

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ MEF2A GEN
MUTASYONLARININ TÜRK TOPLUMUNDAKİ
KORONER ARTER HASTALARINDA TARANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferhan PAYDAK

HAZIRLAYAN
Biyolog Nilay ERSÖZ
043211002001

KONYA-2008

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. Koroner Arter.....	2
2.2. Koroner Arterlerin Anatomisi.....	2
2.2.1. Sağ koroner arter (RCA)	2
2.2.2.Sol koroner arter (LCA)	2
2.2.2.1. Sol ön inen arter (LAD)	3
2.2.2.2. Sirkumfleks arter (Cx)	3
2.3. Koroner Arterlerin Histolojisi.....	4
2.3.1. İntima tabakası.....	4
2.3.2. Media tabakası.....	4
2.3.3. Adventisya tabakası.....	4
2.4. Koroner Arter Hastalığı ve Oluşum Mekanizması.....	5
2.5. Koroner Arter Hastalığının Risk Faktörleri.....	8
2.5.1. Değiştirilmesi mümkün olan risk faktörleri.....	8
2.5.2. Değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri.....	10
2.6. MEF2 Transkripsiyon Faktör Gen Ailesi.....	11
2.6.1. MEF2A proteininin moleküler yapısı.....	12
2.6.2. MEF2A geni.....	14
2.6.3. MEF2A proteininin fonksiyonu.....	14
2.7. MEF2 Faktörlerinin Transkripsiyonel Aktivasyonu.....	16
3. MATERYAL METOD.....	20
3.1. Grupların oluşturulması ve kan örneklerinin toplanması.....	20
3.2. DNA İzolasyonu, PZR, SSCP ve Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli Olan Gereçler.....	20
3.2.1. DNA izolasyonu, PZR, SSCP ve agaroz jel elektroforezi için gerekli olan kimyasal maddeler.....	20
3.3. DNA İzolasyonu.....	21
3.3.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması.....	21
3.3.2. DNA'nın elde edilmesi	22
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	23
3.4.1. Primer tasarımı ve kullanılan primerler.....	23

3.4.2. Primerlere göre PZR karışımının hazırlanması ve PZR reaksiyon koşulları.....	24
3.4.2.1. PZR karışımının hazırlanması.....	24
3.4.2.2. PZR koşulları.....	25
3.5. Elektroforez.....	25
3.5.1. Agaroz jel elektroforezi.....	25
3.5.2. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	25
3.6. SSCP yöntemi.....	26
3.6.1. SSCP yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	27
3.6.2. SSCP'nin yapılışı.....	29
3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Çalışma Gruplarının Klinik Özellikleri.....	31
4.2. MEF2A Gençokuyapılığının Belirlenmesi.....	32
4.3. MEF2A gençokuyapılığına sahip fertlerin klinik özellikleri.....	36
5. TARTIŞMA.....	38
6. ÖZET.....	42
7. YABANCI DİLDE ÖZET	44
8. KAYNAKLAR.....	46
9. ÖZGEÇMİŞ.....	51
10. TEŞEKKÜR.....	52

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kalbin arterleri.....	3
Şekil 2.2. Koroner arterlerin yapısı.....	5
Şekil 2.3. Temel ateroskleroz süreci.....	7
Şekil 2.4. 33 kDA'luk MEF2A-DNA kompleksi	12
Şekil 2.5. MEF2A proteininin şematik yapısı	13
Şekil 2.6. MEF2A ekzonun kodlanan bölgesinin aminoasit dizisi.....	15
Şekil 2.7 Miyojenik bHLH proteinleri ve MEF2 aracılığıyla kas hücrelerindeki genlerin aktivasyon mekanizmaları..	17
Şekil 2.8. MEF2A proteinindeki p38 için fosforilasyon sitelerini içeren aminoasit dizileri.	18
Şekil 2.9. ERK5 aracılığıyla MEF2A'nın aktivasyonu.	18
Şekil 2.10. MEF'deki sinyalizasyon yolları.....	19
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol bireylerinin tek zincirli DNA'larına ait göç profilleri.....	32
Şekil 4.2. Heterozigot Pro279Leu mutasyonuna sahip bireyin DNA dizi analizi grafiği.	32
Şekil 4.3. Farklı CAG tekrarlarına sahip hasta ve kontrol bireyleri tek zincirli DNA'larına ait poliakrilamid jel görüntüleri.....	34
Şekil 4.4. 11 CAG tekrarına ve 1767 G/G genotipli hasta ve kontrol bireylerine ait poliakrilamid jel görüntüleri.	34
Şekil 4.5. 1767 G/G genotipine sahip hasta ve kontrol bireylerinin DNA dizi analizi grafiği.	35
Şekil 4.6. 11 CAG tekrarı ve 1767 G/T genotipine sahip bireylerin poliakrilamid jel görüntüleri.	35
Şekil 4.7. 1767 G/T genotipli bireylere ait DNA dizi analizi grafiği.	35
Şekil 4.8. 9 ve 11 CAG tekrarlarına ve 1767 T/T genotipli bireylerin tek zincirli DNA'larının göç profilleri.	35
Şekil 4.9. 1767 T/T genotipli bireylere ait DNA dizi analizi grafiği.	36

TABLolar

Tablo 3.1. MEF2A gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PZR ürün büyüklükleri.....	24
Tablo 4.1. Koroner arter hastaları ve kontrol gruplarının klinik özellikleri.....	31
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda Pro279Leu görülme sıklığı.....	32
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol bireylerinde CAG (Glutamin, Q) _n tekrarlarının dağılımı.....	33
Tablo 4.4. Hasta ve kontrol bireylerinde G451G (1767 G→T) değişikliğinin görülme sıklığı.....	34
Tablo 4.5. MEF2A gençokuyapılılığı olan fertlerin klinik özellikleri.....	36
Tablo 4.6. MEF2A gençokuyapılılığı olan fertlerin klinik özellikleri.....	37

1. GİRİŞ

Organların canlılığını koruyabilmeleri ve görevlerini yapabilmeleri için besin maddelerine ve oksijene gereksinimleri vardır. Bunlar organlara atardamar (arter) yolu ile taşınan kan ile ulaştırılır. Kanın arterlere pompalanmasını sağlayan kalbin her organ gibi beslenmesi gerekir. Kalp kasılmasını sağlayan miyokard adı verilen kas tabakasının beslenmesini, dolayısıyla kalbin beslenmesini sağlayan damarlara koroner damar (koroner arter) adı verilir. Koroner arterlerde olabilecek hastalıklar doğrudan kalbin çalışmasını ve verimini etkileyeceğinden dolayı, bu damarlar hayati önem taşımaktadır. Bu damarlarda görülen en önemli hastalık koroner arter hastalığı (KAH)'dır. Koroner arter hastalığı genellikle ateroskleroz sonucu gelişmektedir. Koroner damarlarda başta kolesterol olmak üzere lipidler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddelerin birikmesi plak oluşumuna sebep olur. Oluşan plaklar zamanla damar içinde büyüyerek normalde esnek olan damarların esnekliğini azaltır ve damarın tıkanmasına yol açar. Damarın tıkanması sonucu oluşan hastalığa ateroskleroz denir. Ateroskleroz veya başka bir nedenle miyokardın ihtiyacı olan oksijenin yeterince karşılanamaması sonucu oluşan iskemi (dokunun kanlanamaması), koroner arter hastalığına sebep olur.

Koroner arter hastalığı, genetik faktörler ile çevresel faktörlerin birbirlerini etkilemesi sonucu oluşan multifaktöriyel (çok yönlü) bir hastalıktır (Vassalli ve Winkelmann 2004). Koroner arter hastalığı için belirlenen hipertansiyon, obezite, hiperkolesterolemi, diyabet, sigara, fiziksel inaktivite ve pozitif aile öyküsü gibi risk faktörlerinin yanı sıra, son zamanlarda aday genlerdeki DNA polimorfizmlerinin (gen çökyapılılık) neden olduğu genetik yatkınlık da önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Gonzales ve ark 2005). Miyosite spesifik enhanser faktör 2 A (MEF2A), koroner arter hastalığı ve onun önemli komplikasyonu olan miyokard infarktüsüne (kalp krizi, Mİ) sebep olan ilk ve tek gen dir (Wang 2005). Koroner arter endotelinde yüksek oranda ifade edilen MEF2A proteini, kasa spesifik ve büyüme faktörlerini teşvik eden genlerin promotor (özendirici) bölgelerinde bulunan adenin ve timin nükleotitlerinden zengin hedef DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu çalışma ile koroner arter hastaları ve miyokard infarktüsü geçiren bireylerde, MEF2A gen mutasyonlarının görülme sıklığı, kontrol bireyleri ile karşılaştırılacaktır. Türk toplumundaki MEF2A gençökyapılılığı (polimorfizm) ile koroner arter hastalığı arasında ilişkinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Koroner Arter

Organların çalışmaları için gerekli olan kanı pompalamakla görevli olan kalp, bu görevini yapabilmek için dakikada ortalama 70 kere kasılır ve her defasında ortalama 70 ml kanı organlara gönderir. Organların canlılığını koruyabilmeleri ve görevlerini yapabilmeleri için besin maddeleri ve oksijene gereksinimleri vardır. Bunlar organlara atardamar (arter) yolu ile taşınan kan ile ulaştırılır. Kanın arterlere pompalanmasını sağlayan kalbin, ihtiyaç duyulan seviyede çalışabilmesi için kanlanması yani beslenmesi gerekir (Hurst 1990). Kalp kasılmasını sağlayan miyokard adı verilen kas tabakasının beslenmesini, dolayısıyla kalbin beslenmesini sağlayan damarlara koroner arter adı verilir.

2.2. Koroner Arterlerin Anatomisi

Aort damarından ayrılan, epikardial arterler şeklinde tanımlanan majör koroner arterler, kalbin dış yüzünde sulkus adı verilen oluklarda bulunurlar (Gök 1996). Başlangıçta sağ ve sol koroner arter olmak üzere iki ana dal halindedir. Sol ana koroner arter, kısa bir segment sonrasında sol ön inen arter (LAD) ve sirkumfleks arter (Cx) olmak üzere ikiye ayrılır (Hurst 1990).

2.2.1. Sağ koroner arter (RCA)

Aort kökünde sağ koroner valsalva sinüsünden çıkar (Gök 1996). Uzunluğu 12–14 cm, çapı ise 1,5-5,5 mm olan bu arter, sağ kulakçık ve karıncık ile iki karıncık arası bölmenin arka kısmını besler. Bu koroner arterden, akut marjin, sol ventrikül, sinüs düğümü arteri gibi dallar çıkmaktadır (Hurst 1990).

2.2.2. Sol koroner arter (LCA)

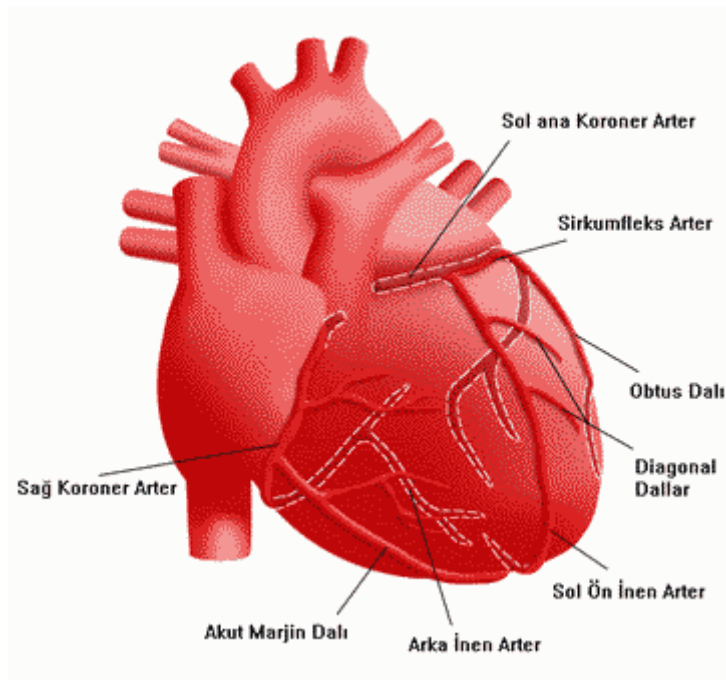
Aort kökündeki sol koroner valsalva sinüsünden çıkar (Gök 1996). 1–25 cm uzunluğunda olup, çapı 2-5,5 mm'dir. Sol koroner arter kalbin daha büyük bir bölümünü beslediğinden dolayı daha önemlidir. Sağ koroner arterden daha kalın olan bu arter, kısa bir segment sonrasında sol ön inen arter ve sirkumfleks arter olmak üzere ikiye ayrılır (Hurst 1990, Gök 1996).

2.2.2.1. Sol ön inen arter (LAD)

Kalbin ön yüzünde yukardan aşağıya doğru uzanır. Uzunluğu 10-13 cm, çapı ise 2-5 mm'dir. Sol koroner arterden ayrılan bu arter, sol karıncığın ön yüzü ile iki karıncık arası bölmenin ön kısmını besler, dolayısıyla kalbin ön yüzünün kanlanmasını sağlar. Kendisinden çıkan dallar diagonal ve septal dallar olarak adlandırılır. Kalp kasının en büyük bölümünü besleyen damar olduğundan dolayı, kalbin en önemli damarıdır. Bu damara bağlı miyokard infarktüslerinde (kalp krizlerinde) kalp kası hasarı daha büyük olur.

2.2.2.2. Sirkumfleks arter (Cx)

Uzunluğu 6-8 cm, çapı 1,5-5,5 mm olan sirkumfleks arter, atrium (kulakçık) ve ventriküllerin (karıncık) arasından dolanıp kalbin arkasına yönelerek, kalbin yan ve arkasını besler. Kendisinden çıkan yan dallara obtus adı verilir.



Şekil 2.1. Kalbin arterleri (Hurst 1990).

2.3. Koroner Arterlerin Histolojisi

Arterler histolojik yapılarına göre elastik arterler, musküler arterler ve arterioller olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Crawford 2004). Koroner arterler musküler arter yapısındadır. Musküler arterlerin çapları genellikle 0,5–10 mm arasındadır. Musküler arterler tüm arterlerde olduğu gibi, içten dışa doğru intima, media ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşan bir duvar yapısına sahiptir.

