

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİYOSİT ENHANCER FAKTÖR 2A (MEF2A) GEN  
VARYANTLARININ ERKEN MİYOKARD  
İNFARKTÜSLÜ HASTALARDA İNCELENMESİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Nejat AKAR**

**Biyolog Şükrü GÜLEÇ**

**ANKARA  
2006**

Prof. Dr Nejat AKAR danışmanlığında, Şükrü GÜLEÇ tarafından hazırlanan bu çalışma...../...../.....tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Enstitüsü Anabilim Dal'ında Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Program tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nejat AKAR

İmza:

Üye : Doç. Dr. Mustafa TEKİN

İmza:

Üye : Doç. Dr. Rüçhan AKAR

İmza:

Üye : Prof. Dr. Semra ATALAY

İmza:

Üye : Prof. Dr. Nurdan TAÇYILDIZ

İmza:

**Yukarıdaki sunumu onaylarım**

**Prf. Dr. Nejat AKAR**

**Enstitü Müdürü**

# MEF2A Gen Varyantlarının Erken Miyokard İnfarktüsli Hastalarda İncelenmesi

## ÖZET

Koroner arter hastalığı ve bunun en önemli komplikasyonlarından olan miyokard infarktüsü, gelişmiş ülkeler için ölüm nedenlerindedir. Bu hastalıkla ilgili bilinen genler ve genetik risk faktörleri sınırlı sayıdadır. Bu genlerden birisi, MADS (MCM1 Agamous Deficiens Serum Response Factor) gen ailesinin bir üyesi olan MEF2 genidir. İnsan genomunda MEF2 proteinin dört üyesi; MEF2A, MEF2B, MEF2C ve MEF2D vardır. MEF2 proteini, spesifik kas gelişimiyle ilgili DNA ve promotor dizilerine bağlanır. MEF2A kromozomda 15q26 lokalize olmuştur. MEF2A mRNA'sına fare erken embriyogenez aşamasında kan damarlarında fazla miktarlarda rastlanır. Ayrıca MEF2A protein üretimine, postcoitumun 8.5 haftası dolaylarında embriyonik damar hücrelerinde rastlanmıştır. MEF2A protein sentezi, vasküler endotel büyüme faktör reseptörü 2 ve Von Willebrand faktör (endotelyal hücre markırı) üretimleriyle paralel olduğu görülmüştür. MEF2A'nın damar vasküler gelişimde bir markır ve damar morfolojisi oluşumunda etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir. MEF2 proteini N-ucunda MADS ve MEF2 domainini içerir. Bu bölge, DNA'da A/T'ce zengin baz dizilerine bağlanmadan, diğer kofaktörlerle ilişkiden ve dimerleşmeden sorumludur. C-ucunda ise transkripsiyon aktivasyon ve protein lokalizasyonundan sorumlu bölgeleri içerir. MEF2A proteini farklı dokularda aktivite göstermek için fosforlanma bölgelerine sahiptir.

MEF2A üzerinde yapılan çalışmada, Mİ ile ilişkili olabilecek ekzon 11'de 21 baz çiftlik bir delesyon ve ekzon 7'de P279L değişimi tanımlanmıştır. Ekzon 11'de çoklu glutamin ve prolin tekrar polimorfizmlerine rastlanmıştır. Bu polimorfizmlerin beyaz ırkta Mİ ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. İspanya Popülasyonun'da, 279L allelinin Mİ ile ilişkili olduğu bulunmuştur. 279L allelini taşıyan kişilerin Mİ geçirme riskinin kontrol grubuna göre üç kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (p=0.009).

Bu çalışmadaki amacımız, erken MI maruz kalmış bireyleri bulduran ailelerde ve erken Mİ geçirmiş hastalarda MEF2A gen varyantlarını incelemektir. Tüm ekzonlar SSCP tekniği uygulanarak tarandı ve sonra anormal bulunan bantlara dizi analizi yapıldı.

Türk Popülasyonunda, MEF2A geninin allelik veya genotipik frekansları anlamlı bulunamadı.

**Anahtar kelimeler:** MEF2A (Miyosit Enhancer Faktör2A), CAD (Koroner Arter Hastalığı) , Mİ (Miyokard İnfarktüsü)

## Screening to MEF2A Sequence Variants In Patients With Early Myocard Infarction

### ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) and its most important complication, acute myocardial infarction (MI), are leading causes of disability and death in the developed world. There are little genes and genetic risk factors are known is about this disease. One of them these gene is MEF2 (Myocyte enhancer factor2) belongs to MADS (MCM1 Agamous Deficiens Serum Response Factor) super family. There are four distinct MEF2 proteins; MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D in human the genom MEF2 binds muscle-specific enhancing sequences and promoters. MEF2A localized on 15q26. MEF2A mRNA has been detected in blood vessels during mouse early embryogenesis. Furthermore, MEF2A protein expression was detected in cells of the embryonic vascularute. The overall expression pattern of MEF2A is similar to those of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in the endothelial cell precursors and Von Willebrand factor so MEF2A can be an early marker for vasculogenesis and may play an important role in contralling vascular morphogenesis. The N-terminal region of MEF2 factors contains a MADS and a MEF2 domain, which mediate DNA binding to A/T rich DNA sequences, dimerization, and cofactor interactions. The transcriptional activation domain and nuclear localization sequence are located near the C terminus. MEF2 proteins have different phosphorylation regions for activation in different tissue.

A 21-base pair deletion in exon 11 and P279L in exon 7 was proposed to have effect on MI. Further, in exon 11, there are tri-nucleotide length variants within a region of poly-glutamine and poly-proline repeats. The association between these polymorphisms in MEF2A and CAD weren't found in white individuals. The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction in Spanish Population. Carriers of the 279Leu allele had a threefold risk of suffering CAD/MI compared with controls (p= 0.009).

In this study our aim was to screen MEF2A mutations in our families with accumulated early MI and patients with early MI. All of the exons were screened by SSCP and then Sequencing was performed when SSCP yield an abnormal band (Beckman Coulter,CEQ 8000). We did not find significant differences in genotype or allelic frequencies of MEF2A gene in Turkish population.

Key words: Myocyte Enhancer Factor2A (MEF2A) , Coronary artery disease (CAD), MI (Myocardial Infarction).

## TEŞEKKÜR

Dünyada ve Ülkemizde, büyük bir sorun teşkil eden Mİ ve bu hastalığın oluşumunda etkili olduğu düşünülen Miyosit Enhancer Faktör 2A (MEF2A) gen varyantlarının Mİ'li hastalarda incelenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Müdürlüğü tarafından 20060809025HPD no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bana araştırma olanağı sağlayan ve tez çalışmasının her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren aynı zamanda bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a, sonsuz tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam, Uzm. Bio. Ece AKAR'a, her zaman destekleriyle yanımda olan Kadir SİPAHİ'ye, Uzm. Bio. Arzu ULU'ya, Bio. Yonca EĞİN'e, Uzm. Bio. Ayşenur ÖZTÜRK'e, Uzm. Bio. Duygu ÖZEL'e, Dr. Erkan YILMAZ'a, Bio. Emel USLU'ya, Doç. Dr Hilal ÖZDAĞ'a ve Moleküler Genetik Laboratuvarın'da çalışan herkese çok teşekkür ederim.

Ayrıca, her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Emine GÜLEÇ, babam Bekir GÜLEÇ ve kardeşim Şule GÜLEÇ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bio. Şükrü GÜLEÇ

Ankara, Haziran 2006

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜRLER .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler.....	2
1.1.1. Ateroskleroz ve Miyokard İnfarktüsünün Patogenezi .....	2
1.1.2. Risk Faktörleri .....	4
1.2. Miyosit Enhancer Faktör2A (MEF2A) .....	6
1.2.1. Klonlanması .....	6
1.2.2. Gen Fonksiyonu .....	7
1.2.3. Gen Yapısı ve Haritalanması .....	9
1.2.4. MEF2A Geni Üzerinde Yapılan Çalışmalar .....	9
1.3. Moleküler Teknikler .....	10
1.3.1. DNA İzolasyonu .....	10
1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	10
1.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	12
1.3.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) .....	13
1.3.5. Heterodubleks PCR ve MDE Jel .....	13
1.3.6. DNA Dizi Analizi .....	13
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>15</b>
2.1. Materyal .....	15
2.2. Yöntem .....	15
2.2.1. DNA İzolasyonu .....	15
2.2.2. MEF2A Gen Değişimlerinin Belirlenmesi .....	16
2.2.3. MEF2A Gen Varyantlarının İncelenmesindeki PCR Koşulları .....	17

