006
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	zayıf	orta	60	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	57.829	57.454	57.398
<b>(Diğer Puanı)</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	Çok iyi

**Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

Sözlü Bildiri:

Metabolik sendromlu bireylerde Apo E polimorfizminin risk faktörü olarak araştırılması. (SB-016)

Güçlü XXI. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, 26-29 Kasım 2005, Antalya.

Poster Bildiri

1) Embriyonik Dokularda N1 Ekspresyonu ve Kalp Gelişiminde Etkisi,

M.Poda, F. Güçlü, N. Kiremit Korkut, N. Erginel – Ünaltuna

XX. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, 27-30 Kasım 2004, Antalya

2) Troponin T Gen Mutasyonlarının İdiyopatik Dilate Kardiyomyopati Hastalarda Araştırılması (P85)

Güçlü F, Demir T, Öztunç F, Erginel-Ünaltuna N.

VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 17-20 Mayıs 2006, Kayseri.