2.3.1. İntima tabakası

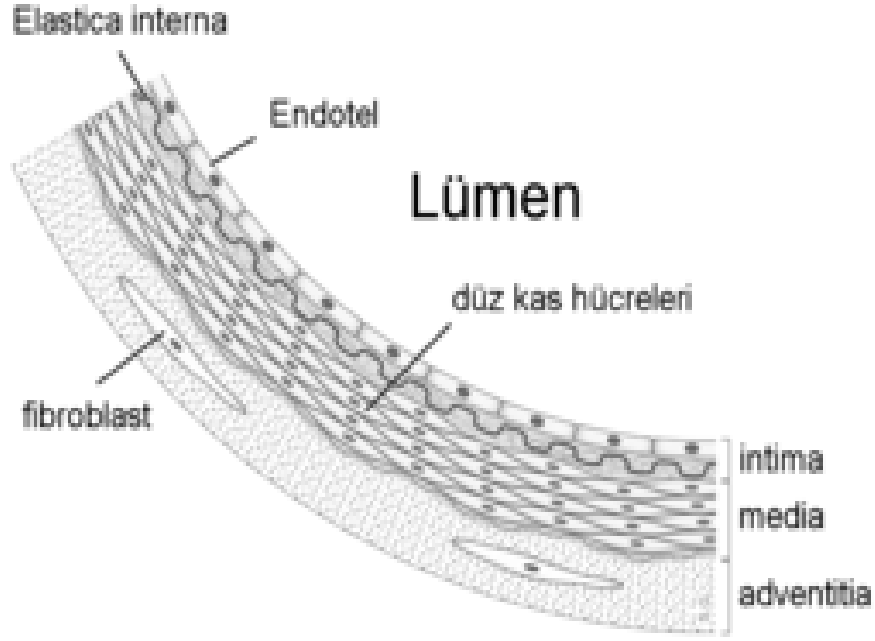
Bu tabaka en içte bir sıra endotel hücresi, daha sonra kollajen ve elastik fibrillerin oluşturduğu ince bir subendotelyal tabaka ve bu tabakanın altındaki belirgin bir internal elastik laminadan oluşur. Endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında düzgün ve kesintisiz bir sınır oluşturan tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir tabakadır. Endotelin başlıca üç görevi vardır: kan elemanları ile arter duvarı arasındaki geçirgenliği sağlamak, damar tonusunu kontrol etmek ve hemostaz ve inflamasyona (iltihaplanma) göre damar yüzeyinin özelliklerini düzenlemektir.

2.3.2. Media tabakası

Bağ dokusu ile sarmalanmış olan bu tabaka çok katlı, spiral şekilli düz kas hücreleri ve bu hücreler arasındaki matriksten oluşmuştur (Crawford 2004). Dış sınırlarını internal ve eksternal lamina oluşturur ve media'yı intima ve en dış katman olan adventisyadan ayırır. Damar duvarının en geniş tabakası olan bu tabakanın esas fonksiyonu, damar duvarındaki kontraksiyonu ve dilatasyonu sağlamaktır (Crawford 2004).

2.3.3. Adventisya tabakası

Koroner arter duvarının en dış tabakasıdır. Bu tabaka genellikle uzunlamasına yerleşim gösteren fibroblastlar, elastik ve kollajen fibrillerin oluşturduğu gevşek yapıda bir bağ dokusundan meydana gelir. Adventisya herhangi bir membranla sınırlanmaksızın, çevre bağ dokusu ile devam eder. Bu tabaka vaza vasorum da denilen kapiller, venül ve arteriollerle damar duvarının beslenmesini sağlar (Hurst 1990, Crawford 2004).



Şekil 2.2. Koroner arterlerin yapısı (Crawford 2004).

2.4. Koroner Arter Hastalığı ve Oluşum Mekanizması

Koroner arter hastalığı (KAH), kalbin kendisini besleyen koroner arterlerin, beslediği bölgelere herhangi bir nedenle, yeterli kan taşıyamaması sonucu miyokarda oluşan iske mi (dokunun kanlanamaması) ve nekroz (doku ölümü)'un derecesine göre oluşan bir hastalıktır . Koroner arter hastalığının diğer adları “koroner kalp hastalığı”, “aterosklerotik kalp hastalığı”, “koroner aterosklerotik kalp hastalığı” ve “iske mik kalp hastalığı”dır. KAH, tüm ölümlerin %33-50'sinin, kalp hastalarına bağlı ölümlerin ise % 50-75'inin nedenidir . Bu rakamlar, KAH'ın en sık görülen hastalık grubu olduğunu ve ölümlerin en başta gelen nedeni olduğunu yansıtmaktadır . KAH'a bağlı ölümler genelde genç yaşlarda ortaya çıkmakta ve kişiyi en verimli olduğu yaşta yakalamaktadır (Topol 2005).

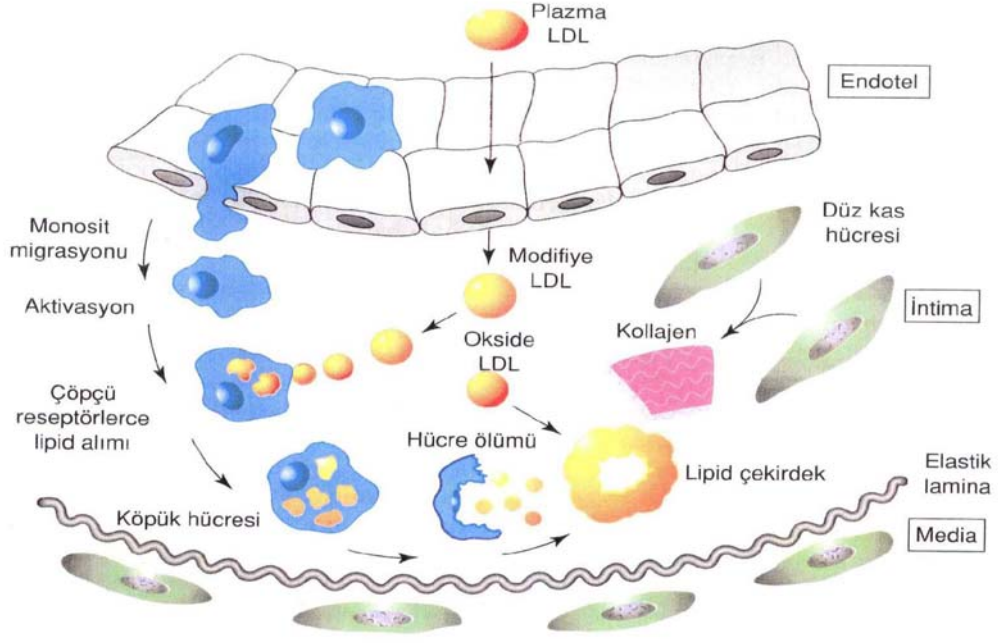
KAH, genellikle ateroskleroz sonucu gelişmektedir (Gök 1996). Ateroskleroz, ateromlar ya da ateromatöz veya fibroz yağlı plaklar denen, damar lümenine doğru çıkıntı yapan ve lümeni tıkayan, alttaki media tabakasını zayıflatan ve ciddi komplikasyonlar gösterebilen intimal lezyonlarla karakterizedir. Gelişmiş dünya ülkelerinde olduğu gibi

ülkemizde de ateroskleroz ve komplikasyonları en sık görülen ölüm nedenidir ve ciddi morbiditeye neden olur (Crawford ve ark 2004, Topol 2005).

Aterosklerozda rol oynayan hücreler; endotel hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri, T lenfositler ve trombositlerdir . Bu hastalığın öncü lezyonları; yağ izleri ve fibröz plaktır (Gök 1996). Aterosklerozun en erken görülen bulgusu olan yağ izleri, çocukluk çağından itibaren gelişmeye başlar. Bu yağlı izler, doğumdan kısa bir süre sonra aortada görülür . 8-18 yaşlarında sayıları artan bu lezyonlar, 2-10 mm boylarında, az kabarıklık, sarı intima çizgileri şeklinde görülür. Yağlı izler, patolojik olarak köpük hücrelerinden oluşurlar. Ateroskleroz gelişiminde ilk oluşan değişiklik, monosit ve T lenfositlerin endotele yapışması, subendotelyal bölgeye migrasyonu (göçü) ve subendotelyal bölgede monositlerin makrofajlara dönüşerek içinde kolesterol depolamasıdır.

Aterosklerozun en önemli patolojik lezyonu ve hastalıkta görülen klinik bulguların kaynağı olan fibröz plaklar, 25 yaş civarında gelişmeye başlarlar. Fibröz plak gelişiminde, intimada gerçekleşen esas olay düz kas hücrelerinin göçü ve çoğalmasındır (Gök 1996).

Ateroskleroz iki patolojik sorun oluşturur. Birincisi; oluşan plaklar zaman içinde yırtılabilir ve plakların içinden çıkan parçalar akıntıyla gidip daha dar damarları tıkalabilir (tromboz). İkincisi; plaklar büyüyerek damarın tıkanmasına (stenoz) yol açabilir. Her iki durumda da damar tarafından beslenen organa yetersiz kan gitmiş olur. Sonuçta, miyokardın ihtiyacı olan oksijenin yeterince karşılanamaması sonucu iskemi oluşur (Hurst 1990).



Şekil 2.3. Temel Ateroskleroz Süreci. Plazmadaki düşük dansiteli lipoprotein (LDL) intimaya girer, modifiye olur ve endotelde monosit migrasyonu ile sonuçlanan değişiklikleri başlatır. İntimada daha da fazla okside olan LDL, makrofajlar tarafından aktif biçimde alındığında köpük hücreleri oluşur. Makrofaj ölümüyle, lipidler serbest kalarak çekirdeği oluşturur. Endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörleri, düz kas hücresinde büyümeyi ve bağ dokusu matrisinde sentezi uyarırlar.

KAH yıllar içinde yavaşça gelişir ve miyokard infarktüsü (Mİ, kalp krizi) oluşturuncaya kadar hiç fark edilmeyebilir. Mİ, KAH'ın en önemli komplikasyonudur. Genel olarak, miyokardın belirli bir bölgesine gelen kan akımının tamamen kesilmesine ya da ileri derecede azalmasına yol açan koroner arter tıkanması veya spazmı sonucunda ya da miyokardın oksijen ihtiyacının artmasına karşılık, kalbin bazı bölgelerinde kan akımının arttırılamamasının neticesi olarak gelişmektedir. Mİ geçirme riski hayat boyunca sürekli olarak artmaktadır. 45 ve 54 yaşları arasında, erkeklerde, kadınlara kıyasla Mİ geçirme olasılığı 4-5 kat daha fazladır. Bununla birlikte KAH riski 80 yaşından sonra her iki cinsten eşit olarak görülmektedir.

KAH ve onun önemli komplikasyonu olan Mİ, belli bir genetik alt yapıya ve riske sahip kişilerde çevresel risk faktörlerinin etkisi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. KAH'ın

oluşumunda % 99 etiyolojik neden aterosklerozis olduğu için, aterosklerozisin risk faktörleri aynı zamanda KAH'ın da risk faktörleri olarak kabul edilmektedir.

2.5. Koroner Arter Hastalığının Risk Faktörleri

Bu hastalık için belirlenen risk faktörleri; lipid ve lipoprotein metabolizması bozuklukları, hipertansiyon, diyabet, sigara, obezite, fiziksel inaktivite, cinsiyet, yaş ve aile öyküsü'dür (Gök 1996, Wang ve ark 2003, Bhagavatula ve ark 2004, Yamada 2006). Bu risk faktörleri kendi arasında değiştirilmesi mümkün olan ve değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri olmak üzere ikiye ayrılır.

2.5.1. Değiştirilmesi mümkün olan risk faktörleri

KAH için değiştirilmesi mümkün olan risk faktörleri; LDL kolesterolün yüksek olması, HDL kolesterolün düşük olması, hipertansiyon, diyabet (şeker hastalığı), sigara, obezite ve fiziksel inaktivitedir (Hurst 1990, Gök 1996, Wang ve ark 2003, Bhagavatula ve ark 2004, Crawford 2004).

LDL kolesterol yüksekliğinin KAH için başlıca risk faktörü olduğu bilinmektedir. Serumda yüksek LDL düzeyleri, hasar görmüş endotel ile etkileşerek, plak oluşumunu hızlandırır (Crawford 2004).

Eğer LDL kolesterol düşürülürse, ateroskleroza sebep olan plakların oluşumu yavaşlayacağından kardiyovasküler olayların görülme sıklığı da belirgin bir şekilde azalabilir (Crawford 2004). HDL kolesterolün de düşük olması, KAH için risk faktörüdür. HDL kolesterolün yüksek olması, KAH için koruyucu bir parametredir (Gök 1996).

Hipertansiyon, ateroskleroz gelişmesinde ve ateroskleroza bağlı komplikasyonların oluşumunda sık görülen bir faktördür. Kardiyovasküler hastalık için, kan basıncı artışının eşik seviyesi yoktur, ancak 160/95 mm Hg'nın üstünde olduğu zaman risk artışı 2-3 kat daha fazladır (Gök 1996).

Diyabet de tek başına başlıca risk faktörü olmasının yanısıra, sıklıkla hiperlipidemi ve hipertansiyon gibi ana risk faktörleriyle birlikte (Gök 1996). Diyabetli hastalarda, artan insülin düzeyi karaciğerde, LDL kolesterol ve trigliserid yapımının artmasına sebep

olarak hiperlipidemiye neden olur. Hiperlipidemi de endotel hasarına sebep olarak, KAH'na yakalanma riskini arttırabilir. Bu yüzden diyabetli hastalarda daha yaygın KAH gelişme riski vardır.

Sigaranın da KAH'nın oluşma riskini ve mortaliteyi arttıran önemli risk faktörlerinden olduğu bilinmektedir (Hurst 1990). Hem kadınlarda hem de erkeklerde ve tüm yaş gruplarında içilen sigara miktarı ile KAH arasında güçlü bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Sigara içiciliği, KAH riskini 2-3 kat arttırmaktadır ve diğer risk faktörleri ile birleşerek riskin artışına neden olur. Sigara içiciliğinin ateroskleroz oluşumunu arttırarak KAH'na neden olma mekanizmaları hakkında pek çok fikir öne sürülmektedir (Crawford 2004). Bunlardan biri; sigaranın lipid profili üzerine olumsuz etkisidir. Sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, sigara içenlerde (özellikle günde 25 adetten fazla) HDL kolesterol düzeyleri daha düşük, LDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri daha yüksek saptanmıştır. Bu parametreler de KAH için risk faktörüdür. Ayrıca sigara kan basıncında da değişikliklere yol açarak KAH'a neden olabilmektedir.

Obezite, Amerikan Kalp Cemiyeti tarafından, KAH için majör bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Gök 1996). İdeal vücut ağırlığının %20'sinden fazlası obezite olarak kabul edilmektedir. Vücut kitle indeksi, obezitenin tanımlanmasında kullanılan en ideal kriter olarak kabul edilmektedir.

Bel çevresinin kadınlarda 88 cm, erkeklerde de 102 cm'den fazla olması abdominal obezite olarak tanımlanmaktadır. Abdominal obezitenin de tek başına hem kadın hem de erkeklerde, kardiyovasküler hastalık gelişme riskini daha çok arttırdığı bilinmektedir .

Fiziksel inaktivitenin de KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve riski ortalama olarak 2 kat arttırdığı bilinmektedir (Crawford 2004).

2.5.2. Değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri

KAH için değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri; cinsiyet, yaş ve aile öyküsüdür (Hurst 1990, Gök 1996, Stephens ve Humpries 2003, Crawford 2004).

Ateroskleroz ve KAH'nın oluşumu, olasılıkla hormonal etkileşimler sonucunda, erkeklerde daha sık ve daha genç yaşta klinik bulgu vermektedir. Kadınlarda ise, menapoz döneminden sonra belirgin bir artış göstermektedir. Ancak 75 yaşına gelindiğinde, KAH'na bağlı olay riski her iki cins için de eşitlenir (Hurst 1990).

Ateroskleroz ve KAH'nın oluşumu yaşla birlikte artmaktadır. KAH için ana risk faktörleri olmadığı takdirde, 45 yaşın altında ateroskleroza ait klinik bulgu saptanması nadirdir. Erkeğin 45 yaşın üstünde, kadının 55 yaşın üstünde olması veya erken menapoz girmiş olması KAH için risk faktörüdür.