2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi .....	19
2.2.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) .....	19
2.2.6. Gümüş Boyama .....	20
2.2.7. Heterodubleks PCR ve MDE Jel .....	21
2.2.8. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi .....	22
2.2.9. DNA Dizi Analizi .....	23
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>24</b>
3.1. Ekzon 1 .....	25
3.2. Ekzon 2 .....	25
3.3. Ekzon 3 .....	25
3.4. Ekzon 4 .....	26
3.5. Ekzon 5 .....	26
3.6. Ekzon 6 .....	26
3.7. Ekzon 7 .....	27
3.8. Ekzon 8 .....	27
3.9. İntron 8 .....	27
3.10. Ekzon 9 .....	28
3.11. İntron 10 .....	29
3.12. Ekzon 11 .....	29
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>38</b>

## SİMGELER DİZİNİ

A/T	Adenin/Timin
ACE	Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş Nitrat
APOA5	Apolipoprotein A5
Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumine
CAD	Koroner Arter Hastalığı
CAG	Glutamin
CD40	Cluster of Differentiation40
DdNTP	Dideoksi nükleotit trifosfat
dNTP	Deoksi nükleotit trifosfatlar
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FVL	Faktör 5 Leiden
GLUT4	Glucose Transporter 4
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
KCl	Potasyum Klorür
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LTA- $\alpha$	Limfotoksin-alfa
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDE	Jel Mutation Detection Enhancement jel
MEF2A	Miyosit enhancer faktör2A
Mg <sup>++</sup>	Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
Mİ	Miyokard infarktüsü
Miyod	Miyogenik farklılaşma antijen 1
Miyogenin	Miyogenik faktör 4
MKK6	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
MYF4	Miyogenik Faktör 4
MYF5	Miyogenik Faktör 5



Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PON1	Paroksenaz1
RBC	Red Blood Cell
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSCP	Single Strand Conformation Polymorfizm
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid
VEGFR2	Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü 2
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun çalışma prensibi .....	11
Şekil 3.1.1. Ekzon 1 SSCP jel örneği .....	25
Şekil 3.2.1. Ekzon 2 SSCP jel örneği .....	25
Şekil 3.3.1. Ekzon 3 SSCP jel örneği .....	25
Şekil 3.4.1. Ekzon 4 SSC jel örneği .....	26
Şekil 3.5.1. Ekzon 5 SSCP jel örneği .....	26
Şekil 3.6.1. Ekzon 6 SSCP jel örneği .....	26
Şekil 3.7.1. Ekzon 7 SSCP jel örneği .....	27
Şekil 3.8.1. Ekzon 8 SSCP jel örneği .....	27
Şekil 3.9.1. Ekzon 9 SSCP jel örneği .....	28
Şekil 3.9.2. İntron 8'deki heterozigot 141246: A /C değişimi .....	28
Şekil 3.10.1. Ekzon 9 SSCP jel örneği .....	28
Şekil 3.10.2. Ekzon 9'daki heterozigot 141348: T/C ve homozigot 141354: G/A geçişimleri .....	28
Şekil 3.11.1. İntron 10 SSCP jel örneği .....	29
Şekil 3.11.2. İntron 10'daki homozigot 145408: T /C değişimi .....	29
Şekil 3.12.1. Ekzon 11 SSCP jel örneği .....	29
Şekil 3.11.2. Ekzon 11'deki homozigot 147217: C /A değişimi .....	29
Şekil 3.12.3. (CAG)n tekrar sayıları A1.n= 5, A2. n=11 .....	31
Şekil 3.12.3. (CAG)n tekrar sayıları B1. n=6, B2. n=9 .....	31
Şekil 3.12.3. (CAG)n tekrar sayıları C1. n=7, C2. n=11 .....	31
Şekil 3.12.4 Ekzon11'deki 21 bç'lik delesyon ve (CAG) tekrarlarının meydana geldiği bölgeler .....	32
Şekil 3.12.5. (D) Aile soyağacı .....	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan Miktarlar ..	16
Çizelge 3.1. Baz değişimleri, bulunduğu bölgeler ve yayımlanma durumları .....	24
Çizelge 3.12.1. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki 147217:C/A sıklığı .....	30
Çizelge 3.12.2. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki 147217 C ve A allel sıklığı .....	30
Çizelge 3.12.3. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki üç nükleotit (CAG) tekrar polimorfizm sıklığı .....	32
Çizelge 3.12.4. (D) indeks ailesi 141246:A/C, 141348:T/C, 141354:G/A, 145408:T/C, 147217:C/A polimorfizmlerinin dağılımı .....	33

## 1.Giriş

İskemik kalp hastalığı, miyokardın oksijen ihtiyacı ile kan akımı arasındaki dengesizlik sonucu gelişen birbiri ile yakından ilişkili sendromlar grubuna verilen isimdir. İskemik kalp hastalığının en sık görülen sebebi, koroner arter lümenlerinin aterosklerozla daralmasıdır; bu nedenle iskemik kalp hastalığı sıklıkla koroner kalp hastalığı veya koroner arter hastalığı olarak adlandırılır.

Koroner arter hastalığı, Birleşik Devletler ve Avrupa dahil olmak üzere, dünyanın ekonomik olarak gelişmiş ülkelerindeki ölümlerin tek başına, en sık nedenidir ve bu ülkelerde ölümlerin yaklaşık üçte birinden sorumludur. Koroner arter daralmasının oranı ve ciddiyeti ile bazı sendromlar görülür. Bu sendromlardan biri akut miyokard infarktüsüdür (Mİ). Miyokard infarktüsü terimi, lokal iskemi sonucunda miyokard nekrozu alanı gelişmesini tanımlar. Birleşik Devletlerde, her yıl 1.5 milyon kadar kişi Mİ geçirmekte, bunların kabaca 500.000'i ölmektedir. Fatal vakalar arasında, hastaların yaklaşık yarısı hastaneye yetişmeden önce ölmektedir. Akut Mİ riski hayat boyunca progresif olarak artmaktadır. 45 ve 54 yaşlar arasında, erkeklerde, kadınlara kıyasla Mİ gelişme olasılığı 4-5 kat daha fazladır. Bununla birlikte iskemik kalp hastalığı riski 80 yaşından sonra her iki cinsten eşit olarak görülmektedir (Kumar V. 2003).

Akut Mİ için bir çok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar kalıtsal ve edinilen olarak iki gruba ayrılır. Cinsiyet, yaş, aile öyküsü ve genetik faktörler kalıtsal risk faktörleri olarak verilebilir. Sigara, kolesterol, yüksek kan basıncı, obezite, stres, diyet, alkol de edinilen risk faktörlerine örnek olarak verilebilir (Kumar V. 2003). Bu tip risk faktörlerinin etkileşimlerinin ortaya konması miyokard infarktüsünün ortaya çıkışı hakkında önemli bilgiler vermesi ve doğru yaklaşımlar geliştirilmesi için önemlidir. Koroner arter hastalıklarıyla ilgili yapılan çalışmalar, miyokard infarktüsü ile ilgili genetik faktörlerin ve aday genlerin bulunması, hastalıkların altında yatan ve çoğu bilinmeyen genetik etkilerin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

Bu çalışmadaki amacımız, Erken Mİ'ne maruz kalmış bireyleri bulandıran ailelerde ve MI geçirmiş 45 yaş ve altı hasta bireylerde, miyosit enhancer faktör2A

(MEF2A) gen varyantlarını incelemek ve bunların Türk Popülasyonu için erken Mİ ile ilişkili olup olmadığını göstermektedir.

## **1.1. Genel Bilgiler**

### **1.1.1. Ateroskleroz ve Miyokard İnfarktüsünün Patogenezi**

Kalp krizlerinin çoğu koroner arterlerde (kalp kasına kan ve oksijen taşıyan atardamarlar) oluşan pıhtılar (trombüs) sebebiyle meydana gelir. Pıhtılar genelde ateroskleroz sonucu meydana gelen değişiklikler yüzünden daralmış koroner arterlerde oluşur. Arter duvarının içindeki aterosklerotik plak bazen çatlak ve bu da pıhtı oluşumunu tetikler. Koroner arterlerdeki pıhtılar kalp kasına kan ve oksijen akışını engeller, bu da o bölgedeki kalp hücrelerinin ölümüne sebep olur. Hasar gören kalp kası, kasılma yeteneğini kaybeder ve kalbin geri kalan kısmı hasar gören bu bölümün işini de yapmak zorunda kalır.

Ateroskleroz ateromlar ya da ateromatöz veya fibröz yağlı plaklar denen damar lümenine doğru çıkıntı yapan ve lümeni tıkayan, alttaki media tabakasını zayıflatan ve ciddi komplikasyonlar gösterebilen intimal lezyonlarla karakterizedir. Batı dünyasında diğer tüm hastalıklardan daha fazla mortalite (yaklaşık ölümlerin yarısı) ve ciddi morbiditeye neden olur. Koroner arter hastalığı aterosklerozun önemli bir belirtisidir. Aterosklerozun patogenezinde, zedelenmeye cevap hipotezi olarak adlandırılan bu görüş, ateroskleroza, endotel hasarı ile başlayan arter duvarının bir kronik inflamatuvar cevabı olarak kabul eder (Kumar V. 2003). İnflamatuvar cevap aterosklerozun ilerlemesine öncülük eden bir yol olup başlıca üç aşamada meydana gelir; inflamasyon bölgesine kan sağlanmasında artış, kılcal geçirgenlikte artış ve inflamasyonun erken safhalarında öncelikle nötrofillerin, daha sonraları ise monosit ve lenfositlerin inflamasyon bölgesine göç etmeleridir (Roitt 1993). Erken aterosklerozdaki endotel disfonksiyonun spesifik nedeni tam olarak bilinmezken, sigara dumanının dolaşımdaki türevleri, homosistein ve virüsler ile diğer infeksiyon ajanları etkili olmaktadır. Sigara kullanımı endotelin yapısını ve biyokimyasal işlevini bozmaktadır. Nikotine bağlı olarak koroner arter endotel hücrelerinin genetik olaylara bağlı olarak yapısı değişmektedir. Sigaranın içimi sonucu açığa çıkan radikaller endotelin yapısını bozmaktadır (Vallance and Chan 2001). Son

zamanlarda, aterosklerotik plakların %50-75'inde saptanan Klamidya Pnömoniya varlığı mikroorganizmaların da aterosklerozdaki rolüne dikkati çekmiştir (Hansson 2001). İnvitro çalışmalar göstermiştir ki, arteryal damarlanmanın lezyondan korunmuş alanlarında tipik olarak gözlenen normal laminar akım ürünleri ile lezyon oluşumundan koruyan endotelial genleri uyarır. Bu genler, erken aterosklerotik lezyonların tesadüfi olmayan lokalizasyonlarını açıklayabilirler (Kumar V. 2003).

Aterosklerozda etkili diğer bir faktör, inflamasyon bölgesine göç eden monositler ve makrofajların rolüdür. Disfonksiyonel endotel hücreleri yüzeyine uyarılmış spesifik endotelial adezyon molekülleri aracılığıyla aterosklerozun erken döneminde endotele tutunurlar. İntimada yerleşmek için endotel hücreler arasına göç ederler. Daha sonra köpüksü hücreler haline gelerek büyük kısmı okside olan lipoproteinleri yutarlar. Makrofajlar aynı zamanda lökositlerin adezyonunu arttıran interlökin-1, interlökin-6 ve tümör nekrozis faktör- $\alpha$  inflamasyon aracı maddeleri salıvermeye başlarlar (Mehta, Saldeen et al. 1998). Bu maddelerin salınmasında makrofajlar üzerindeki çeşitli hücre yüzey markır proteinlerinin etkisi vardır. Bunlardan biri olan CD40 hücre yüzey molekülü kendi tanıma molekülü olan CD40L'yi tanıyarak inflamasyon aracı maddelerinin salınmasını sağlar, bu büyüme faktörleri ve stokinler düz kas hücrelerinin göçünde ve çoğalmasında etkili olarak lezyonun ilerlemesinde önemli rol oynarlar (Schonbeck, Sukhova et al. 2000).

Anjiyografik çalışmalar bir çok akut Mİ'nün koroner arter trombozu ile oluştuğunu göstermektedir. Ateroskleroz, koroner trombozların gelişmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Bir çok çalışmada, altta yatan aterosklerotik plağın hasarlanması trombüs gelişmesini etkiler. Vazospazm ve trombosit agregasyonu, koroner arter tıkanmasına yardımcı olabilir. Bazen özellikle infarktüslerin subendokardial miyokarda sınırlı olduğu vakalarda, diffüz, daraltıcı tipte koroner ateroskleroz vardır ancak ne plak hasarı, ne de trombüs görülür. Böyle vakalarda, ateroskleroz nedeni ile zaten tehlikede olan koroner damarların hipoperfüzyonu, subendokardial miyositlerin nekrozunu oluşturmak için yeterli gibi gözükmektedir (Kumar V. 2003).

Miyokard nekrozu, koroner arter tıkanmasının 20-30 dakikası içinde başlar. Normal şartlar altında, miyokardın subendokardial bölgesi ventrikül duvarının en zayıf olarak perfüze olan bölgesidir. Bu bölge sadece epikardial koroner arter dallarından kan alan en

son bölge olmakla kalmaz, bu alanda mevcut nispeten yüksek intramural basınçlar da kanın buraya akışını zorlaştırır. İskemik zedelenmeye karşı artmış bu eğilimden dolayı, miyokard infarktüsleri, tipik olarak subendokardial bölgeden başlar. Nekroz sonu bundan sonraki bir kaç saat boyunca miyokardın orta ve subepikardial alanlarını tutmak üzere dışarıya doğru genişler. İnfarktüs genellikle 3-6 saatlik bir dönem içinde en gelişmiş boyutuna ulaşır. Bu gelişim dönemi süresinde trombolitik ajanların, örneğin streptokinaz veya plazminojen aktivatörü uygulanması ile trombüsün erimesi, infarktüsün büyüklüğünü sınırlayabilir. Zamanla, hücre ölümünün sınırı, ventrikülün tüm kalınlığını tutmak üzere subendokarddan dalgalar şeklinde genişler. Ayrıca, eğer tıkaçıcı bir trombus, trombolitik ajanlarla veya anjiyoplasti ile, nekroz dalgası ventrikül duvarının tüm katlarına yayılmadan önce lizise uğrarsa, odaksal, transmural infarktüs görülebilir (Kumar V. 2003).

Bir Mİ'nün lokalizasyonu, tıkanmanın olduğu alan ve koroner dolaşımın anatomisi ile belirlenir. Sol ön inen koroner arterin tıkanması, tipik olarak sol ventrikülün ön ve apikal bölgelerinde ve komşu interventriküler septumda infarktüs oluşturur. Sağ koroner arterin tıkanması, sol ventrikülün arka ve bazal kısımlarını ilgilendiren bir çok infarktüsten sorumludur. İnfarktüsün büyüklüğü bazı faktörler tarafından etkilenebilir. Genel olarak, koroner arterlerin daha proksimal segmentlerinin tıkanması, miyokardın tüm kalınlığını ilgilendiren daha büyük infarktüsler meydana getirir. Tam tersine, daha distal arter dallarındaki trombüsler daha küçük infarktüsler oluşturmaya eğilim gösterir. İnfarktüsün genişliği, tıkanma anında mevcut olan kolleteral dolaşımın derecesi ile de etkilenir. Uzun süren koroner ateroskleroza olan hastalarda kronik iskemiye cevap olarak zamanla kolleteral dolaşım gelişebilir. Böyle damarlar, özellikle miyokardın epikardial bölgelerinde, infarktüsün büyüklüğünü sınırlandırabilir (Kumar V. 2003).

### **1.1.2 Risk Faktörleri**

Genel olarak bakıldığında, epidemiyolojik çalışmalarda genetik bulgular önemli bir yer tutmaktadır. Kalp rahatsızlıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda, genetik faktörlerin belirlenmesi gen-çevre ilişkisinin ortaya konması açısından önemlidir (Visvikis-Siest and Marteau 2006). Mİ için belirtilen risk faktörleri, ateroskleroz risk faktörleriyle aynıdır. Aterosklerozda son 50 yıl içinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar bir çok risk faktörünü ortaya koymuştur (Lusis 2000). Bu risk faktörlerinden genetik ağırlıklı olanlar; LDL

(Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)/ VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) seviyesindeki artış, HDL (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein) seviyesindeki azalma, lipoprotein A ve homosistein seviyesindeki artış, aile öyküsü, diyabet ve obezite, hemostatik faktör seviyelerindeki artış, cinsiyet, çevre faktörlerine, yüksek yağ oranı içeren diyetler, sigara, düşük antioksidant seviyeleri, hareketsizlik, infeksiyon ajanları örnek olarak verilebilir (Lusis 2000).