Aile öyküsü de KAH için önemli bir risk faktörüdür (Crawford 2004). Baba ve birinci derecede erkek akrabalarda 55 yaşından, anne ve birinci derecede kadın akrabalarda 65 yaşından önce miyokard infarktüsü veya ani ölüm bulunması KAH için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Aile öyküsünde önemli faktörlerin kalıtımı söz konusu olabilir. Bu faktörlerin içinde kolesterol, lipoproteinler, kan basıncı, diyabet ve obezite önemli yer tutmaktadır.

KAH için belirlenen hipertansiyon, obezite, hiperkolesterolemi, diyabet, sigara, fiziksel inaktivite ve pozitif aile öyküsü gibi risk faktörlerinin yanı sıra, son zamanlarda aday genlerdeki DNA polimorfizmlerinin (gençokyapılılık) neden olduğu genetik yatkınlık da önemli bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Gonzales ve ark 2005).

Kalp ve damar hastalıklarında değiştirilemeyen risk faktörlerinden olan genler, hastalık yapıcı, yatkınlık ve hastalıkla ilişkili genler olmak üzere 3 sınıfta incelenebilir. Hastalık yapıcı genler mutasyona uğradıklarında hastalığın patogenezisinden sorumludurlar. Bu durumda mutasyonlar hastalığın temel sebebi olarak kabul edilir. Örneğin; KCNQ1 ve KCNH2 gibi potasyum kanal gen mutasyonları uzun QT sendromuna sebep olurken, kardiyak sodyum kanal geni SCN5A mutasyonları Brugada sendromuna sebep olur. Yatkınlık genleri hastalığın gelişme riskini arttıran ya da azaltan genler olup, hastalığa yol açıp açmayacakları diğer genetik ve çevresel şartlara bağlı olarak değişebilir. Yatkınlık genlerine örnek olarak transkripsiyon faktör geni USF1, sitokin geni lenfotoksin-

α , lenfotoksin- α düzenleyici gen LGAL52, ALOX5AP (5- lipoksigenazı aktive edici protein) ve fosfodiesteraz 4D geni verilebilir. Hastalıkla ilişkili genler ise moleküler biyolojik, mikroarray ya da proteomik analizler ile hastalıkla bağlantılı olup, hastalıkla ilişkisi olup olmadığı kesin değildir. Bazı hastalıkla ilişkili genler, hastalık için biyolojik belirteç olarak rol alabilir. Hastalıkla ilişkili genlere örnek olarak da interselüler adezyon molekülü-2, PIM2, ECGF1, fusin, B- hücre aktivatörü (BL34, GO58), RhoGTPaz aktive edici protein-4, retinoik asit reseptör cevaplayıcı ve β 2-arrestin verilebilir. Koroner arter hastaları ve Mİ geçiren bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda, MEF2A (miyosite spesifik enhanser faktör 2A) geninin, KAH ve Mİ'ya yol açan ilk ve tek gen olduğu belirtilmiştir (Bhagavatula ve ark 2004, Wang ve ark 2005). MEF2A geninin 11. ekzonunda 21 baz çiftlik delesyon etkilenmiş tüm bireylerde bulunurken, normal fenotipli ya da normal anjiogramlı bireylerde saptanmamıştır. Fonksiyonel çalışmalar, 21 baz çiftlik (bç) delesyonun MEF2A'nın transkripsiyonel aktivasyonunu negatif-dominant mekanizma ile bozduğunu göstermiştir. Daha sonraki yıllarda, MEF2A geninin 7. ekzonunda 3 yeni mutasyon (N263S, P279L ve G238D) daha tespit edilmiştir. 7. ekzonda tespit edilen bu mutasyonların da transkripsiyonel aktiviteyi fonksiyon kaybı ile düşürdüğü ve KAH'lığının daha hafif formuna yol açtıkları saptanmıştır (Wang ve ark 2005).

2.6. MEF2 Transkripsiyon Faktör Gen Ailesi

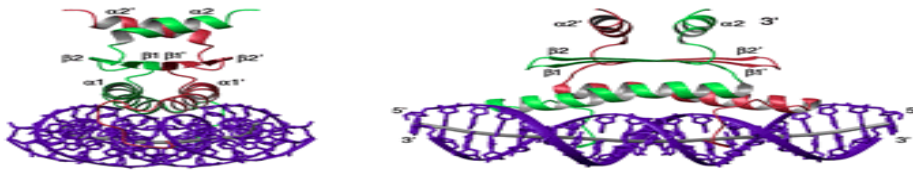
Mezodermal öncü hücrelerden miyoblastlara farklılaşma işlemi sırasında, kastaki genlerin ekspresyonunu düzenleyen, dokuya özgü faktörler tespit edilmiştir. Bu dokuya özgü faktörlerden biri MyoD, miyojenin, MYF5 (miyojenik faktör 5) ve MYF4 (miyojenik faktör 4) adlı miyojenik bazik heliks-ilmek-heliks proteinlerinden oluşan MyoD ailesi, diğeri de DNA'ya bağlanmayı düzenleyici protein olan MEF2 transkripsiyon faktör gen ailesidir (Molkentin ve ark 2005). MEF2 transkripsiyon faktör gen ailesi, MADS-box (Yeast mating type-specific transcription factor MCM1, the plant homeotic genes “agamous” and “deficiens” ve human serum response factor SRF) gen ailesinin bir üyesidir (Martin ve ark 2004, Hobson ve ark 1995, Suzuki ve ark 1996, Ornatsky ve ark 1996, Went ve ark 1997).

MEF2 transkripsiyon faktör gen ailesi, balangıçta kas kreatin kinaz (MCK) geninin, kasa spesifik enhanser'ında bulunan adenin (A) ve timin (T) nükleotitlerinden zengin hedef

diziye bağlanabilen protein ailesi olarak belirlenmiştir (Gossett ve ark 1989, Martin ve ark 1993, Molkenntin ve ark 1995, Dodou ve ark 1995, Molkenntin ve ark 1996, Black ve Olson 1998, Santelli ve Richmond 2000). Daha sonraki çalışmalarda, MEF2 proteinlerinin, iskelet kası, kalp kası ve düz kas hücreleri ile sinir hücrelerinde de yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (Yu 1996, Black ve Olson 1998, Andres ve ark 2003). MEF2 transkripsiyon faktör gen ailesi, insan genomunda MEF2A, MEF2B, MEF2C ve MEF2D olmak üzere 4 gen tarafından kodlanmaktadır.

2.6.1. MEF2A proteininin moleküler yapısı

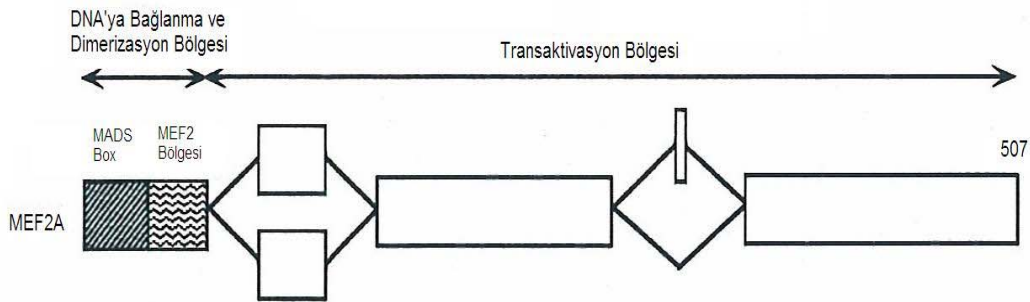
MEF2A, MEF2 transkripsiyon faktör ailesi üyelerinin ilk proteinidir. MEF2A-DNA kompleksinin 33 kDA'lık bir kompleks olduğu belirtilmiştir (Huang ve ark 2000, Santelli ve Richmond 2000). İnsan MEF2A proteini 3 tabakadan oluşmaktadır (Santelli ve Richmond 2000). MEF2A proteininin her bir monomeri uzun bir α -heliks (α I), DNA ile etkileşimde olan 12 aminoasit (aa)'lık N kuyruğu ve orta tabakada β - saç tokasının şekillenmesini sağlayan 2 tane β ipliği içerir. Bu tabakalar birlikte MADS-box bölgesini oluşturur. İkinci α -heliks (α II) ise MEF2 bölgesinin esas parçasını veya üst tabakası oluşturur.



Şekil 2.4. 33 kDA'lık MEF2A-DNA kompleksi (Santelli ve Richmond 2000).

MEF2A proteininin NH_2 (amino) ucunda, 1-85 aa'dan oluşan, DNA'ya bağlanma ve dimerizasyon için gerekli olan DNA'ya bağlanma bölgesi vardır. MEF2A proteini, DNA'ya bağlanma bölgesinin COOH (karboksil) ucunda nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile transkripsiyon aktivasyon bölgeleri (TAD) içerir. Bu bölgelerin aktiviteleri, MAP (mitojenle aktive dilmiş proein) kinazın fosforilasyonu ile düzenlenmektedir (Huang ve ark 2000, Han ve ark 1997, Kato ve ark 1997, Ornatsky ve ark 1999). NLS, 472.aa ile 507.aa'ler arasındadır. TAD ise, 132.aa–201.aa, 321.aa–472.aa ve 274.aa–373.aa'ler arasındadır. MEF2A proteininin esas aktivasyon bölgesi 274.aa ile 373.aa arasına

yerleşmiştir (Yu 1996). MEF2A transkripsiyon faktörünün aktivasyon bölgeleri, asidik aa'ler olan glutamin (Gln), prolin (Pro) veya serin\treonin (Ser\Thr) aa'lerinin pozisyonuna bağlı olarak sınıflandırılmıştır. MEF2A için aynı zamanda izolösin veya bazik aa'lerden zengin aktivasyon bölgeleri de tanımlanmıştır. MEF2A'nın TAD'ı, hücre tipine özgü farklılık gösteren DI, DII, DIII ve DIV olmak üzere 4 alt bölge içerir. DI alt bölgesi asidik ve pozitif düzenleyici alt bölgedir. 302.aa ile 321.aa'ler arasındaki Ser\Thr'den zengin bölge DII alt bölgesidir. Bu Ser\Thr'den zengin dizilerin transkripsiyon aktivitesi için önemli olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. DIII alt bölgesi de pozitif düzenleyici bölge olarak bilinmektedir. DII ve DIV hidrofobik triptofan (Trp) ve valin (Val) aa'leri içerir. Bu hidrofobik aa'ler, MEF2A'nın aktivasyon bölgesinin aktivasyonu için temel dizilerdir. Hem C2 miyotüplerde hem de HeLa hücrelerinde yapılan çalışmalarda, MEF2A'nın DI bölgesinin (289.aa–296.aa) pozitif düzenleyici bölge, 274.aa ile 288.aa arasındaki bölgenin inhibitör bölge (İD) olduğu belirtilmiştir (Yu 1996). MEF2A'nın TAD'daki bu alt bölgeleri, çeşitli protein kinazlar için mevcut olan potansiyel fosforilasyon siteleri içerirler. DI'de kazein kinaz II, DII'de mitojeni uyaran protein kinaz(MAPK), DIII'de kazein kinaz I, kazein kinaz II ve tirozin kinaz sitelerini içeren bu bölgeler, tirozin, serin ve treonin fosforilasyon bölgelerini taşırlar (Yu 1996, Cox ve ark 2003). Kazein kinaz II'deki potansiyel fosforilasyon sitelerinin, MEF2A'nın aktivitesinin düzenlenmesinde ve iskelet kası hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Yu 1996).



Şekil. 2.5. MEF2A proteinin şematik yapısı (Suzuki ve ark 1996).

2.6.2. MEF2A geni

İnsan MEF2A geni 15 no'lu kromozomun q26 bölgesine yerleşmiştir (Suzuki ve ark 1996) ve aadizisi 507 aa'lık bir proteini kodlar. MEF2A geni 11 ekzon ve 10 introna sahiptir. En küçük ekzonu 24 bç'den oluşur ve asidik SEEEELEL peptidini kodlar. Bu gen, alternatif olarak işlenmiş Alu dizisinin aşağısında 5' ucu-kodlanmayan bölge, protein kodlayan bölge ve 3' ucu-kodlanmayan bölge içerir. 56 aa'den oluşan MADS bölgesi 18 kodondan sonra 1 intron ile kesilir ve 29 aa'den oluşan MEF2 bölgesi 1 intron ile takip edilir. 3' ucu-kodlanmayan bölgesi 3,7 kilobaz (kb) uzunluğundadır ve AATAAA'dan oluşan poliadenilasyon sinyali içerir. İnsan MEF2A cDNA'sının 3' ucu-kodlanmayan bölgesi *Xenopus* MEF2A cDNA'sınınkinden 393 nükleotid daha uzundur (Suzuki ve ark 1996) ve her iki türün cDNA'sı üst üste karşılaştırıldığında nükleotid seviyesinde % 94 benzerliğe sahiptir. Suzuki ve ark (1996) tarafından insan MEF2A genine yüksek derecede benzerlik gösteren, kısmen işlenmiş MEF2AP olarak adlandırılan psödogenin olduğu rapor edilmiştir. Bu psödogen, 5' ucu-kodlanmayan bölge, MADS-box bölgesi, MEF2 sitesi ve alternatif olarak işlenmiş ekzon içermektedir. İnsan MEF2A geni ile insan MEF2AP karşılaştırıldığı zaman, MEF2AP'nin MADS-box'ı içinde 9 nükleotidlik bir değişim olduğu bildirilmiştir (Suzuki ve ark 1996). MEF2AP transkribe edilse bile fonksiyonel bir protein oluşturabilmesi mümkün değildir.

2.6.3. MEF2A proteininin fonksiyonu

MEF2A proteini, iskelet kası, kalp kası ve düz kas hücrelerinin morfogenezisi ve miyogenezisinde önemli bir rol oynar (Gossett ve ark 1989, Black ve Olson 1998, Huang ve ark 2000, Zhu ve Gulick 2004, Santelli ve Richmond 2004). Yalnız MEF2A proteini tek başına tüm kas hücresi fenotipini belirlememektedir (Yu ve ark 1992). Kas gelişim aşamalarında, diğer MEF2 gen ailesi üyelerinin de etkili olduğu gösterilmiştir. İlk önce kas öncü hücrelerinin kas hücrelerine farklılaşmasında MEF2A proteini etkili olmakta, daha sonraki aşamalarda ise MEF2C'nin bu farklılaşma aşamalarının sürekliliğini sağladıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda ilk farklılaşma aşamalarında, MEF2D'nin de etkili olduğu düşünülmektedir (Breitbart ve ark 1993). MADS-box gen ailesine ait MEF2 üyeleri fibroblast hücrelerinin miyogenezisini, miyojenik bazik heliks-ilmek-heliks proteinleri ve E12 ve E47 gibi E proteinleri ile birlikte heterodimer oluşturup, aynı DNA dizisine bağlanarak düzenler (Ornatsky ve McDermott 1996, Naya ve Olson 1999). MEF2 faktörleri, çok sayıda kasa spesifik ve büyüme faktörlerini teşvik eden genlerin kontrol

bölgelerinde bulunan, A ve T'den zengin konsensus dizisine [CTA(A/T)₄TAG] homodimer veya heterodimer olarak bağlanarak transkripsiyonu aktive eder (Martin ve ark 1993, Suzuki ve ark 1995, Andres ve ark 1995, West ve ark 1997, Black ve ark 1997, Santelli ve Richmond 2000, Pollock ve Treisman 1991, Chambers ve ark 1992, Yu ve ark 1992, Breitbart ve ark 1993, Leifer ve ark 1993, McDermott ve ark 1993). Ayrıca MEF2A transkripsiyon faktörü, sinir sisteminin gelişmesinde (Mao ve ark 1999, Youn ve ark 1999, Schulz ve ark 1996), ve kardiyomiyositlerin gelişimi ve farklılaşmasında da rol oynar (Lyons ve ark 1995, Kuo ve ark 1997, Lin ve ark 1997, Iida ve ark 1999, Santelli ve Richmond 2000, Huang ve ark 2000). Aynı zamanda MEF2A proteininin, MAP kinaz yolunun aktivasyonundan sorumlu olan genleri (BMK1\ERK5 veya p38) aktive edebildiği belirtilmiştir (Yang ve ark 1999, Zhao ve ark 1999, Santelli ve Richmond 2000, Huang ve ark 2000, Han ve ark 1997, Kato ve ark 1997, Zetser ve ark 1999). MEF2A proteini, endotelde bol miktarda sentezlenen bir proteindir. Sentezlenen bu protein MAP kinaz ailesi tarafından fosforlanarak endotelin sürekliliğinde soruludur (Attie 2004). Ayrıca, insan GLUT4 (glukoz transporter 4) geninin 464–473 aa'leri arasında bulunan MEF2 konsensus dizisi, GLUT4 geninin ifade edilmesinin, hem dokuya spesifik hem de hormonal yada metabolik olarak düzenlenmesinde rol oynar (Mora ve Pessini 2000).

1 11 21 31 41 51

1 MG**RRKKIQITR** **IMDERNRQVT** **FTKRKFGLMK** **KAYELSVLCD** **CEIALIIFNS** **SNKLFQYAST** 60

61 **DMDKVL****LLKYT** **EYNEPHESRT** **NSDIVE**ALNK KEHRGCDSPD PDTSYVLTPH TEEKYKKINE 120

120 EFDNMMRNHK IAPGLPPQNF SMSVTVPVTS PNALSYTNPG SSLVSPSLAA SSTLTDSSML 180

181 SPPQTTLHRN VSPGAPQRPP STGNAGGMLS TDLTVPNGA GSSPVGNGFV NSRASPNLIG 240

241ATGANS LGKV MPTKSPPPPG GGNLGMNSRK PDLRVVIPPS SKGMMPLSE EEELELNTQR 300

301 ISSSQATQPL ATPVVSVTTP SLPPQGLVYS AMPTAYNTDY SLTSADLSAL QGFNSPGMLS 360

361 LGQVSAWQQH HLGQAALSSL VAGGQLSQGS NLSINTNQNI SIKSEPISPP RDRMTPSGFQ 420

421 QQQQQQQQQQ PQQPPQPQPQ PPQPQRQEM GRSPVDSLSS SSSSYDGSDR EDPRGDFHSP 480

481 IVLGRPPNTE DRESPSVKRM RMDAWVT

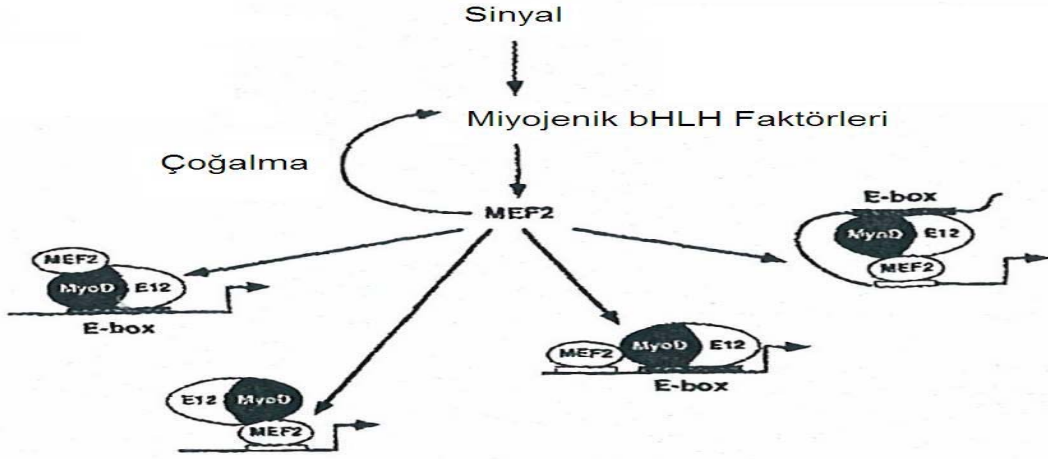
Şekil 2.6. MEF2A ekzonun kodlanan bölgesinin aminoasit dizisi (kırmızı renkli diziler MADS-box bölgesini, mavi renkli diziler DNA'ya bağlanma bölgesini göstermektedir) (<http://www.espasy.org>).

2.7. MEF2 Faktörlerinin Transkripsiyonel Aktivasyonu

MEF2 gen ailesinin üyeleri, kasa özgü gen ekspresyon programlarını aktive etmek için, çeşitli transkripsiyon faktörleri ile birlikte çalışırlar. MEF2 faktörlerinin en iyi çalıştığı aile, iskelet kasma spesifik bazik heliks-ilmek-heliks (bHLH) proteinlerden MyoD ailesinin üyeleridir. Bu iki ailenin proteinlerinin birlikte çalışması sonucunda, iskelet kasındaki genlerin (kas kreatin kinaz, miyozin hafif zincir 1/3 ve miyojenin) aktivasyonu sağlanmış olur (Kaushal ve ark 1994, Molquentin ve ark 1995, Black ve ark 1998).

Miyogenezisin başlayabilmesi için, DNA'ya bağlı miyojenik bHLH faktörleri aracılığıyla transkripsiyonel döngüye, hem MEF2 hem de miyojenik bHLH faktörlerinin aktivasyon sinyallerinin iletilmesi gereklidir.

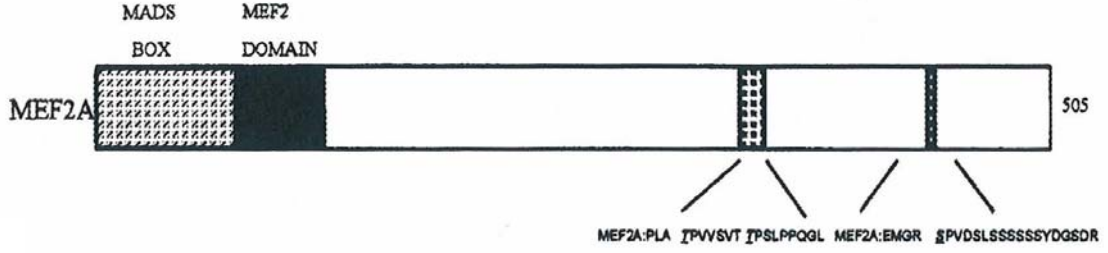
Aktivasyon sinyalinin iletimi, bazik bölgelerdeki alanin (Ala) ve treonin (Thr) aa dizilerine bağlıdır (Davis ve ark 1990, Brennan ve ark 1991, Weistraub ve ark 1991, Davis ve Weintraub 1992, Winter ve ark 1992). MEF2 proteinleri, MyoD bazik bölgesindeki bu aa'lere bağlı olarak, miyojenik bHLH proteinlerinin miyojenik aktivitesini arttırlar (Molquentin ve ark 1995, Black ve ark 1998). MEF2 proteinlerinin miyojenik bHLH proteinleri ile etkileşimi sonucunda, MEF2 proteinleri ile E proteinleri heterodimer oluşturur. MEF2 siteleri veya E-box bölgesini içeren genler üzerinde, bu faktörlerin her ikisinin de DNA'ya bağlanma şartı olmadan, tek bir DNA'ya bağlanma sitesi vasıtasıyla transkripsiyon aktive edilir (Molquentin ve ark 1995).



Şekil 2.7. Miyojenik bHLH proteinleri ve MEF2 aracılığıyla kas hücrelerindeki genlerin aktivasyon mekanizmaları (Molkentin ve ark 1995).

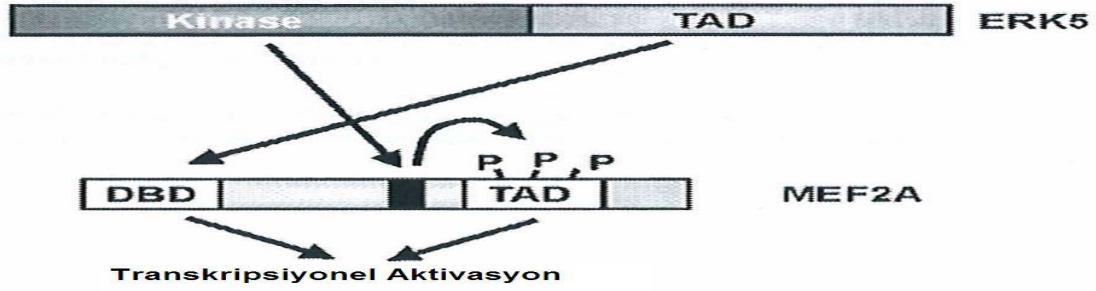
MEF2 transkripsiyon faktör ailesi üyelerinin, iskelet kasındaki genlerin aktivasyonunu düzenlemelerinin yanı sıra, mitojenik sinyalizasyon yollarında rol alan genlerin aktivasyonunu da sağladıkları gösterilmiştir. MEF2 faktörlerinin transkripsiyonunun aktive edilmesini sağlayan 2 tane sinyalizasyon yolu vardır. Bunlardan biri mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolu, diğeri de kalsiyum (Ca) iyonu aracılığıyla sinyalizasyon yolaktır.

MAPK sinyalizasyon yolları, hücre dışı sinyalleri farklı hücrel cevaplara dönüştürerek, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu arttırmaktadır (Yang ve ark 1999). İnsanlarda, MAPK'ların ERK (ekstraselüler sinyalle düzenlenmiş kiaz), c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK), p38ve ERK5/BMK1 olmak üzere 4 alt sınıfı vardır. MAPK ailesi üyesi olan p38, MEF2 transkripsiyon faktör gen ailesi üyelerinden MEF2A'nın transkripsiyonunu aktive edebilmektedir. Bu durum, MEF2A'nın transkripsiyon aktivasyon bölgesi olan COOH ucundaki 3 aa (Thr-312, Thr-319 ve Ser-453)'in fosforile edilmesi sayesinde olmaktadır (Zhao ve ark 1999).



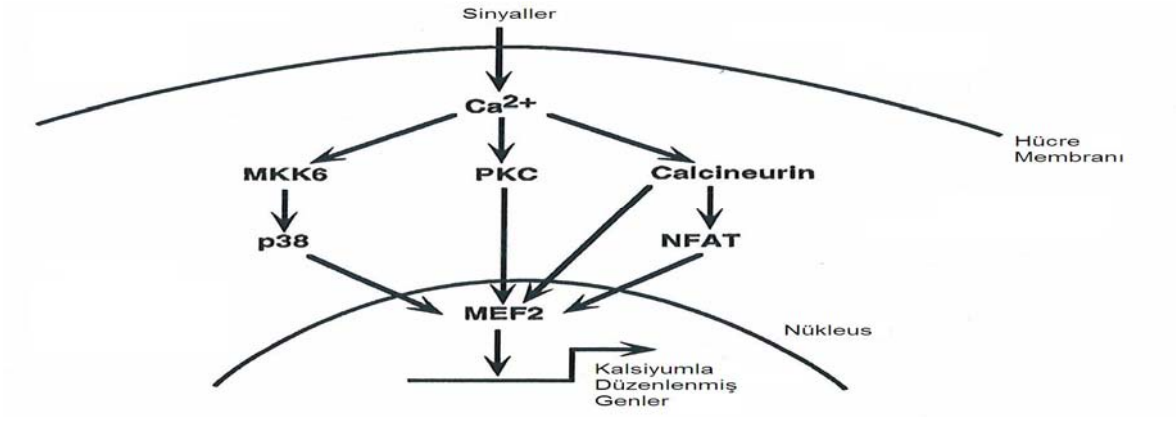
Şekil 2.8. MEF2A proteinindeki p38 için fosforilasyon sitelerini içeren aminoasit dizileri (Zhao ve ark 1999).

Ayrıca MAPK ailesi üyelerinden olan ERK5 (ekstraselüler sinyalle düzenlenmiş kinaz 5) aracılığıyla da, MEF2A proteininin transkripsiyonel aktivasyonu sağlanmış olur (Barsyte ve ark 2004).



Şekil 2.9. ERK5 aracılığıyla MEF2A'nın aktivasyonu. ERK5'in COOH ucu ve MEF2A'nın NH₂ ucundaki etkileşimlerin sonucunda ERK5'in TAD'ı MEF2A'ya geçer. ERK5'in katalitik bölgesi olan NH₂ ucu ve MEF2A'nın D bölgesindeki etkileşimler MEF2A'nın TAD'nın fosforile olmasını sağlar ve transkripsiyonel aktivasyonu sağlanmış olur (Barsyte ve ark 2004).

Ca iyonuna bağlı olarak sinyalizasyon yolakında ise MEF2 proteinleri, hücre içindeki Ca iyonunun artışıyla aktive edilmiş hücre içi sinyalizasyon yollarının çıkış noktaları olarak iş görürler (Firulli ve ark 1996). Ca iyonunun nöronlardan içeriye alınması sonucunda, MEF2 proteini, nöronların farklılaşması ve aktivasyonu için gerekli olan genlerin ekspresyonunu sağlayabilmektedir (Firulli ve ark 1996).



Şekil 2.10. MEF2’deki sinyalizasyon yolları. Her sinyalizasyon yolakı MEF2 proteininin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenleyerek, kalsiyum ile düzenlenmiş genleri aktive eder (Black ve Olson 1998).

3. MATERYAL METOD

3.1. Grupların Oluşturulması ve Kan Örneklerinin Toplanması

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı ve Konya Numune Hastanesi Kardiyoloji Bölümü'ne başvuran 111 Koroner arter hastası ve miyokard infarktüsü geçiren bireyler seçildi. Bu hastaların 65 yaşın altında olmasına ve koroner anjiyografi yapıp koroner arterlerinde % 70 ve üzeri darlık olmasına dikkat edildi. Kontrol grubunu ise ailesinde koroner arter hastalığı hikâyesi olmayan, miyokard infarktüsü geçirmeyen, koroner arterleri normal olan 55 yaş üzerindeki 32 kişi oluşturdu.

Her iki gruptaki bireylerden, DNA eldesi ve biyokimyasal tetkiklerin (LDL, HDL, TG) yapılması için EDTA'lı tüplere 10'ar ml kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanların bir kısmı DNA eldesine kadar -20 °C'de saklandı. Bir kısımda biyokimyasal tetkiklerin analizi için Rutin Biyokimya Anabilim Dalına gönderildi.