Yapılan çalışmalarda, kardiovasküler hastalıkların ortaya çıkışında bireyler arası farklılıklara neden olan genetik faktörler incelenmiştir. Bilinen risk faktörlerinin kalıtılabilirliği 30-50% arasında bir değerdedir (Fox, Polak et al. 2003). Gelecekte bireylerin , kardiovasküler hastalık riskini tahmin etmek için 20.000-25.000 genin bilgisini kullanarak kişilerin kardiovasküler hastalık riskini tahmin etmek mümkün olacaktır (Consortium 2004). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kalp rahatsızlıkları için bazı genler üzerinde durulmaktadır. Bunlara örnek olarak, ACE (anjyotensin-dönüştürücü enzim) geni üzerinde yapılan çalışmada bu genin sol ventriküler hipertropi, sol ventriküler büyüme ve Mİ ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Sayed-Tabatabaei, Houwing-Duistermaat et al. 2003; van Berlo and Pinto 2003) . PON1 (paroksenaz1) geni üzerindeki değişikliklerin bu genin ürünü olan proteinin aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve değişimlerin, farklı popülasyonlarda değişik oranlarda risk getirdiği gözlenmiştir (Jarvik, Hatsukami et al. 2003; Wheeler, Keavney et al. 2004). APOA5 (apolipoprotein A5) ise trigliserit ve yüksek yoğunluklu lipoprotein miktarlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Liu, Zhang et al. 2005). Bir tümör nekrosiz faktör ailesinden olan LTA- $\alpha$  (limfotoksin-alfa) geni üzerinde yapılan çalışmada, bu gen üzerinde yer alan değişimlerin yüksek Mİ riskiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Ozaki, Ohnishi et al. 2002). Homosistein metabolizmasında yer alan MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz) üzerinde yapılan çalışmalarla bu gendeki değişimin yüksek hipertansiyonla ilişkisi gösterilmiştir (Inamoto, Katsuya et al. 2003). Aday olarak gösterilen genlerden bir tanesinde MEF2A (miyosit enhancer faktör 2A) genidir. Bu gen üzerinde de yapılan çalışmalarda gende oluşan bazı değişimlerin Mİ ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bhagavatula, Fan et al. 2004). Genom ve proteom bilimindeki gelişmeler farklı genetik varyantların teşhisini ve bunların ekspresyonun mikro analiz yöntemiyle tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (Archacki and Wang 2004). Bu gibi çalışmalar gen-çevre etkileşimlerinin ortaya konmasında, koroner arter hastalıklarıyla ilgili yeni bakış açılarının geliştirilmesi ve yeni aday genlerin ortaya çıkarılması için önemlidir.



## 1.2. Miyosit Enhancer Faktör 2A (MEF2A)

Mezodermal öncü hücrelerden miyoblast hücrelerine farklılaşmada bir çok dokuya spesifik faktörler tespit edilmiştir. Bu faktörler, kas hücrelerindeki bazı genlerin ekspresyonunu sağlamaktadırlar. Miyogenik heliks-spiral-heliks proteinlerinden olan; miyoD (miyogenik farklılaşma antijen 1, OMIM 159970), miyogenin (miyogenik faktör 4, OMIM 159980), MYF5 (miyogenik faktör 5, OMIM 159990), MYF4 (miyogenik faktör 4, OMIM 159991), klas 1 sınıfı olarak tanımlanırlar. İkinci grubu DNA bağlanma aktivitesi gösteren faktörlerden biri olan MEF2 gen ailesidir. MEF2 gen ailesi, tüm kaslarla ilişkili genlerin hepsi olmasa da, çoğunun regülasyon bölgesine bağlanarak hedef genlerin aktivasyonlarını etkilemektedir. MEF2 gen ailesi, MADS gen ailesinin (Yeast mating type-specific transcription factor MCM1, the plant homeotic genes 'agamous' and 'deficiens' and the human serum responsefactor SRF, OMIM 600589) bir üyesidir. MEF2 gen ailesinin insan kromozomunda bilinen dört üyesi vardır. Bunlar insan kromozomunda; MEF2A, 15q26, MEF2B, 19q12, MEF2C, 5q14 ve MEF2D 1q12-q23 bölgelerinde lokalize olmuşlardır (Hobson, Krahe et al. 1995).

### 1.2.1. Klonlanması

MEF2A geni için ilk cDNA, 1991 yılında klonlanmıştır (Pollock and Treisman 1991). MEF2A mRNA'sına, iskelet kaslarında, kalpte ve nöronlarda rastlanmaktadır. Ayrıca MEF2A proteinine, özellikle iskelet ve kalp kas hücrelerinde fazlasıyla rastlanmıştır. MEF2A geninin farklı proteinleri kodlayan bir çok alternatif formu tanımlanmıştır (Yu, Breitbart et al. 1992). MEF2A mRNA'sının, fare erken embriyogenez aşamasında, kan damarlarında yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca MEF2A protein üretimine, postcoitumun 8.5 haftası dolaylarında embriyonik damar hücrelerinde rastlanmıştır. MEF2A protein sentezi, Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü 2 (VEGFR2) ve Von Willebrand faktör (endotelyal hücre markırı) üretimleriyle paralel olduğu görülmüştür. MEF2A'nın damar vasküler gelişimde bir markır ve damar morfolojisi oluşumunda etkili bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Wang, Fan et al. 2003).

### 1.2.2. Gen Fonksiyonu

Kas kökenli olmayan hücrelerde, myoD bağımlı bir MEF2 aktivasyonu gözlenmiştir. MEF2A tek başına tüm kas hücresi fenotipini belirlememektedir (Yu, Breitbart et al. 1992). Kas gelişim aşamalarında, diğer MEF2 gen ailesi üyelerinin de etkili olduğu gösterilmiştir. ME2A kas öncü hücrelerinin ilk olarak kas hücresine farklılaşmasında etkili olduğu, daha sonraki aşamalarda ise MEF2C'nin bu farklılaşma aşamalarının sürekliliğini sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda ilk farklılaşma aşamalarında, MEF2D'nin de etkili olduğu düşünülmektedir (Breitbart, Liang et al. 1993). MADS gen ailesine ait olan MEF2 üyelerinin, fibroblast hücrelerinin miyogenesizde tek başlarına etkili olmadıkları fakat miyogenik heliks-spiral-heliks proteinlerinden; miyoD veya miyogenin ile beraber miyogenesizi arttıracak şekilde etkili oldukları bulunmuştur (Molkentin, Black et al. 1995).

MEF2 proteini N-ucunda MADS ve MEF2 domeinini içerir. Bu bölge, DNA'ya bağlanmadan sorumludur. MEF2 proteini Adenin/Timin'ce (A/T) zengin DNA sekanslarına bağlanır. Diğer proteinlerle ilişkiden ve proteinin dimerleşmesinden sorumludur. C-ucu ise transkripsiyon aktivasyon bölgesi olarak görev yapar ve ayrıca protein lokalizasyonundan da sorumlu bölgeyi içerir (Olson 2003).

Memeli gelişimi süresince elektriksel aktivite, nöronların kalsiyum iyonuna bağlı olarak, uygun sinaptik bağlantılarla yaşamlarını sürdürmesinde etkilidir. Kalsiyum iyonun serebellar nöronlardan içeriye alınması MKK6'nın (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6, OMIM 601254)-p38 MAP kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase 14, OMIM 600289) biyokimyasal yolunun aktivasyonuna neden olur ve p38 MAP kinaz, MEF2 proteinlerini fosforlar ve aktivasyonu sağlar. Bu kalsiyuma bağlı p38 MAP kinaz sinyal yolunun aktivasyonu ile MEF2 proteini, nöronların farklılaşmasında ve aktivasyonlarında gerekli olan genlerin ekspresyonunu sağlayabilmektedir. MAPK üyelerinden olan ERK1 ve ERK2 strese bağlı bir protein kinaz aktivitesi gösterirler (Giasson and Mushynski 1997; Veeranna, Amin et al. 1998). Bu biyokimyasal yol beyin ve kas hücrelerinin her ikisinde de MEF2 proteini fosforlayarak protein fonksiyonunda etkilidirler (Cox, Du et al. 2003). Kütle spektrum çalışmalarıyla MEF2A proteininin fosforlanma bölgeleri gösterilmiştir. Bu

bölgedeki amino asitler farklı biyokimyasal yollardan ve farklı amino asitlerden fosforlanarak dokuya özgü MEF2A aktivasyonunu sağlamaktadırlar (Cox, Du et al. 2003). MEF2A proteininin serin-255'den fosforlanması bu proteinin degradasyonu ile ilişkilidir (Cox, Du et al. 2003). p38 MAPK biyokimyasal yolu üzerinden MEF2A'nın fosforlanması protein için bir aktivasyon cevabı oluşturur (Ornatsky, Cox et al. 1999; Zhao, New et al. 1999). Bu cevabın oluşmasında trionin-312 ve trionin-319 amino asitlerinin fosforlanması etkilidir (Cox, Du et al. 2003). Protein kinaz 2 ile MEF2A proteini üzerindeki serin-289 nolu amino asitin fosforlanması farklı dokulardaki işleme varyantlarının aktivitesiyle ilişkilidir. Bu bölge, MEF2A geni için alternatif işlenmenin olduğu bölgeyi içermektedir (Yu, Breitbart et al. 1992; McDermott, Cardoso et al. 1993). MEF2 proteini kalsiyum iyonlarına bağımlı çalışan bir transkripsiyon faktörü olarak da nitelendirilebilir. MEF2 proteinin bu şekilde aktivasyonu, kas farklılaşması süresince de etkilidir (Mao, Bonni et al. 1999). Çoğalan insan düz kas hücrelerinde, MEF2A'nın sentez edildiği bulunmuştur (Wang, Fan et al. 2003). Düz kas hücre gelişiminin hızlandırılması, aterosklerozun çabuklaşması ile ilişkilidir. Ateroskleroz gelişimine bağlı olarak T-hücreleri ve makrofajlar tarafından bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salınır. Bu faktörler düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göç etmelerini sağlar. Aterosklerozisde görülebilen yüksek kan basıncıyla ilişkili renin-anjiyotensin biyokimyasal yolunda yer alan ACEII (anjiyotensin-dönüştürücü enzim II) de direkt olarak düz kas hücrelerinin büyümesinde etkilidir. Sitomegalo virüs enfeksiyonları p53 protein inaktivasyonu ile ilişkilidir. p53 geni çalışmayan farelerde, düz kas hücrelerinin çoğalmasında artış olduğu gözlenmiştir (Lusis 2000). MEF2 ve GEF (SLC2A; Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4 Regulator, OMIM 609493) proteinlerinin, kaslarda insüline bağlı glukoz alınımında etkili olan GLUT4 (Glucose Transporter 4, OMIM 138190) promotöründe bağlanabileceği bölgeler bulunmaktadır. Bu faktörler tek başlarına zayıf promotör aktivitesi gösterirler, GEF ile MEF2A beraber bulduklarında daha yüksek bir aktivite gözlemiştir. GEF ile MEF2A'nın birbirine bağlanarak çalıştığı gösterilmiştir (Oshel, Knight et al. 2000; Knight, Eyster et al. 2003). MEF2A endotelyumda bol miktarda sentezlenmektedir. Sentezlenen bu protein büyük MAP kinaz ailesi tarafından fosforlanarak endotelyumun sürekliliğinden sorumludur (Attie 2004). MEF2A geni yok edilmiş fareler ile yapılan deneyde, bu farelerin canlı doğdukları ancak doğumdan sonra en fazla dokuz aylık süreç içinde öldükleri görülmüştü ve bu fareler üzerinde yapılan çalışmada, mitokondrial hasar gözlenmiştir. MEF2A'nın mitokondri sayısı ve

mitokondrial solunum reaksiyonlarında etkili olduğu düşünölmektedir (Naya, Black et al. 2002).

### **1.2.3. Gen Yapısı ve Haritalanması**

İnsan MEF2A genin yapısı ve izolasyonu, ilk olarak 1996 yılında tanımlanmıştır. Protein kodlama bölgesi 10 intron tarafından bölünmektedir. MEF2A geni kromozomal olarak 15q26 bölgesinde olduğu FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) metoduyla ilk olarak 1996 yılında gösterilmiştir (Suzuki, Lowry et al. 1996).

### **1.2.4. MEF2A Geni Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

MEF2A geni üzerinde yapılan 13 hastanın bulunduğu ve koroner arter hastalığının (CAD) otozomal dominant kalıtım gösterdiği aile çalışmasında ekzon 11'de 21 baz çiftlik bir delesyon tanımlanmış yine aynı ekzonda çoklu glutamin ve prolin tekrarlarına rastlanmıştır (Wang, Fan et al. 2003). Bu delesyonun bulunduğu bölge insan, fare ve domuzda evrimsel olarak korunmuştur; MEF2A proteininin C-terminal ucunda yer almaktadır. Delesyonun, proteinin hücresel lokalizasyonu için önemli olduğu gösterilmiştir (Wang, Fan et al. 2003). CAD/Mİ görölen 50 hasta üzerinde yapılan çalışmada bu delesyona rastlanamamıştır (Wang, Fan et al. 2003). MEF2A protein kodlama bölgesi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada CAD görölen 300 hastada yapılan tarama sonucunda 21bç delesyona rastlanmazken, 300 yaşlı bireyden oluşmuş kontrol grubunda sadece bir kişide bu delesyona rastlanmıştır ve bu delesyonun beyaz ırkta CAD hastalığına ait bir neden olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada çoklu glutamin tekrarları için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Weng, Kavaslar et al. 2005). Diğer yapılan MEF2A geni üzerindeki bir çalışmada, CAD/Mİ görölen 207 hasta bireylerden ikisinde N263S (Asparjin263Serin), birinde P279L (Prolin278Lösin), birinde de G283D (Glisin283Aspartikasit) mutasyonları ekzon7'de tanımlanırken 191 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bu mutasyonlar, MEF2A proteinin transkripsiyon aktivasyon bölgesine çok yakın bir bölgede lokalize olmuşlardır

ve bu mutasyonların, proteinin transkripsiyon aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Bhagavatula, Fan et al. 2004). İspanya popülasyonundaki 483 CAD/Mİ hasta ve 1189 sağlıklı bireyden oluşan gruplar arasında yapılan çalışmada, 279L allelini taşıyan kişilerin Mİ geçirme riskinin kontrol grubuna göre üç kat anlamlı olduğu gösterilmiştir (p=0.009). Aynı çalışmada, ekzon11'de bulunan çoklu glutamin tekrarları için anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Gonzalez, Garcia-Castro et al. 2006). Bu üç nükleotit tekrar polimorfizmi için ailesel kardiomyopati aileler üzerinde yapılan çalışmada bu tekrarların hastalıkla ilişkisi gösterilememiştir (Bachinski, Abchee et al. 1997). Japon popülasyonunda MEF2A polimorfizmlerinin Mİ için anlamlı olmadığı gösterilmiştir ve bu çalışmada ekzon11'de tanımlanan R447X (Arjinin447Dur) ile Mİ arasında bir ilişki gösterilememiştir (Kajimoto, Shioji et al. 2005). CAD ve bunun bir sonucu olan Mİ için yapılan bu tip genetik çalışmalar Türk Popülasyonu içinde önemlidir ve şimdiye kadar MEF2A geni için Türk Popülasyonunda böyle bir çalışma yapılmamıştır.

### **1.3. Moleküler Teknikler**

#### **1.3.1. DNA İzolasyonu**

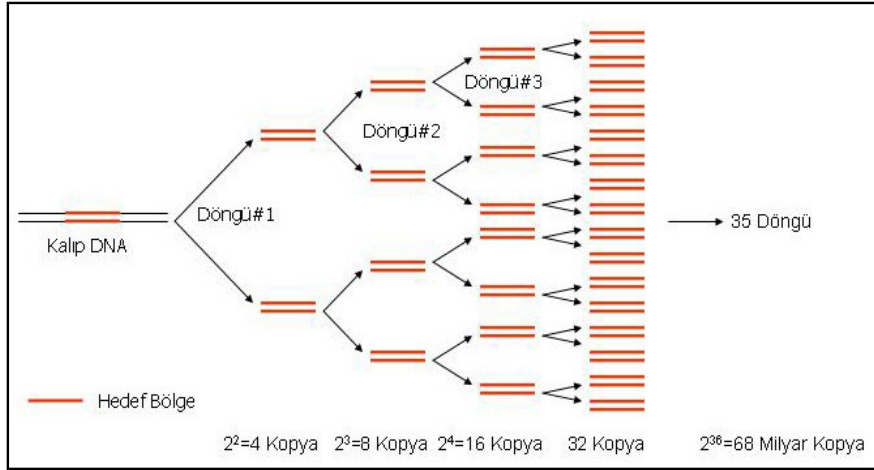
DNA'lar, kan örneklerinden fenol / kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

#### **1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik DNA dizilerinin *in vitro* enzimatik sentezleme metodudur. Bu spesifik bölgelerin sınırlarını oluşturmak için değişik sayıda ve uzunlukta oligonükleotit primerler kullanılır, bunlar karşı anlamlı kalıp iplikçiklere bağlanırlar. Ardı ardına tekrarlayan döngüler serisi; kalıp DNA'nın tek iplikçikli hale getirilmesi, primerlerin kendi eşlenik bölgelerine yapışması, yapışan primerlerin DNA polimeraz ile DNA sentezlenmesi olarak gerçekleşir. Döngüler serisi sayesinde ürün miktarı logaritmik olarak artar ve üretilen spesifik fragman primerlerin 5' ucunda sonlanır. Primer uzatılması safhasında sentezlenen ürünler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür. Bu sayede hedef DNA kopya sayısı her döngüde yaklaşık olarak iki katına çıkar. Böylece 20 döngü sonunda polimeraz zincir reaksiyonu yaklaşık bir milyon kat ( $2^{20}$ ) ürün verir (Şekil 1.3.2.1).

*Thermus aquaticus*'un termostabil DNA polimerazının izole edilerek kullanılması büyük kolaylık yaratmıştır. Reaksiyon bileşenlerinin (kalıp, primerler, dNTP, tampon) tek tüp içinde toplanmasıyla reaksiyon basit bir sıcaklık döngüler zinciri haline gelmiştir. Çeşitli reaksiyon parametrelerinin (enzim, primer,  $Mg^{++}$  konsantrasyonu, sıcaklık döngü profili) değiştirilmesiyle spesifikliğin ve üretimin artırılması mümkündür. Her bir oligonükleotit primerin farklı optimal ayar noktası olabilir bunun için mümkün her reaksiyonun farklı ayarları olabilir .