3.2. DNA İzolasyonu, PZR, SSCP ve Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Gerekli Olan Gereçler

Santrifüj (NF 100R, İstanbul, Türkiye), derin dondurucu (-80 °C), buzdolabı (Arçelik, İstanbul, Türkiye), mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul, Türkiye), benmari (Nüve, İstanbul, Türkiye), güç kaynağı (E-C Apparatus corporation, Petersburg, Florida), PH-metre (İnolab), manyetik karıştırıcı (Elektro-mag), vorteks (Nüve, İstanbul, Türkiye), PCR aleti (Quanta biotech, İngiltere), mikropipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya), hassas terazi (Sartorius-BP310S), yatay elektrofrez tankı, dikey elektrofrez tankı (Biolab), biyolojik emniyet kabini.

3.2.1. DNA izolasyonu, PZR, SSCP ve agaroz jel elektrofrezisi için gerekli olan kimyasal maddeler

EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), Tris-Hcl,Nacl (Merck, Darmstadt, Almanya), KCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Üre (Merck, Darmstadt, Almanya), SDS,Proteinaz-K (Sigma, St Louis, Amerika), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Etil alkol,Akrilamid (Applichem, Darmsttd, Almanya), Bisakriland (Applichem, Darmsttd, Almanya), Amonyum persülfat (Sigma, St Louis, Amerika), TEMED (Sigma, St Louis, Amerika), Formaldehit,Asetik asit,borik asit (Sigma, St Louis, Amerika), Na₂HCO₃ (Merck, Darmstadt, Almanya), Sodyum tiyosülfat (Merck, Darmstadt, Almanya), Ksilen siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), Taq polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10x Amonyum sülfatlı PZR tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

3.3. DNA İzolasyonu

3.3.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması

0,5 M EDTA (pH 8)

EDTA.....18,6 gr
dH₂O.....80 ml

1 N NaOH ile pH 8'e ayarlanır. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanıp otoklavlanır.

1 M Tris HCl (pH 8)

Tris HCl.....157,6 gr
dH₂O.....83 ml

1 N NaOH ile pH 8'e ayarlanır. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanıp otoklavlanır.

4 M NaCl

NaCl.....23,97 gr
dH₂O.....100 ml'ye tamamlanır.

Parçalama Çözeltisi

NaCl.....4 M
EDTA.....0,5 M
Tris HCl.....1 M

100 ml'ye tamamlanıp, pH 7,5'e ayarlandıktan sonra otoklavlanır.

Üreli Parçalama Çözeltisi

Üre.....4,2 gr
dH₂O.....10 ml
Parçalama Çözeltisi (5X).....2 ml

5 M NaCl

NaCl29,22 gr
dH₂O.....70,78 ml

% 20 SDS

SDS.....20 gr
dH₂O.....80 ml

SDS iyice çözününceye kadar karıştırıcıda karıştırılır ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

% 70'lik Etil Alkol

% 96'lık Etil Alkol.....73 ml
dH₂O.....27 ml

Proteinaz K (10mg/ml H₂O)

Proteinaz K.....10 mg

1 ml distile su içinde çözünür. - 20 °C'de saklanır. Otoklav yapılmaz.

3.3.2. DNA'nın elde edilmesi

DNA'nın elde edilmesi 2 günde gerçekleştirildi.

I.Gün

EDTA'lı tüpe alınan kanlar oda sıcaklığında çözdürülür. Daha sonra üzerlerine hacimleri kadar soğuk distile su eklenir. Hafifçe alt üst edildikten sonra 4000 devir/dakika2da 15 dakika santrifüj edilir. Bu işlem 3 kez yapılır. Üçüncü satrifüj sonunda sıvı kısım atıldıktan sonra her bir tüpe 3 ml ürelü parçalama çözültisi eklenir ve altüst edilir. Daha sonra 400µl % 20'lik SDS ve 100µl 10mg/ml proteinaz K eklenerek 37 °C'de 1 gece için inkübasyona bırakılır.

II. Gün

İnkübasyondan çıkarılan örneklere 2 ml 5 M NaCl eklenir ve 10-15 dakika alt üst edilir. Daha sonra üzerlerine 8 ml kloroform konularak 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda 3 faz oluşur. En üstteki beyaz olarak görülen kısım temiz bir tüpe

konularak, üzerine hacmi kadar % 96'lık etil alkol eklenir ve yavaşça altüst edilerek DNA'nın üste çıkması sağlanır, üste çıkan DNA'lar pipet ucu ile 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µl %70'lik etil alkol eklenir. Tüpler 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek DNA'Ların tüpün dibine yapışması sağlanır. Bu işlem 3 kez tekrarlanır. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde dökülür. Daha sonra, tüplerin dibine yapışmış olan DNA'ların kuruması için tüpler ters çevrilerek bırakılır. DNA'lar kuruduktan sonra üzerlerine bir miktar distile su eklenir. Bir gün +4 °C'de bekletilerek çözdürülür ve -20 °C'lik derin dondurucuya kaldırılır.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen spesifik bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi için kullanılan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği istenilen gen bölgelerinin primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Bu teknik, temel moleküler biyolojik araştırmalarda ve tanısı DNA temeline dayalı olan birçok hastalık için günümüzde en çok tercih edilen tekniklerden birisidir. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın iki zincirlerinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon) daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını, sonra zincirin uzamasını ve bu aşamaların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. (Temizkan G ve Arda N, 2004, Akar N 1999). MEF2A gen bölgelerinin çoğaltılması Quanta Biotech PZR cihazı ile yapıldı.

3.4.1. Primer tasarımı ve kullanılan primerler

Primerler, literatürde MEF2A geninin 7. 11. ekzomunda tespit edilen mutasyonları tanımlayacak şekilde <http://workbenc.sdsc.edu> adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlandı. Bu çalışmada MEF2A gen bölgesine ait 2 çift primer takımı kullanılmıştır.

Tablo 3.1. MEF2A gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PZR ürün büyüklükleri

Ekzon 7	280 bç
MEF2A- 7F	5'-GTTTGTGCCAAAGTATTTTAA-3'
MEF2A- 7R	5'-AAGAATGAAGTTGAAGAAAGG-3'

Ekzon 11	256 bç
MEF2A- 11F	5'-ATCAGCATCAAGTCCGAACC-3'
MEF2A- 11R	5'-GCCAAGCACAATTGGAGAAT-3'

3.4.2. Primerlere göre PZR karışımının hazırlanması ve PZR reaksiyon koşulları

MEF2A geninin 7. ve 11. ekzonundaki hedef bölgeleri çoğaltabilmek için tasarlanan primer çiftlerinin en iyi çalışabilecekleri sıcaklıklarını ve reaksiyon koşullarını tespit etmek için öncelikle gradient PZR yapıldı.

3.4.2.1. PZR karışımının hazırlanması

MEF2A geninin 7. ve 11. ekzonu için reaksiyon karışımı her bir örnek için toplam 20µl olacak şekilde hazırlandı.

dH ₂ O	6,585 µl
10x Tampon	1 µl
mgCl ₂	0,5 µl
dNTP(10mM)	0,7 µl
İleri Primer	0,08 µl
Geri Primer	0,08 µl
Tag Polimeraz Enzimi	0,055 µl

Her bir tüpe 1 µl DNA ilave edildi.

3.4.2.2. PZR koşulları

95° C’de ilk denatürasyon.....	5 dk
95° C’de denatürasyon.....	15 sn
7. Ekzon 45,5 °C, 11. Ekzon 56,3 °C.....	20 sn
72° C’de uzama.....	15 sn
72° C’de son uzama.....	3 dk

Bu koşullara göre MEF2A geninin hedef bölgeleri çoğaltıldı.

3.5. Elektroforez

Elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel bir alandaki hareketlerinin izlendiği elektroforetik bir yöntemdir. PZR yöntemi ile çoğaltılan DNA parçalarının elektrik yüklerinin kitlelere oranıyla belirlenen hızlarda, elektriksel alanda negatif kutuptan pozitif kutba hareket etmeleri prensibine dayanır. Bu sistemde analizi yapılacak DNA parçası (PZR ürünü) bit destek ortamına uygulanır. Elektroforetik tekniklerde destek ortamı olarak daha çok jeller tercih edilmektedir. Bu tezde elektroforetik tekniklerden agaroz jel elektroforezi ve SSCP tekniği kullanıldı.

3.5.1. Agaroz jel elektroforezi

Bir algden elde edilen agaroz, galaktopiranoz türevlerinin doğrusal bir polimeridir. Agaroz jel elektroforezi 200–50.000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan kolay ve etkili bir metottur. Jel, elektroforez tamponuna konulmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır.

Bu çalışmada MEF2A geninin 7. ve 11. ekzonunun PZR ürünleri % 2’lik agaroz jel elektroforezine uygulanarak amplifikasyon (çoğalma) ve kontaminasyon (ekstra DNA parçalarının buluşması) açısından kontrol edildi.

3.5.2. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

50 x TAE Tamponu

Tris base.....	24,2 gr
Glasiel Asetik Asit.....	5,71 ml
0,5 M EDTA (pH 8).....	10 ml
dH ₂ O.....	100 ml’ye tamamlanır.

1 x TAE Tamponu

10 x TAE tamponu.....100 ml
dH₂O.....900 ml

Agaroz Jel'in Hazırlanması (% 2)

Agaroz2 gr
1 x TAE.....100 ml

Hazırlanan agaroz jel 2,5 dakika mikrodalga fırında eritilir. Jelin ısı 50 °C–60 °C'ye düşüncü 2 µl EtBr ilave edilir. EtBr kanserojen bir madde olduğundan jel dökme işlemi çeker ocakta gerçekleştirilir ve jel elektroforez tankına dökülürken hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir. Jel döküldükten sonra 15-20 dakika polimerizasyon için bekletilir.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

6X yükleme boyası.....2,5 µl
PZR ürünü DNA.....3 µl

PZR ile çoğaltılan bölgenin büyüklüğünü tespit etmek ve doğru bölgenin çoğaldığına karar verebilmek için 100–1000 bp'lik DNA moleküler ağırlık belirleyicisi kullanıldı.

Örneklerin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Örnekler jelde 125 volt (V)'da 30 dakika yürütülür, UV altında görüntülenir ve fotoğrafı çekilir.

3.6. SSCP Yöntemi

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm (Single strand conformational polymorphism, SSCP), bilinmeyen mutasyonların saptanması için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı ucuz, kolay duyarlı ve güvenilir bir tarama yöntemidir. (Jordana ve ark 1997, Kukita ve ark 1997, Hayashi 1992). Bu yöntem nokta mutasyonları, küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının saptanmasında tercih edilmektedir. Özellikle gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacı ile genin taramasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir ve altın standart olan DNA dizi analizine iyi bir alternatiftir.

Bu yöntem ile mutasyon saptama oranı % 80 ile % 90 arasında değişmektedir (Sheffield ve ark 1993). Bu yöntem ile tek bir nükleotid farklılığı dahi belirlenebilmektedir. (Orita ve ark 1989).

Bu metodun prensibi, tek iplikcik haline gelen DNA'ların şekil ve büyüklüğüne bağlı olarak, denatüre edici olmayan poliakralid jel içerisindeki elektroforetik hareketi oluşturmaktadır. (Kukita ve ark 1997 , Orita ve ark 1989). Denatüre edilerek tek zincir haline getirilmiş DNA'lar zincir içi zayıf bağlarla ikincil yapılarını kazanırlar. İkincil yapıdaki şekilsel değişiklik o bölgenin elektroforezdeki hareketinde normal kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığa neden olur (Humpries ve ark 1997, Sinici ve Özkara 2003).

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ve gliserol konsantrasyonu, denatüren ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PZR ürünlerinin denatürasyon yöntemi, mutasyon tipi ve bulunduğu yer performansı etkiler (Nollau ve Waganer 1997). Optimal koşullar sağlandığında elektroforetik hızı tek zincirli nükleik asitlerin büyüklükleri ve dizileri etkiler (Sheffield ve ark 1993). SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150–250 bp aralığında olduğu zaman elde edilir (Humpries ve ark 1997

3.6.1. SSCP yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

10 x TBE Tamponu

EDTA... ..9,37 gr

Tris base.....108 gr

Barik asit.....55 gr

Toplam hacim 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

1 x TBE Tamponu

10 x TBE tamponu.....100 ml

dH₂O900 ml

Durdurma Çözeltisi (% 10)

Asetik asit.....10 ml

dH₂O ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Boyama Çözeltisi (% 0,12)

Gümüş nitrat.....0,3 gr
dH₂O ile250 ml'ye tamamlanır, 0,9 ml formaldehit eklenir.

Renk Geliştirme Çözeltisi

% 3,4 Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat)

Sodyum karbonat.....8,5 gr
dH₂O ile250 ml'ye tamamlanır.
Soğuması için derin dondurucuya kaldırılır. Kullanmadan hemen önce;
Sodyum Tiyosülfat.....200 µl
Formaldehit.....0,9 µl eklendi.

% 10 APS

APS.....0,035 gr
dH₂O.....250 µl

%30'luk Akrilamid Stok (100 ml) (29:1)

Akrilamid.....29 gr
Bisakrilamid..... 1 gr
dH₂O içinde çözülerek wattman 3MM'de süzülür.

Kullanım için % 12,5'lik akrilamid

% 30 akrilamid stok.....15 ml
10 x TBE.....5 ml
dH₂O.....30 ml
TEMED.....35 µl
% 10 APS350 ml
eklenerek hepsi karıştırıcıda karıştıktan sonra dökülür.

SSCP Tamponu

Ksilen siyanol.....0.025 gr
Bromfenol mavisi.....0.025 gr
Formamid.....8 ml
dH₂O.....2 ml

3.6.2. SSCP'nin yapılışı

Camların Hazırlanması

İlk önce U şekilli ve dikdörtgen şekilli her iki camın iki tarafıda % 70'lik alkolle gazlı bez alınarak silindi. Daha sonra % 96'lık alkol kullanılarak hav bırakmayan peçete ile sadece jelin döküleceği kısım silindi. Camların kenarına aralık oluşturacak şekilde plastik ayıraçlar (spacer) yerleştirildi. Jelin akmasını önlemek için camların alt ve üst kısımlarının düzgün olmasına dikkat edildi. Camlar elektroforez tankının düğmeleri ile iyice sıkıştırıldıktan sonra jel dökülme aparatına yerleştirildi.

Jelin Hazırlanması

Jel karışımı 250 ml'lik beher içerisinde. 29:1 akrilamid: bisakrilamid oranında hazırlandı. Jel karışımı, 15 ml %30'luk stok akrilamid çözeltisi, 5 ml 10 x TBE, 30 ml dH₂O şeklinde hazırlandı ve iyice çözünmesi sağlandı. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan karışıma burada % 10 APS'den 350 µl ve 35 µl TEMED eklendi. Birkaç saniye karışması beklendikten sonra 50 cc'lik enjektör yardımıyla yavaşça hava kabarcığı olmayacak şekilde iki cam arasına döküldü. Kuyuların oluşturulması için tarak takıldı ve polimerleşmenin olması için 45 dakika beklendi.

Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi

Jel polimerize olduktan sonra jel dökme aparatından çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi. Tarak çıkarıldı, elektroforezin orta kısmına ve diğer kısımlarına 1x TBE konuldu ve kuyular enjektör yardımıyla 1xTBE ile yıkandı. Daha sonra pH'ın dengelenmesi için 125 voltta 30 dakika boş olarak ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin ardından, 3 µl PZR ürünü 15 µl denatüre edici tampon ile 0,5 ml'lik eppendorf tüpte karıştırılıp hazırlandı. Hazırlanan bu örnekler jele yüklenmeden önce 95 °C'de 10 dakika denatüre edildi. Denatürasyondan sonra hemen buz üzerine alındı ve birkaç dakika bekletildi.