**Şekil 1.3.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun çalışma prensibi**



Polimeraz zincir reaksiyonunun özgünlüğü ve hedef bölgenin çoğaltılmasının kontrolü jel elektroforezinde yapılır. Uygun primerin ve uygun yapışma sıcaklığının kullanımıyla istenmeyen sekansların üretilmiş engellenmiş olur. Bu etki genellikle jel profillerinin doğru yorumlanmasını sağlar. Polimeraz zincir reaksiyonu primer olarak istenen hedef bölgeyi çoğaltmakta kullanılsa bile aynı zamanda eldeki bazı dizileri kısmen değiştirmek içinde kullanılan oldukça güçlü ve kullanışlı bir tekniktir. Primer dizileri fiziksel olarak hedef bölgenin içinde yer aldığı için kalıpla primerin 5' ucundaki bazı çapraz, uygunsuz yapışmaları tolere edebilmektedir. Bu yolla sentetik primerlerdeki bazı değişiklikleri kullanarak yeni sekanslar oluşturmak mümkün olabilmektedir buna "site directed mutagenesis" denmektedir. Bu sayede bir klonlama yapılırken doğal olarak restriksiyon kesim noktaları yaratmak da mümkün olabilmektedir. Bu yöntemle ayrıca delesyon, insersiyon, nükleotit değişimleri gibi mutasyonlara özel ürün çoğaltmak da mümkün olabilmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir başka önemli özelliği de diagnostic uygulamalarda kullanımında iyi işlenmemiş, yeterli saflıkta olmayan DNA'larda ve hasar görmüş DNA'larda da iyi sonuç alınmış olmasıdır. Örnekteki DNA'nın kimyasal olarak saf olmamasına ve hasar görmüş olmasına rağmen uygulamalarda olumlu sonuç alınması Polimeraz zincir reaksiyonunun bir üstünlüğü olduğundan tıbbi diagnostik uygulamalarda ve adli tıpta kullanımını çok önemli hale getirmektedir (Saiki, Gelfand et al. 1988).

Polimeraz zincir reaksiyonu reaksiyonunda, çoğaltılacak hedef gen bölgesi seçildikten sonra ilk adım yüksek sıcaklık ile DNA'nın iki zincirini birbirinden ayırma evresi olan denatürasyondur. İnsan genomik DNA'sı için 94-98°C uygundur. Bir sonraki adım; çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen 5' ucuna komplementer 18-20 baz uzunluğundaki sentetik oligonükleotitlerin 37-65°C'ler arasında hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu) sağlamaktır. Son adım da; 72°C' de ortama eklenen dNTP'lerle çift iplikçikli DNA'ların sentezi (polimerizasyonu) sağlanır. Bu üç adım bir polimeraz zincir reaksiyonu döngüsünü oluşturur. Bu olayın 30-40 kez tekrarlanmasıyla bir DNA hedefini  $10^6$ - $10^{12}$  arasında çoğaltmak mümkün olur (Akar 1999; Read 1999).

### **1.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi**

Son hacim 50 ml olacak şekilde %1, 2 ve 3 oranlarında agaroz jeller hazırlanır. 2 g agaroz (%4)'un üzerine 50 ml son hacime tamamlanacak 1X (5X TBE (Tris 54 g, Borik asit 27.5 gr, 0.5 M EDTA 20 ml olarak alınır ve 1 lt deiyonize suya tamamlanarak yapılır.). 5X TBE hazırlandıktan sonra distile su ile 1/5 oranında seyreltilerek 1X TBE çözeltisi hazırlanır.) 1X TBE ilave edildikten sonra mikradalga fırında kaynatılır (%0,5'lik stoktan ) 2 µl Etidyum bromit ilave edilir. İyi karıştırıldıktan sonra jel tabağına dökülür. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. PCR ürünlerinden %10'u jele yüklenir. 80 V akımda 30 dk yürütülür. Ultraviyole ışık altında incelenir ve fotoğraflanır. Her polimeraz zincir reaksiyonu sonunda farklı uzunlukta ürünler elde edileceğinden değişik yoğunluklarda agaroz jel hazırlamak gerekebilir.

### **1.3.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (*Single Strand Conformation Polymorfism*) (SSCP)**

SSCP denatüre olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayanan bir tekniktir. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür. SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bp'ni geçmemesi gerekmektedir. 200 nükleotitlik bir dizide %90'ın, 400 nükleotitlik bir dizide ise %80'lik bir oranda mutasyonları yakalama şansı vardır (Akar 1999).

### **1.3.5. Heterodubleks PCR yöntemi ve Hasaslaştırılmış Mutasyon Tespit jeli (*Mutation Detection Enhancement*) (MDE Jel)**

Heterodubleks formasyon teorik olarak oluşumu; herhangi bir PCR reaksiyonunda bir birlerine homolog olan, ancak bir nokta mutasyonu, belli bir baz dizisinin girmesi veya çıkması ile bir birleriyle farklılık gösteren DNA örnekleri çoğaltıldığında heterodubleks DNA'ların elde edilmesidir. Bu oluşum ilk kez fare testis-Y geni ile ilgili çalışmalarda bulunmuştur (Akar 1999). Heterodubleks analiz metodu, çift iplikli farklı DNA konformasyon oluşumuna dayanan bir tekniktir. Bu teknikte çift iplikçikli DNA'ların heterodubleks ve homodubleks oluşumuna bağlı bir ayırım meydana gelir (flowgene).

MDE, poliakrilamid jel benzeri özelliğinde olan ve DNA konformasyon farklılığını ortaya koyabilen bir jel çeşitidir. DNA'nın MDE jelde ayırımı hem büyüklük hem de boyut olarak ortaya konabilir. MDE jel SSCP ile karşılaştırıldığında, mutasyon analiz tespitinde daha duyarlı ve optimizasyon süresi çok daha kısadır(flowgene).

### **1.3.6. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi ya da 'sequencing' DNA'nın nükleotit dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. İlk DNA dizi analizi, 1960'ların başında 75-80 nükleotit kapsayan



küçük t RNA'lar ile başlamıştır. Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde en sık kullanılan teknik Sanger'in yöntemi olup, asimetrik çoğaltma ile elde edilmiş tek iplikçikli DNA; DNA Polimeraz enzimi ile ddNTP ve biri radyo aktif olan işaretlenmiş dNTP kullanılır. Burada en önemli nokta dideoksinükleotitlerin (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) eklenmesidir. 2',3'dideoksinükleositrifosfatlar'ın, klasik dNTP'lerden farkı deoksiriboz'un 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Büyüyen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler. Fakat 3'hidroksil grubunun olmaması nedeniyle, ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağının oluşması engellenir. DNA zincirinin uzaması imkansız hale gelir (Akar 1999).

Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazların geliştirilmesiyle PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiştir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotit primer, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışabilmesi için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur. PCR'da olduğu gibi denetürasyon, yapışma, uzama, sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar 1999).

Genom dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Klug and Cummings 2002).

## **2. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Mİ tanısı almış hastalara ait kan örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalından sağlanarak çalışmaya alınmıştır. Bu şekilde sağlanan, Mİ tanısı almış, 45 yaş ve altı 69 olgu çalışma grubu olarak, Pediatrik Moleküler Genetik laboratuvarı DNA bankasına ait kendisinde ve Mİ öyküsü olmayan ve farklı yaşlarda 87 sağlıklı erişkin birey DNA'sı kontrol grubu olarak seçilmiştir. Çalışma grubu cinsiyet dağılımı ise 44 erkek/25 kadın olup; kontrol cinsiyet dağılımı da 40 erkek/47 kadın olarak seçilmiştir. Olgu ve kontrol grubu olarak DNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dair onam formları doldurularak, izinleri alınmıştır.