Örneklerin Görüntülenmesi

Jelin yürümesi tamamlandıktan sonra elektroforez tankından alınan camların arasındaki plastik çubuklar çıkarıldı. Bistüri ucu ile dikkatli bir şekilde camın birbirinden ayrılması sağlandı. 500 ml % 10'luk asetik asit solüsyonu içinde 17 dakika bekletildi. Ardından 10 dakika dH₂O ile yıkandı. % 0,12'lik gümüş nitrat çözeltisi içinde 30 dakika çalkalandıktan sonra jel 5–10 saniye dH₂O içinde bekletildi. Daha sonra % 3,4'lük soğuk sodyum karbonat çözeltisinde bantlar oluşana kadar elde yavaşça çalkalandı. Bantlar görünür hale

geldikten sonra 1 dakika dH₂O içinde çalkalandı. Daha sonra 5 dakika % 10'luk asetik asit çözeltisinde, 5 dakika dH₂O içinde çalkalandıktan sonra jel iki asetat kağıdı arasına alındı ve tarayıcı kullanılarak jelin görüntüsü bilgisayara aktarıldı.

3.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 11.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Biyokimyasal veriler \pm ortalama standart sapma olarak verilmiştir. Parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması kıkare testi ile hesaplanmıştır. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Klinik Özellikleri

Kardiyoloji Anabilim Dalından ve Konya Numune Hastanesi Kardiyoloji Bölümünden 111 koroner arter hastası ve 32 kontrol grubu seçildi. Konya ve çevresinden gelen fertler her iki grubu oluşturdu. Tablo 4.1’de hasta ve kontrol grubunun klinik özellikleri verilmiştir. Koroner arter hastalarının ortalama yaşı 55’dir.

Tablo 4.1. Koroner arter hastaları ve kontrol gruplarının klinik özellikleri

		KAH	Kontrol Grubu	P değeri
Cinsiyet		111 (97\13)	32 (14\18)	< 0.05
Yaş		54.97±7.218	65.12±6.772	< 0.05
LDL Kolesterol (mg\dl)		105.15±35.14	106.63±36.12	> 0.05
HDL Kolesterol (mg\dl)		39.66±10.02	44.03±13.60	> 0.05
TK (mg\dl)		172.75±39.80	170.55±40.23	> 0.05
TG (mg\dl)		151.03±90.96	122.48±58.67	> 0.05
Hipertansiyon (%)		39.4	43.8	> 0.05
Diyabet (%)		19.3	12.5	> 0.05
Sigara (%)				< 0.05
	Şimdi	29.1	12.5	
	Geçmişte	52.7	31.3	
	Hiç	18.2	56.3	
Anjiografi > 70 % darlık (%)		100	0	< 0.05
Bypass (%)		28.2	0	< 0.05
PTCA (%)		49.1	0	< 0.05
Mİ (%)		70.6	0	< 0.05

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

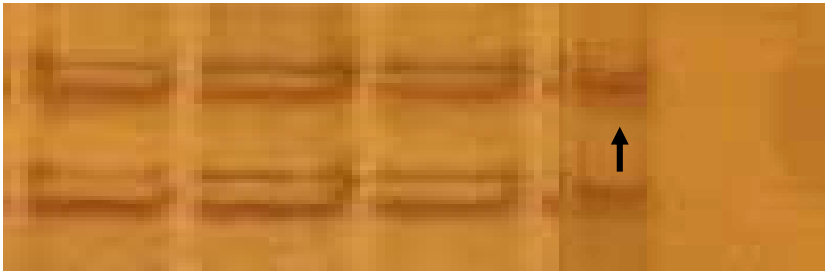
4.2. MEF2A Gençokuyapılılığının Belirlenmesi

MEF2A geninin 7. ekzonunun kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinin 111 koroner arter hastası ve 32 kontrol bireyinde PZR-SSCP yöntemi ile analiz edilmesi sonucunda, sadece kontrol grubunda bir bireyde nükleotid değişimi gözlenmiştir. Bu nükleotid değişimine dizi analizi yapıldığında, bu değişikliğin sessiz (silence) mutasyon olduğu bulunmuştur. Bulunan mutasyonun sıklığı tablo 4.2’de verilmiştir.

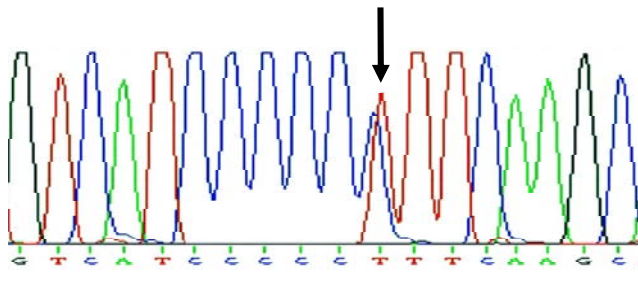
Kodon 279’daki CCT→CTT (Pro→Leu) gençokuyapılılığı koroner arter hastalarının 0/111’inde (% 0), kontrol bireylerinin 1/32’sinde (% 2,7) belirlenmiştir (Şekil 4.1). Kontrol grubundaki birey bu aminoasit değişimi açısından heterozigottu.

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda Pro279Leu görülme sıklığı

Genotip	Hasta (111)	Kontrol (32)	P değeri
279 Pro\Leu	0 (% 0)	1 (% 2.7)	> 0.05



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol bireylerinin tek zincirli DNA'larına ait göç profilleri



Şekil 4.2. Heterozigot Pro279Leu mutasyonuna sahip bireyin DNA dizi analizi grafiği

Pro279Leu sessiz mutasyonu açısından koroner arter hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir farklılık yoktu. ($p>0,05$). Kodon 279'deki gençokuyapılılığı diğer toplumlarda yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Gonzales ve ark 2006).

MEF2A geninin 11. ekzonunun kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri, 111 koroner arter hastası ve 32 kontrol bireyinde PZR-SSCP yöntemi ile tarandı. Bu tarama sonucunda 2 farklı değişiklik bulundu. Bu değişiklikten biri, hasta ve kontrol grubunda sayıları 6 ile 11 arasında değişen CAG (Glutamin) tekrarlarıdır. Bu glutamin tekrarlarının dağılımı tablo 4.3’de verilmiştir. Diğer değişiklik ise 1767. nükleotitte G→T değişikliğidir. Bu değişime sahip bireylerin DNA’larına dizi analizi yapıldığında, bu değişikliğin tek nükleotid gençokypılılığı (SNP rs:325400) olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol bireylerinde CAG (Glutamin, Q)_n tekrarlarının dağılımı

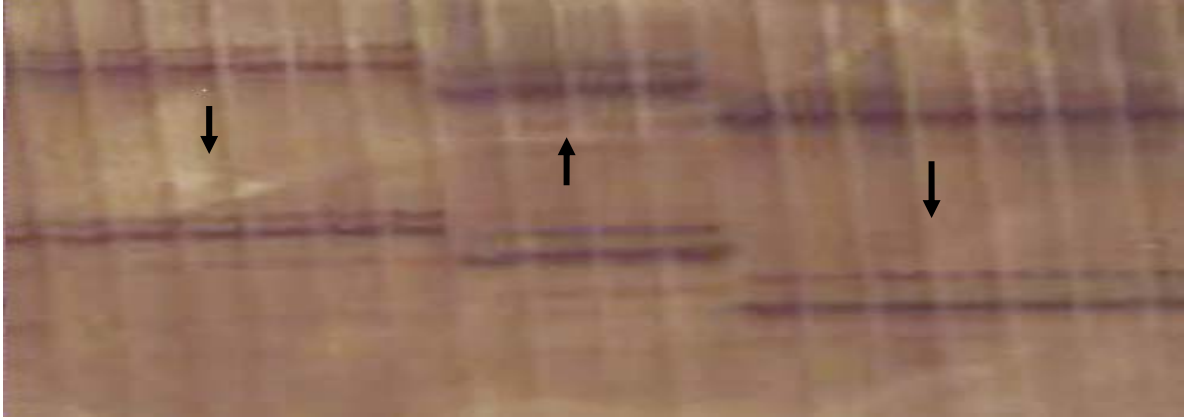
	Q ₆ /Q ₉	Q ₆ /Q ₁₁	Q ₇ /Q ₁₀	Q ₉ /Q ₉	Q ₉ /Q ₁₀	Q ₉ /Q ₁₁	Q ₁₀ /Q ₁₀	Q ₁₀ /Q ₁₁	Q ₁₁ /Q ₁₁
Hasta (%) (111)	3 (% 2,7)	1 (% 0,9)	0 (% 0,0)	16 (% 14,4)	4 (% 3,6)	34 (% 30,6)	1 (% 0,9)	7 (% 6,3)	45 (% 40,5)
Kontrol(%) (32)	1 (% 3,1)	0 (% 0,0)	1 (% 3,1)	0 (% 0,0)	3 (% 9,4)	8 (% 25,0)	0 (% 0,0)	3 (% 9,4)	16 (% 50,0)

MEF2A geninin 11. ekzonunda CAG (Glutamin) tekrarları açısından; 111 hastanın 3’ü (%2,7) ve 32 kontrol bireyinin 1’inde (% 3,1) Q₆/Q₉, 111 hastanın 1’inde (% 0,9) Q₆/Q₁₁, 32 kontrol bireyinin 1’inde Q₇/Q₁₀, 111 hastanın 16’sında (% 14,4) Q₉/Q₉ 111 hastanın 4’ünde (%3,6) ve 32 kontrol bireyinin 3’ünde (% 9,4) Q₉/Q₁₀, 111 hastanın 34’ünde (%30,6) ve kontrol bireylerinin 8’inde (% 25) Q₉/Q₁₁, 111 hastanın 1’inde (% 0,9) Q₁₀/Q₁₀, 111 hastanın 7’sinde (% 6,3) ve 32 kontrol bireyinin 3’ünde (% 9,4) Q₁₀/Q₁₁, 111 hastanın 45’inde (% 40,5) ve 32 kontrol bireyinin 16’sında (% 50) Q₁₁/Q₁₁, belirlenmiştir (Şekil 4.4). MEF2A geninin 11. ekzonundaki bu glutamin tekrarlarının farklı sayılarda olması, diğer toplumlarda da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gonzales ve ark 2006, Akar ve ark 2006).

Sessiz mutasyon olan (G451G) 1767. nükleotitteki G/G genotipi, 111 hastanın 26’ında (% 23,4) ve 32 kontrol bireyinin 5’inde (% 15,6), 1767 G/T genotipi 111 hastanın 42’sinde (% 37,8) ve 32 kontrol bireyinin 23’ünde (% 71,9), 1767 T/T genotipi 111 hastanın 43’ünde (% 38,7) ve 32 kontrol bireyinin 4’ünde (%12,8) gözlemlenmiştir. Bu gençokypılılığının sıklığı tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Hasta ve kontrol bireylerinde G451G (1767 G→T) değişikliğinin görölme sıklığı

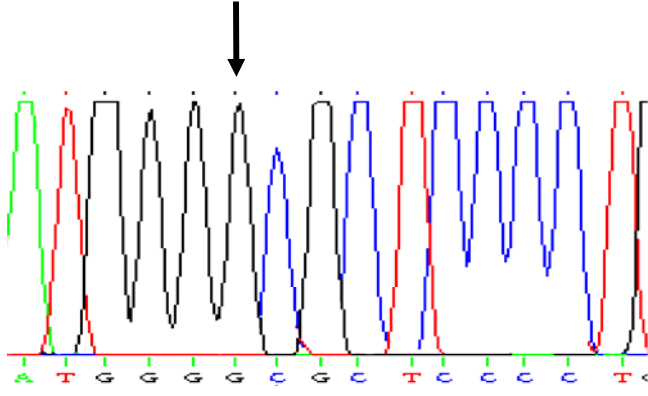
	1767 G/G	1767 G/T	1767 T/T
Hasta (%) (111)	25 (% 23,4)	40 (% 37,8)	42 (% 38,7)
Kontrol (%) (32)	6 (% 15,6)	22 (% 71,9)	4 (% 12,5)



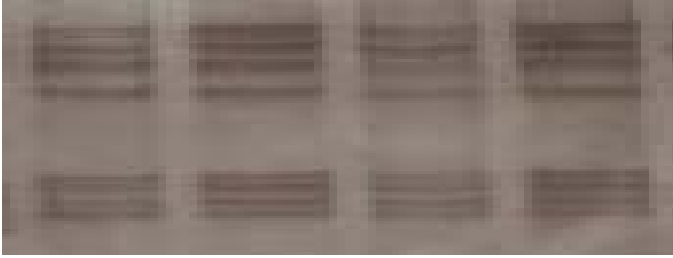
Şekil 4.3. Farklı CAG tekrarlarına sahip hasta ve kontrol bireyleri tek zincirli DNA'larına ait poliakrilamid jel görüntülerinde oklar farklı tekrar sayılarına (9,10 ve 11 CAG) sahip bireyleri gösteriyor.



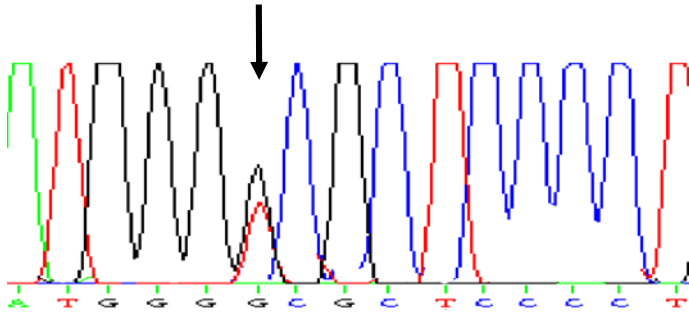
Şekil 4.4. 11 CAG tekrarına ve 1767 G/G genotipli hasta ve kontrol bireylerine ait poliakrilamid jel görüntüleri.



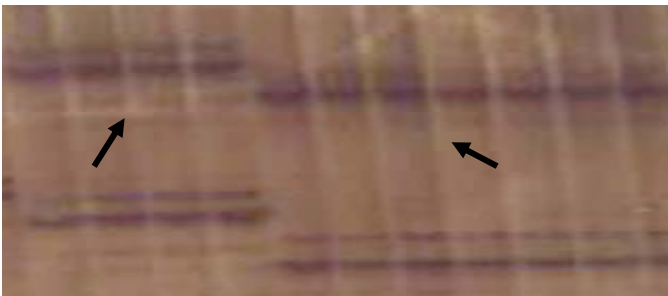
Şekil 4.5. 1767 G/G genotipine sahip hasta ve kontrol bireylerinin DNA dizi analizi grafiği.



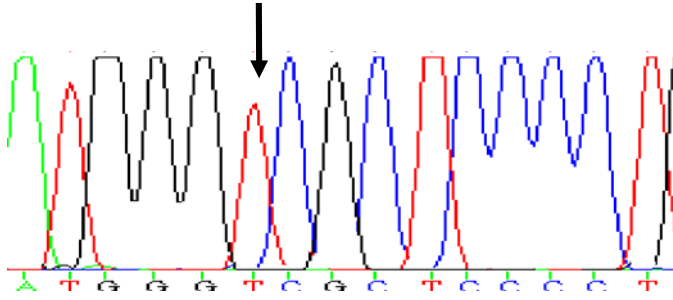
Şekil 4.6. 11 CAG tekrarı ve 1767 G/T genotipine sahip bireylerin poliakrilamid jel görüntüleri.



Şekil 4.7. 1767 G/T genotipli bireylere ait DNA dizi analizi grafiği.



Şekil 4.8. 9 ve 11 CAG tekrarlarına ve 1767 T/T genotipli bireylerin tek zincirli DNA'larının göç profilleri.



Şekil 4.9. 1767 T/T genotipli bireylere ait DNA dizi analizi grafiği. Ok 1767 G→T değişimi göstermektedir.

4.3. MEF2A gençokyapılılığına sahip fertlerin klinik özellikleri

MEF2A gençokyapılılığının (1767 G/G, 1767 G/T ve 1767 T/T) fertler üzerindeki etkisi bazı klinik parametreler ile analiz edildi. Sonuçlar tablo 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. MEF2A gençokyapılılığına sahip hasta ve kontrol grubunun bireyleri ile gençokyapılılığına sahip olmayan hasta ve kontrol grubunun bireyleri arasında klinik özellikler açısından istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır.

Bu gençokyapılılıkların herhangi birisinin varlığında LDL, TG ve TK seviyelerinin ortalama değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.5. MEF2A gençokyapılılığı olan fertlerin klinik özellikleri

Koroner Arter Hastaları	1767 G/G	1767 G/T	1767 T/T
n	26	42	43
Cinsiyet	1.51±0.50	1.12±0.33	1.14±0.35
Yaş	55.00±7.37	53.50±7.47	56.21±7.09
LDL Kolesterol (mg\dl)	109.27±34.58	102.34±35.48	106.27±36.19
HDL Kolesterol (mg\dl)	40.00±7.88	39.52±11.39	39.35±10.19
TK (mg\dl)	175.08±38.60	169.00±38.68	177.07±41.59
TG (mg\dl)	151.08±109.22	147.60±85.90	162.05±85.43
Hipertansiyon	1.62±0.49	1.55±0.50	1.58±0.49
Diyabet	1.83±0.38	1.76±0.43	1.85±0.42
Sigara	1.79±0.50	1.90±0.70	1.95±0.73
Bypass	1.54±0.50	1.90±0.30	1.66±0.47
PTCA	1.45±0.50	1.45±0.50	1.59±0.49
MI	1.25±0.44	1.27±0.45	1.31±0.47

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 4.6. MEF2A gençokuyapılılığı olan fertlerin klinik 6zellikleri

Kontrol Grubu	1767 G/G	1767 G/T	1767 T/T
n	5	23	4
Cinsiyet	1.50±0.54	1.59±0.50	1.50±0.57
Yaş	62.33±7.91	65.63±6.68	66.75±5.73
LDL Kolesterol (mg\dl)	123.32±45.59	109.24±34.88	92.45±29.95
HDL Kolesterol (mg\dl)	37.20±11.16	44.72±11.36	49.25±24.66
TK (mg\dl)	188.40±51.98	173.45±42.41	152.50±49.07
TG (mg\dl)	188.00±51.98	122.31±60.37	60.25±23.92
Hipertansiyon	1.66±0.51	1.50±0.51	1.75±0.50
Diyabet	1.83±0.40	1.90±0.29	1.75±0.50
Sigara	2.33±0.81	2.36±0.78	2.50±0.57
Bypass	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
PTCA	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
Mİ	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Koroner Arter Hastalığı ve onun en önemli komplikasyonu olan Miyokard İnfarktüsü (Mİ), genetik ve çevresel faktörlerin birbirlerini etkilemesi sonucu oluşan multifaktöriyel hastalılardır (Vassalli ve Winkelmann 2004). KAH ve Mİ ile ilgili genetik faktörlerin ortaya çıkarılması, hastalığın patogenezi açısından önemlidir. Transkripsiyon faktörü olan MEF2A genindeki değişikliklerin, KAH'ın gelişimi ve Mİ geçirme riskinin ortaya çıkmasında önemli olduğu düşünüldüğünden, MEF2A geni KAH ve Mİ'a sebep olan ilk ve tek gen olarak bildirilmiştir (Wang ve ark 2003).

Bu çalışmada, MEF2A gençokyapılılığını belirlemek ve Türk toplumundaki koroner arter hastaları ve Mİ geçiren bireyler ile kontrol grubu bireylerinde, MEF2A genindeki değişikliklerin, KAH ve Mİ ile ilişkisi olup olmadığını belirlemek için, MEF2A geninin 7. ve 11. ekzonunun kodlanan bölgeleri PZR-SSCP tekniği ile analiz edildi. MEF2A geninin 7.ekzonunun, 1 kontrol bireyi dışındaki tüm hasta ve kontrol bireylerinde aynı genotipe sahip olduğu ve homozigotluk gösterdiği tespit edildi. Dizi analizi sonucunda bu değişikliğin missense mutasyon (Pro279Leu) olduğu belirlenmiştir. MEF2A geninin 11.ekzonunun PZR-SSCP analizi sonuçlarında ise, 11.ekzonun yüksek derecede heterojenlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Dizi analizi sonucunda, bu heterojenliğin sayıları 6 ile 11 arasında değişen glutamin (CAG) tekrarlarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca MEF2A geninin 11.ekzonunda herhangi bir aminoasit değişimine sebep olmayan G451G (1767 G→T) tek nükleotid polimorfizmi (SNP, rs:325400) bulunmuştur.

Farklı populasyon çalışmalarında da MEF2A geninin 7. ve 11.ekzonunda hastalıkla ilişkisi olduğu düşünülebilecek gençokyapılılıklarının tespit edilmesi amaçlı moleküler taramalar yapılmıştır (Bachinski ve ark 1997, Wang ve ark 2003, Bhagavatula ve ark 2004, Weng ve ark 2005, Kajimoto ve ark 2005, Horan ve ark 2006, Gonzales ve ark 2006, Güleç ve ark 2007).

Wang ve ark (2003) yılında yaptıkları çalışmada 13 koroner arter hastası ve 9 miyokard infarktüsü geçiren birey bulunmaktaydı. Bu aile çalışmasında, 11.ekzonda 21 bç'lik bir delesyon ile çoklu glutamin ve prolin tekrarlarına rastlanmıştır. Wang ve ark (2003) bu çalışmayı koroner arter hastalığının otozomal dominant formu olarak yayınlamışlardır.

Bu 21 bç'lik delesyon, MEF2A proteininin COOH ucunda yer aldığı için, bu delesyonun, MEF2A proteininin nüklear lokalizasyonu için önemli olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark 2003). Daha sonra koroner arter hastası ve Mİ geçiren 50 birey üzerinde yaptıkları çalışmada, 21 bç'lik delesyona rastlanmamıştır (Wang ve ark 2003). Bizim çalışmamızda da, koroner arter hastası ve Mİ geçirmiş 111 hasta ve 32 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda 21 bç'lik delesyona rastlanmamıştır.

Weng ve ark (2005) yılında yaptıkları çalışmada, 300 koroner arter hastası ve 300 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda, sadece kontrol grubunda 1 bireyde 21 bç'lik delesyonu tespit etmişlerdir ve 21 bç'lik delesyonun KAH'ın otozomal dominant formu olamayacağını belirtmişlerdir. Yine aynı ekzonda sayıları değişebilen glutamin (CAG) tekrarlarına rastlamışlar ve bu glutamin tekrarlarının hastalıkla herhangi bir ilişkisi olamayacağını belirtmişlerdir (Weng ve ark 2005).

Kajimoto ve ark (2005) yılında, 379 Mİ geçirmiş bireyler ile 584 sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada, Mİ geçirmiş 1 bireyin 11.ekzonunda sessiz mutasyon R447X (Arjinin447Dur) ile Mİ geçirmiş başka bir bireyde 21 bç'lik delesyon tespit edilmiştir. Yine aynı ekzonda, sayıları 4 ile 15 arasında değişen çoklu glutamin tekrarları ile sayıları 4 ile 5 arasında değişen prolin tekrarlarına rastlanmıştır. Japon popülasyonunda MEF2A gençokyapılılığının Mİ ile ilişkili olamayacağı rapor edilmiştir (Kajimoto ve ark 2005).

Horan ve ark (2006) yılında, 580 aileden oluşan 1494 birey üzerinde yaptıkları çalışmada, hiçbir bireyde 21 bç'lik delesyona rastlayamamışlardır. Horan ve ark (2006), İrlanda popülasyonunda, iskemik kalp hastalığının gelişiminde, MEF2A genindeki 21 bç'lik delesyonun önemli bir rol oynayamayacağını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada, bu gendeki üçlü tekrar dizilerinin de hastalıkla ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, MEF2A genindeki bu üçlü nükleotid tekrarları, ailesel kardiyomiyopati aileler üzerinde de çalışıldığında, bu tekrarların hastalığın gelişiminde herhangi bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Bachinski ve ark 1997).

Bhagavatula ve ark (2004) yılında, 207 KAH/Mİ hastası ve koroner arterleri normal 191 birey üzerinde yaptıkları çalışmada, 207 koroner arter hastasının 4'ünde, 7.ekzona ait 3 tane mutasyon tespit etmişlerdir. Bu 4 hastanın ikisinde N263S (Asparjin263Serin), birinde P279L (Prolin279Lösin), birinde de G238D (Glisin238Aspartikasıit) tespit edilmiştir. 191 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda ise herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir. Bhagavatula ve ark (2004) tarafından, 7.ekzonda tespit edilen mutasyonların, MEF2A proteininin transkripsiyon aktivasyon bölgesine çok yakın olmasından dolayı, transkripsiyonel aktiviteyi fonksiyon kaybı ile düşürdüğü ve KAH'ın daha hafif formuna yol açtıkları belirtilmiştir.

2006 yılında Gonzales ve ark. tarafından 483 KAH/Mi hastası 1189 kontrol bireyleri arasında yaptıkları çalışmada, 279L allelini taşıyan kişilerin Mİ geçirme riskinin kontrol grubuna göre 3 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Gonzales ve ark. 11.ekzonun yüksek derecede heterojenlik gösterdiğini, bu heterojenliğin de poliglutamin tekrarlarından kaynaklandığını bildirmişlerdir. İspanya populasyonunda, 279L allelinin, Mİ geçirmiş bireylerde genetik bir risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir (Gonzales ve ark 2006).

Güleç ve ark (2007) yılında, 69 erken Mİ geçirmiş bireyler ile 87 sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada, intron 8'de heterozigot 141246: A/C gençokyapılılığı, ekzon 9'da herhangi bir aminoasit değişimine sebep olmayan 141348: T/C ve 141354: G/A gençokyapılılığını, ekzon 10- intron 10 bağlanma bölgesinde herhangi bir aminoasit değişimine sebep olmayan ve Türk populasyonuna özgü olduğunu düşündükleri 145408: T/C gençokyapılılığını tespit etmişlerdir. Ekzon 11'de, herhangi bir aminoasit değişimine neden olmayan 147217: C/A gençokyapılılığı ile üç nükleotid gençokyapılılıklarını tespit etmişler ancak hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Ekzon 11'deki 21 bç'lik delesyona ve ekzon 7'deki P279L değişimine aile, hasta ve kontrol gruplarında rastlanmamıştır. Güleç ve ark. tarafından Türk populasyonunda MEF2A geninin allelik veya genotipik frekanslarının anlamlı olmadığı rapor edilmiştir. MEF2A geninin lokalize olduğu 15q26 bölgesinde (D15S120) markırına göre yaklaşık 93 genin olduğu ve hala tanımlanmamış ve fonksiyonları belli olmayan bu genlerin de KAH ve Mİ ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Altshuler ve Hirschhorn 2005).

Bizim çalışmamızda da, MEF2A geninin 7.ekzonuna ait Pro279Leu gen çökyapılılığı kontrol grubunda 1 bireyde belirlenirken, hasta grubunda belirlenmemiştir. Bu yüzden, MEF2A geninin 7.ekzonunun KAH'lığının patogenezisi ve Mİ geçirme riskinde etkili bir faktör olamayacağı düşünümüştür. Çalışmamızda, MEF2A geninin 11.ekzonunda ise herhangi bir aminoasit değişimine sebep olmayan G451G (Glisin451Glisin) gen çökyapılılığı ile sayıları 6–11 arasında glutamin (CAG) tekrarları belirlenmiştir. Diğer populasyon çalışmalarında belirlenen 21 bç'lik delesyona Türk hasta ve kontrol grubunda rastlanmamıştır. G451G gen çökyapılılığının hastalıkla bir ilişkisi olduğu düşünülmekte, fakat kontrol bireylerinin sayısı az olduğu için, kontrol bireylerinin sayısı artırılarak çalışmanın devam etmesi planlanmaktadır. Diğer populasyon çalışmalarında da belirlendiği gibi glutamin tekrarlarının hastalığın gelişimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak bu glutamin tekrarlarının 21 bç'lik delesyonlu bölgeye çok yakın olmasından dolayı, protein lokalizasyonunda herhangi bir etkisinin olup olmadığının invitro olarak araştırılması önemli olabilir.

Son yıllarda genomik ve proteomik yaklaşımlar KAH ve Mİ ile ilişkili genleri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. KAH ile bağlantılı olduğu düşünülen 49 adet gen bulunmuştur. Bu genler; intersellüler adezyon molekülü-2, fusin, B-hücre aktivatörü (BL34, GOS8), RhoGTPaz aktive edici protein-4, retinoik asit reseptör cevaplayıcı, APOA5 (apolipoprotein A5), MTHRF (Metilentetrahidrofolat Redüktaz), ACE (anjiotensin dönüştürücü enzim), protrombin mutasyonları, FVL (faktör 5 leiden) ve diğerleridir. Bu genlerin Türk populasyonunda görülme sıklığının da belirlenmesi, KAH'ın patogenezisi ve Mİ geçirme riski açısından önemli olabilir.

MEF2A geni ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmamızın, diğer populasyon çalışmaları ile benzer sonuçları vermesinden dolayı, MEF2A geninin KAH ve Mİ ile olan ilişkisinin tam olarak açıklığa kavuşturulabilmesi için daha fazla sayıda bireylerle çalışmaların yapılması önemli olabilir.

6. ÖZET

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA - 2008

NİLAY ERSÖZ

Transkripsiyon Faktörü MEF2A Gen Mutasyonlarının Türk Toplumundaki Koroner Arter Hastalarında Taranması

Koroner arter hastalığı ve onun en önemli komplikasyonu olan miyokard infarktüsü tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en önemli ölüm nedeni olarak gösterilmektedir. Koroner arter hastalığı, genetik ve çevresel faktörlerin birbirlerini etkilemesi sonucu oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Koroner arter hastalığı ve en önemli komplikasyonu olan miyokard infarktüsüne sebep olduğu düşünülen ilk ve tek gen miyosite spesifik enhanser faktör 2 A (MEF2A) genidir. Bu gen, kasa spesifik gen olarak tanımlanan ve daha sonra koroner arter endotelinde de yüksek oranda ifade edildiği tespit edilen MEF2 gen ailesinin bir üyesidir. MEF2A geni, kasa spesifik ve büyüme faktörlerini teşvik eden genlerin kontrol bölgelerinde bulunan adenin ve timin nükleotitlerinden zengin hedef dizilere bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu çalışmada, koroner arter hastaları ve miyokard infarktüsü geçiren hasta bireyler ile kontrol bireylerinde, MEF2A gençokuyapılılığının görülme sıklığını belirledik ve bu gençokuyapılılıkların koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsü ile ilişkisini tespit ettik. Çalışma grupları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı ve Konya Numune Hastanesi Kardiyoloji Bölümünün hastalarından seçildi. Çalışmaya yaşları birbiriyle uyumlu, koroner anjiyografi yapılmış, koroner arterlerinde % 70 ve üzerinde darlık saptanıp KAH teşhisi konan ve Mİ geçirmiş 111 hasta ile koroner arterleri normal, ailesinde KAH olmayan, 32 sağlıklı birey olarak alındı. MEF2A geninin, 7. ve 11. ekzonunun nükleotid dizileri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve tek zincirli konformasyonel polimorfizmi (SSCP) ile tarandı. Farklı göç profili gösteren örnekler dizi analizine gönderildi.