### **2.2. Yöntem**

#### **2.2.1. DNA İzolasyonu**

Hasta kanları 1 cc 0.5 M (Etilendiamintetraasetik asit) EDTA'lı (Sigma, ABD) tüp içerisine 9cc alındıktan sonra total hacmin ikibuçuk katı kadar yani 25cc RBC (Red Blood Cell) lizis Solüsyonu (155 mM amonyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya), 10mM potasyum bikarbonat (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,5 M EDTA (Sigma, ABD) falkon tüp içerisinde ilave edilir ve 15 dakika buzda bekletilir. +4°C, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Pellet üzerine tekrar RBC ilave edilir ve bu işleme tüm eritrositler patlatılana kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra çekirdekli hücreler üzerine; 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Quantum, Montreuil-Fransa), son konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde % 10'luk SDS (Sodium Dodecyl Sulphate (Sigma, ABD) ve beyaz küre hacminin 2.5 katı olacak şekilde Nuclease Buffer (10 mM Tris- HCl (pH 7,5), Tris Base; Owl Scientific, ABD – HCl; (Merck, Almanya), 400 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), 2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma, ABD) ilave edilerek bir gece 37°C' de su banyosunda (Kottermann, Almanya) bekletilir. Ertesi gün bire bir oranda Fenol/ Kloroform 25:24:1 oranlarında sırasıyla; Fenol (Merck; Almanya):

Kloroform ( Merck; Almanya ): izoamilalkol ( Merck; Almanya ). ilave edilerek 10 dakika elde iyice çalkalanır. 15 dakika buza gömüldükten sonra 4°C, 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant başka bir tüpe aktarılır ve 1/10’i kadar 2M Sodyum asetat ( Sigma;ABD ) ve totalin 2 katı kadar %95’lik alkol ( Tekel, Türkiye) ilave edilir. Tüp nazikçe çalkalanır ve DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C’de bir gece bekletilir. Ertesi gün +4°C’de 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır, DNA dipte pellet halindedir. 10 dakika kurutulduktan sonra %70’lik etanolle tekrar santrifüj edilir. Kurutulduktan sonra TE solüsyonunda ( 10mM Tris-HCl ve 1mM EDTA ); bir gece 37°C’lik subanyosunda bekletilerek çözülür. TE içersinde çözünen DNA +4 °C’ de saklanır.

### 2.2.2. MEF2A Gen Değişimlerinin Belirlenmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu’da gerçekleşirken karışımda bulunan PCR tamponunun İçeriği üretici firmalar arasında fark olsa da genellikle 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3); 15 mM MgCl<sub>2</sub> ‘dir. MgCl<sub>2</sub> her zaman tampon içinde olmayabilir. Bazı tamponlarda BSA (Bovine Serum Albumine) veya gliserol’de bulunabilir. dNTP (Fermentas, Litvanya) karışımından 5mM stok hazırlanır. Primerler (IDT, ABD) liyofilize olarak alınır, 500 pmol olacak şekilde stok hazırlanır (Çizelge 2.2.2.1).

#### Çizelge 2.2.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarlar

	SonKonsantrasyon	Kullanılan Miktar
Distile Su	-	36.8 µl
10x PCR Tamponu	1x	5 µl
dNTP Karışımı	0.2 Mm	2 µl
Primer Karışımı	20 pmol/ml	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	3 µl
Taq DNA Polimeraz	1 ünite	0.2 µl
DNA Kalıp	100- 300 ng	2 µl
Toplam Miktar		50 µl

### **2.2.3. MEF2A Gen Varyantlarının İncelenmesindeki PCR koşulları**

#### **MEF2A Geni Ekzon 1 PCR'ı için**

F:5'-AGAAGCTGTGTACGATGCATTAG-3'

R:5'-ACCCAACCATTCTGTCTATGTT-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 2 PCR'ı için**

F:5'-AGATTCATCTTCAGATAGCCATA-3'

R:5'-ACAAGTCATTCTGACAGTTAATGC-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 3 PCR'ı için**

F:5'-AGTTCATTCCGTCTGTGCTCTCT-3'

R:5'-AAGTAGAGGTAAAGTAAAAGTACTTA-3' primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 4 PCR'ı için**

F:5'-TAAGTACTTTTACTTTACCTCTACTT-3'

R:5'-GCAACAAGATGTTTGGTCAATCTCT-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 57°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 5 PCR Koşulları**

F:5'-TGCCAAATTAAGTTCAAAAAG-3'

R:5'-TCTTGCTCATCAAAGCAATAAAAAGAA3' primerleri kullanılmıştır. Polimeraz

zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 6 PCR'ı için**

F:5'-TCTCTATTCAGTTCACGTTTCAGTT-3'

R:5'-TGTATTAGTGAAAGTACCCTTCAG-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 57°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 7 PCR'ı için**

F:5'-GATACTCAAACCTGTAGTGAG-3'

R:5'-GGAAGCTACAGATTGACTATG-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 57°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 8 PCR'ı için**

F:5'-TGTGAGTACCCACAGTCTTAGTA-3'

R:5'-GGTTAGATAACAACACGTAAGAG-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 9 PCR'ı için**

F:5'-TCACATCATCAGTGCTTCAGAA-3'

R:5'-CACAGAAGCACACGTTGATCA-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 10 PCR'ı için**

F:5'-ATAGATTCCGTATGGACCTTCCA-3'

R:5'-AAGACAGTGTGTAGGCCAGGAGTG-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **MEF2A Geni Ekzon 11 PCR'ı için**

F:5'-TGCAGAGGTTACTTGCAAGCCAT-3'

R:5'-AGATATGTAGGGCAGGTCCT-3'

primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez ( 94°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ) 34 kez 72°C'de 7 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi**

Çalışmamızda tüm ekzonlar için yukarıdaki hazırlama metoduyla %2'lik agaroz jel hazırlandı ve PCR ürünleri incelendi.

#### **2.2.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (*Single Strand Conformation Polymorfizm*) (SSCP)**

Bu çalışmada %40'lık, oranında poliakrilamid jel 49:1, oranında hazırlanan akrilamid-bisakrilamid jel solüsyonu kullanıldı. Bunun için 380 g Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 g N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C' de ısıtılarak kimyasalların çözünmesi sağlandı ve hacim distile su ile 1000ml' ye tamamlandı (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Jel yapımında kullanılan 5X solüsyonun hazırlanması; Tris 54 gr, Borik asit 27.5 gr, 0.5 M EDTA 20 ml olarak alındı ve 1 lt deiyonize suya tamamlanarak yapıldı. 5X TBE hazırlandıktan sonra distile su ile 1/5 oranında seyreltilerek 1X TBE çözeltisi olarak gerektiğinde hazırlandı.

Jel polimerleşmesinde kullanılan %10'luk Amonyum Persülfat hazırlanması aşamasında ise, 1 g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 ml'lik hacime tamamlandı ve iyice çözünmesi sağlandı.

Elektroforez Aparatının Hazırlanması; Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulandı ve 70%'lik alkolle temizlenip ve kurulandı. Sonra camlar arasına 1 mm kalınlığında spacerler yerleştirildi.

Daha sonra jel hazırlama aşamasına geçilir; %40'luk akrilamid-bisakrilamid stoğundan 12,34 ml, 5X TBE solüsyonundan 14 ml, distile sudan 40,16 ml alınarak karıştırıldı. Karışım içerisinde partikül kalmayacak şekilde süzülüp ve sonra jelde hava kabarcığı oluşmaması için vakum sistemi kullanılıp havası alındı. Bu karışım üzerine 0,6 ml %10'luk Amonyum Persülfat ve 40 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerek hazırlanmış jel, camlar arasına döküldü. Jel döküldükten sonra 1 mm'lik taraklar camlar arasına yerleştirilip ve örneklerin yükleneceği kuyuların oluşup ve jelin polimerleşmesini sağlamak için yaklaşık bir saat beklendi.

Jel polimerleştikten sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı, tarakların çıktığı jel kısımları iyice temizlenip örneklerin yürümesini engelleyecek olan jel parçaları ortamdaki uzaklaştırıldı ve vertikal jel sistemine (BioRad, ABD) yerleştirildi.

PCR ürünlerine yükleme boyası (Formamid, EDTA, Xylene Cyanol, Brom-fenol mavisi, H<sub>2</sub>O; son konsantrasyonlar sırasıyla %95, 20mM, %0,05, %0,005) eklenerek 95°C'de 10 dk denatüre edilip ve örnek sırasına dikkat edilerek hazırlanmış jele yüklendi. Sisteme tampon olarak TBE 1X solüsyonu ilave edilip, örnekler 150 volt akım altında, +4°C 'de baz çifti uzunluklarına göre 10-14 saat yürütüldü. Elektroforez sonrası jel gümüş boyama ile boyanarak bantlar görünür hale getirildi.

### **2.2.6. Gümüş Boyama**

Gümüş boyama için %1'lik gümüş nitrat, %15'lik Sodyum Hidroksit (NaOH), %7,5'lik Sodyum Bikarbonat solüsyonları kullanıldı. Bu kimyasalların hazırlanma aşaması ise şu şekildedir; %1'lik gümüş nitrat solüsyonu, 5 g gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) (AppliChem,

Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml' ye tamamlandı. %15'lik sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu, 150 g katı sodyum hidroksit distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. %7,5'lik sodyum bikarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Özellikle hazırlanan gümüş stoğu güneş almayacak şekilde saklandı.

Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan %0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 15 dk muamele edildi. Daha sonra %1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonunu aşamasını takiben jelle muamele edildi. Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırıldı. Gümüş boyama sonrası bant farklılığı görülen örnekler DNA dizi analizi yapıldı.