MEF2A geninde, bir missense (Pro279Ser), bir sessiz (Gly451Gly) ve sayıları 6 ile 11 arasında değişen glutamin (CAG) tekrarları bulundu. MEF2A geninin 7. ekzonuna ait Pro279Ser mutasyonu kontrol grubunda sadece 1 bireyde bulunmuştur. MEF2A geninin 7.ekzonunun koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsü ile ilgili anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. MEF2A geninin 11.ekzonunda tespit edilen glutamin tekrarlarının da hastalık ile bir ilişkisi olmadığı, fakat G451G gen çökyapılılığının hastalık ile bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

7. SUMMARY

Nilay ERSÖZ

Screening of Transcription Factor MEF2A Gene Mutations in Patients with Coronary Artery Disease

Coronary Artery disease and its most significant complication which is myocardial infarction; is remarkably shown the major reason of the deaths in all of the world and also in our country as well. Coronary artery disease is a multifactorial disease that occurs with the result of genetic and environmental factors' interaction. The first and sole gene which is myocyte specific enhancer factor (MEF2A) gene is also commonly thought that the reason of coronary artery disease and the most important complication of it which is myocardial infarction. This gene defines to the muscle as specific gene and then is the member of MEF2 gene family which is expressed in the coronary artery endothelium with the high ratio by the fixations. MEF2A gene makes active the transcription by binding from the adenine and thymine nucleotides that are founded in the control areas of the genes that urge the specific and growth factors to the muscle, towards the rich target sequences. In this study we determined the frequency of MEF2A mutations appearing's on coronary artery and myocardial infarction sufferer's and control individuals besides of this we also fix that the relation between these young mutations with coronary artery and myocardial infarction. Studying groups was chosen from Selçuk University Meram Medicine Faculty Department of Cardiology and Konya Numune Hospital Department of Cardiology's patients.

In the human activity; 111 sick persons that their ages are close to each other and compatible in terms of our criteria with their complete coronary angiography and also whose coronary artery's are narrow more than %70 and KAH has been identified, MI experienced 111 persons was considered and analysed with 32 sick persons that their coronary artery's normal, not included KAH in their family. Nucleotide sequences of 7. and 11. exon of the MEF2A gene was multiplied with polymerase chain reaction and scanned with single strand conformational polymorphism (SSCP). The examples which are including different migration profiles sent to the sequence analysis.

In the MEF2A Gene, 1 missense (Pro279Ser), 1 silent (Gly451Gly) and Glutamin (CAG)repetitions was found whose numbers change between 6 and 11. Pro 279Ser Mutation that belongs to 7. exon of MEF2A gene was fix just one individual of the control groups. According to the fixation; there couldn't be found any relation between 7. exon of the MEF2A gene, coronary artery and myocardium infarct. According to the results; These are thought that, Glutamin repetitions which are fixed in the 11. exon of MEF2A have no relations with the disease, but G451G young intensiveness has relations with the disease.

8. KAYNAKLAR

- Altshuler D and Hirschhorn JN (2005)** *MEF2A* sequence variant and coronary artery disease. *A change of haert?* J. Clin. Invest. 115, 831–833
- Andres V, Cervera M, Mahdavi V (1995)** *Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints*, The Journal of Biological Chemistry, 270, 23246–23249
- Andres V, Fisher S, Wearsch P and Walsh K (1995)** *Regulation of gax homeobox gene transcription by a combination of positive factors including myocyte-specific enhancer factor 2*, Molecular and Cellular Biology, 15, 4272–4281
- Bachinski LL, Abchee A, Durand JB, Roberts R, Krahe R and Hobson GM (1997)** *Polymorphic trinucleotide repeat in the MEF2A gene at 15q26 is not expanded in familial cardiomyopathies*, Molecular and Cellular Probes, 11, 55–58
- Baylies MK and Bate M (1996)** *twist: a myogenic switch in Drosophila*, Science, 272, 1449–1450
- Bhagavatula MR, Fan C, Shen GQ, Cassano J, Plow EF, Topol EJ et al (2004)** *Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease*, Human Molecular Genetics, 13, 3181–3188
- Black BI and Olson EN (1998)** *Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins*, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 14, 167–196
- Black BL, Lu J, Olson EN (1997)** *The MEF2A 3' untranslated region functions as a cis-acting translational repressor*, Molecular and Cellular Biology, 17, 2756–2763
- Breitbart RE, Liang C, Smoot LB, Laheru DA, Mahdavi V and Bernardo NG (1993)** *A furth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is early marker of the myogenic lineage*, Development, 118, 1095–1106
- Brennan TJ, Chakkaborty T and Olson EN (1991)** *Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis*, 88, 5675–5679
- Chambers AE, Kotecha S, Towers N and Mohun TJ (1992)** *Muscle-specific expression of SRF-related genes in the early embryo of Xenopus laevis*, The EMBO Journal, 11, 4981–4991
- Cox DM, Du M, Marback M, Yang EC, Chan J, Siu KW, McDermott JC (2003)** *Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A*, The Journal of Biological Chemistry, 17, 15297–15303

- Crawford MH (2004)** Atherosclerosis and prevention, Cardiology, Spain
- Davis RL and Weintraub H (1992)** *Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12*, Science, 256, 1027–1030
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB and Weintraub H (1990)** *The MyoD DNA binding domains contains a recognition code for muscle-specific gene activation*, 60, 733–746
- Dodou E, Sparrow DB, Mohun T, Treisman R (1995)** *MEF2 proteins, including MEF2A, are expressed in both muscle and non-muscle cells*, Nucleic Acids Research, 23, 4267–4274
- Gonzales P, Castro MG, Reguero JR, Batalla A, Ordonez AG, Palop RL, Lozano I, Montes M, Alvarez V and Coto E (2006)** *The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction*, Journal of medical Genetics, 43, 167–169
- Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA and Olson EN (1989)** *A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes*, Molecular and Cellular Biology, 11, 5022–5033
- Gök H (1996)** İskemik Kalp Hastalıkları, Klinik Kardiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 97-172
- Güleç S, Akar AR, Akar N (2007)** MEF2A Sequence Variants in Turkish Population, 26.
- Hayashi K (1991)** *PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*, Genome, 1, 34–38
- Hayashi K (1992)** *PCR-SSCP: A method for detection of mutations*, Gata, 9, 73–79
- Hobson GM, Krahe R, Garcia E, Siciliano MJ, Funanage VL (1995)** *Regional chromosomal assignments for four members of the MADS domain transcription enhancer factor 2 (MEF2) gene family to human chromosomes 15q26, 19p12, 5q14 and 1q12-q2*, Genomics, 29, 704–711
- Horan PG, Allen AR, Hughes AE, Patterson CC, Spence M, McGlinchey PG et al (2006)** *Lack of MEF2A $\Delta 7aa$ mutation in Irish families with early onset ischaemic heart disease, a family based study*, BMC Medical Genetics, 7:65
- <http://www.espasy.org>
- Huang K, Louis JM, Donaldson L, Lim F, Sharrocks AD, Clore GM (2000)** *Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors*, The EMBO Journal, 19, 2615-2628

- Humphries SE, Gudnason V, Whittall R and I an NM (1997)** *Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia*, *Clinical Chemistry*, 43, 427–435
- Hurst JW (1990)** Atherosclerotic coronary heart disease, factors influencing atherogenesis, *The Heart*, America
- Iida K, Hidaka K, Takeuchi M, Nakayama Mi Yutani C, mukai T and Morisaki T (1999)** *Expression of MEF2 genes during human cardiac development*, *J.Exp.Med.* 187,15–23
- Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X et al (1997)** *SSCP analysis: A blind sensitivity trial*, *Human Mutation*, 10, 65–70
- Kajimoto K, Shioji K, Tago N, Tomoike H, Nonogi H, Goto Y et al (2005)** *Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients*, *Circ J*, 69, 1192–1195
- Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B and Mahdavi V (1994)** *Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD*, *Science*, 266, 1236–1240
- Kukita Y, Tahira T, Sommer SS and Hayashi K (1997)** *SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel*, *Human Mutation*, 10, 400–407
- Leifer D, Krainc D, Yu YT, McDermott J, Breitbart RE, Heng J et al (1993)** *MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution cerebral cortex*, *Proc Natl Acad Sci*, 90, 1546–1550
- Mao Z, Bonni A, Xia F, Vicens MN, Greenberg ME (1999)** *Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2*, *Science*, 286, 785–790
- Martin JF, Schwarz JJ and Olson EN (1993)** *Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: A tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5282–5286
- McDermott MC, Cardoso MC, Yu YT, Andres V, Leifer D, Krainc D et al (1993)** *hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors*, *Molecular and Cellular Biology*, 13, 2567–2577
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF and Olson EN (1995)** *Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins*, *Cell*, 83, 1125–1136
- Naidu PS, Ludolph DC, To RO, Hinterberger TJ and Konieczny SF (1995)** *Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis*, *Molecular and Cellular Biology*, 15, 2707–2718

- Naya FJ and Olson E (1999)** *MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation*, 11, 683–698
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T (1989)** *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*, Proc Natl Acad Sci, 86, 2766–2770
- Ornatsky and McDermott (1996)** *MEF2 protein expression, DNA binding specificity and complex composition and transcriptional activity in muscle and non-muscle cells*, The Journal of Biological Chemistry, 271, 24927–24933
- Ornatsky O, Cox DM, Tangirala P, Andreucci JJ, Quinn ZA, Wrana JL, Prywes R, Yu YT and McDermott JC (1999)** *Post-translational control of the MEF2A transcriptional regulatory protein*, Nucleic Acids Research, 27, 2646–2654
- Pollock R and Treisman R (1991)** *Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets*, Genes&Development, 5- 2327–2341
- Santelli E and Richmond TJ (2000)** *Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1,5 Å resolution*, 297, 437–449
- Shore P and Sharrocks AD (1995)** *The MADS-box family transcription factors*, Eur J Biochem, 1, 1–13
- Sinici İ ve Özkara HA (2001)** *SSCP analizinde çift iplikli DNA polimorfizmi*, Türk Biyokimya Dergisi, 26,135–142
- Suzuki E, Lowry J, Sonoda G, Testa JR, Walsh K (1996)** *Structures and chromosomal locations of the human MEF2A gene and a pseudogene MEF2AP*, Cytogenet Cell Genet, 73, 244–249
- Stephens JW and Humpries SE (2003)** *The molecular genetics of cardiovascular disease:clinical implications*, Journal of Internal Medicine, 253, 120-127
- Temizkan G, Arda N (2004)** *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Temizkan ve ark Ed.ler, Biyogem Yay No: 2, Nobel Tıp kitabevi
- Topol EJ (2005)** *The genomic basis of myocardial infarction*, Journal of American College of Cardiology, 46, 1456–1465
- Topol EJ, Smith J, Plow EF and Wang QK (2006)** *Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease*, Human Molecular Genetics, 15, 117–123
- Vassalli G and Winkelmann BR (2004)** *Molecular genetics of myocardial infarction: many genes, more questions than answers*, European Heart Journal, 25, 451–453

- Wackerhage H and Woods NM (2002)** *Exercise-induced signal transduction and gene regulation in skeletal muscle*, Journal of Sports Science&Medicine, 1, 103–114
- Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ and Wang Q (2003)** *Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease*, Science, 302, 1578–1580
- Wang Q (2005)** *Advances in the genetic basis of coronary artery disease*, Curr Atheroscler Rep. 7, 235–241
- Wang Q (2005)** *Molecular genetics of coronary artery disease*, Current Opinion in Cardiology, 20, 182–188
- Weng L, Kavaslar N, Ustaszewska A, Doello H, Schackwitz W, Hebert S et al (2005)** *Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease*, The Journal of clinical Investigation, 115, 1016–1020
- West AG and Sharrocks (1999)** *MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA*, J.Mol. Biol. 286, 1311–1323
- West AG, Shore P and Sharrocks AD (1997)** *DNA binding by MADS-Box transcription factors: a molecular mechanism for differential DNA bending*, Molecular and Cellular Biology, 17, 2876–2887
- Winter B, Braun T and Arnold AA (1992)** *Co-operativity of functional domains in the muscle-specific transcription factor Myf-5*, The EMBO Journal, 11, 1843–1855
- www.pubmed.omim.com
- Yamada Y (2006)** *Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke*, Cric J,70, 1240–1248
- Yang S, Galanis A and Sharrocks (1999)** *Targeting of p38 mitogen-activated kinases to MEF2 transcription factors*, Molecular and cellular Biology, 19, 4028–4038
- Yu YT (1996)** *Distinct domains of myocyte enhancer binding factor- 2A determining nuclear localization and cell type-specific transcriptional activity*, J Biol Chem, 271(40), 24675–283
- Yu YT, Breitbart RE(1992)** *Human myocyte- specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue- restricted MADS box transcription factors*, Genes Dev, 6, 1783–1798
- Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ and Han J (1999)** *Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38*, Molecular and Cellular Biology, 19, 21–30
- Zhu B and Gulick T (2004)** *Phosphorylation and alternative pre-mRNA splicing converge to regulate myocyte specific enhancer factor 2C activity*, Molecular and Cellular Biology, 24, 8264–8275

9. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Afyon'da doğdu. İlkokul öğrenimini 1988–1993 yılları arasında Atatürk İlkokulu'nda, orta öğrenimini 1993–1996 yılları arasında Şemsettin Karahisar Ortaokul'nda, lise öğrenimini 1996–1999 yılları arasında Afyon Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 2000–2004 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde sınıf birinciliği ile tamamladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

10. TEŞEKKÜR

Moleküler çalışmalarında yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Melda (Hepdođru) Aksoy' a ve Dr.Hilal Arıkoğlu'na, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı elemanlarından Arş. Gör. Said Tümer, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı elemanlarından Arş. Gör. Mustafa Soyöz, laboratuvar cihazlarını kullanmamda gösterdikleri ilgiden dolayı Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Emine Arslan ve Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi A. Kaan Karabulut'a ve Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hasan Acar'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol grubunun toplanması sırasında yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hasan Gök'e, Yrd. Doç. Dr. İlknur Can'a, Dr. Yaşar Turan'a ve Dr. Hakan Güleç'e, Konya Numune Hastanesi Kardiyoloji Bölümü'nden Dr. Alpay Arıbaş'a ve dr. Zeynep Arıbaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezım süresince manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Serkan Küçüktürk'e, aileme ve nişanlıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.