### **2.2.7. Heterodubleks PCR yöntemi ve Hasaslaştırılmış Mutasyon Tespit jeli (Mutation Detection Enhancement) (MDE Jel)**

Çalışmamızda, MEF2A geninin 11. ekzonunda bulunan farklı üç nükleotit (CAG) tekrar polimorfizm sayısının belirlenip gruplandırılması, 21 bç'lik delesyonun ve diğer bulunabilecek nükleotit değişimlerin araştırılması için, heterodubleks PCR metodunu uygulanıp MDE jeli kullanıldı.

Heterodubleks PCR metodu; Ekzon 11 bölgesinde herhangi bir mutasyon bulundurmayan ve (CAG) tekrar sayısı on bir olan bir kişi referans olarak belirlendi. Daha sonra elimizde bulunan hasta ve kontrol grubundaki bireylerin 11. ekzonları PCR metoduyla çoğaltıldı ve çoğaltılmış olan her bir PCR ürünü ile, elimizdeki referans örnek 1/1 oranında karıştırıldı. Karıştırılan örnekler için; 95°C'de 1 dk, 65°C'de 1 dk ve 37°C'de ise 1 saat PCR işlemi uygulandı (Ozdag, Batley et al. 2002). Daha sonra MDE jel hazırlık işlemine geçildi.

MDE jel aparatlarının hazırlanması; Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulandı ve 70%'lik alkolle temizlenip ve kurulandı. Sonra camlar arasına 0.8 mm kalınlığında spacerler yerleştirilip ve kit olarak satın alınan MDE jel ( kat no: 50620) hazırlığına geçildi; iki jel için, 21 ml 2XMDE jel solüsyonu, 4.2 ml 10X TBE (Tris 108 gr, Borik asit 55 gr, 0.5 M EDTA 40 ml olarak karıştırılıp daha sonra 1 lt deiyonize



suya tamamlanır.), 44.2 ml deiyonize su kullanılarak hazırlanan karışım üzerine 600 ml %10'luk APS (1 g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 ml'lik hacime tamamlanır.) konur ve çözünme meydana gelene kadar el ile karıştırıldı. Daha sonra 60 ul TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) konup ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hazırlanmış aparatlara MDE jel döküldü. Jel döküldükten sonra 0.8 mm'lik taraklar camlar arasına yerleştirilip örneklerin yükleneceği kuyuların oluşması sağlandı (Ozdag, Batley et al. 2002).

Jel polimerleştikten sonra taraklar dikkatlice çıkarılıp, tarakların çıktığı jel kısımları iyice temizlenip, örneklerin yürümesini engelleyecek olan jel parçaları ortamdaki uzaklaştırıldı. Hazırlanan MDE jel, vertikal jel sistemine (BioRad, ABD) yerleştirilip heterodubleks PCR yapılmış DNA ürünleri, yükleme boyasıyla (25 gr suroz, 0.025 gr Brom-fenol mavisi, 250 ml pH:7 TrisHCL, 5ml EDTA pH:7.4, son konsantrasyonlar sırasıyla %50, %0.05, 10 mM, 10 mM olacak şekilde hacim 50ml'ye tamamlanır.) karıştırılarak, örneklerden 5 ul MDE jele yüklendi ve 130 V'ta 12-15 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Daha sonra MDE jel SSCP'de belirtildiği gibi gümüş boyama ile boyanarak değerlendirildi. Farklı konformasyon gösteren çift iplikçikli DNA jel örnekleri için PCR ürünlerinin temizlenme ve DNA dizi analizi yapıma aşamasına geçildi.

### **2.2.8. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi**

Her bir ekzon için birbirinden farklı tespit edilen DNA'lar PCR yapıldıktan sonra PCR ürünleri, PCR Prüfikasyon kiti (Metis, Türkiye) kullanılarak temizlendi. 1,5 ml'lik ependorf tüplere PCR ürünlerinden 50'er ul konuldu. Üzerlerine solüsyon A'dan 5 ul ilave edildi. Daha sonra tüpteki toplam hacimle 1/1 olacak şekilde 55 ul solüsyon B eklenerek +4°C'de en az bir saat olacak sürede bekletildi. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 1000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant pipetle uzaklaştırılarak üzerlerine %70'lik alkolden 200 ul ilave edilerek oda sıcaklığında 13000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant pipetle uzaklaştırılarak örnekler kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra 40 ul deiyonize su ile sulandırılarak DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra her bir ekzon için temizlendiği düşünülen DNA'lar %2'lik agaroz jelde incelendi.

### 2.2.9. DNA Dizi Analizi

Her bir ekzon için birbirinden farkları tespit edilen DNA örneklerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, USA) kullanıldı. Bunun için 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılıp her bir kuyucuğa 12 µl premiks (2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 6µl temizlenmiş PCR ürünü, 20 pmol primer konularak "cycle sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaklar, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapışma ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60 µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µl eklenip, +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına yerleştirilip daha sonra cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçların çıktılarını alınıp nükleotit farklılıkları değerlendirildi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

69 erken Mİ tanısı almış hasta ve erken Mİ maruz kalmış bireylerin bulunduğu aileler üzerinde yaptığımız çalışmada, MEF2A geninin 11 ekzonu ve ekzon-intron bağlanma bölgeleri SSCP tekniğiyle tarandı. Tarama sonucunda bulunan baz değişimleri (çizelge 3.1) gösterilmiştir

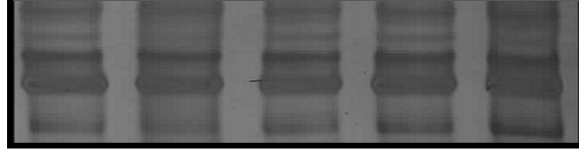
*Çizelge 3.1. Baz değişimleri, bulunduğu bölgeler ve yayımlanma durumları*

Ekzon (E)/ İtron (İ)	Değişim	Yayımlanan
E1	-	-
E2	-	-
E3	-	-
E4	-	-
E5	-	-
E6	-	-
E7	-	-
E8	-	-
İ8	141246:A/C <sup>1</sup>	+
E9	141348:T/C <sup>1</sup> , 141354:G/A <sup>1</sup>	+
İ10	145408:T/C <sup>1</sup>	-
E10	-	-
E11	147217:C/A <sup>1</sup> , Üç nükleotit tekrar polimorfizmi	+

<sup>1</sup> Tüm baz numaraları [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) sayfasından alınmıştır.

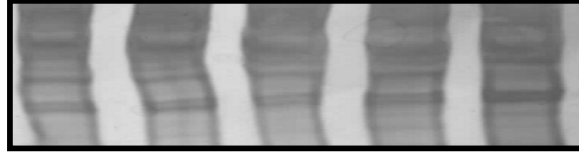


**3.1. Ekzon 1:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 1'de farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.1.1).



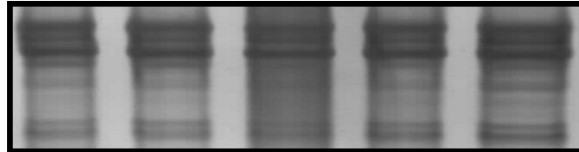
*Şekil 3.1.1. Ekzon 1 SSCP jel örneği*

**3.2. Ekzon 2:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 2'de farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.2.1).



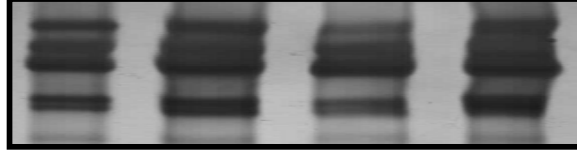
*Şekil 3.2.1. Ekzon 2 SSCP jel örneği*

**3.3. Ekzon 3:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 3'te farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.3.1).



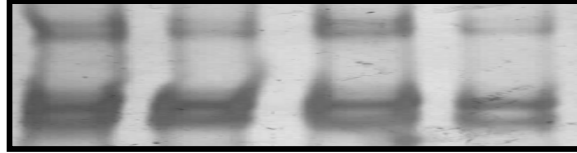
*Şekil 3.3.1. Ekzon 3 SSCP jel örneği*

**3.4. Ekzon 4:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 4'te farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.4.1).



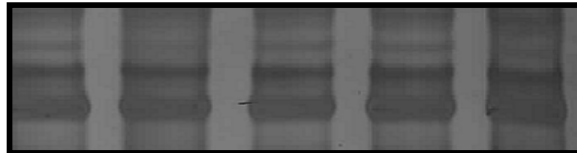
*şekil 3.4.1. Ekzon 4 SSC jel örneği*

**3.5. Ekzon 5:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 5'te farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.5.1).



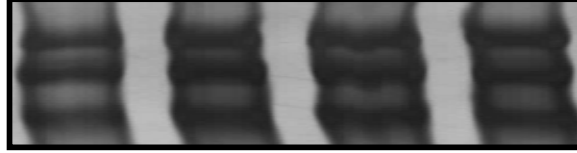
*şekil 3.5.1. Ekzon 5 SSCP jel örneği*

**3.6. Ekzon 6:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 6'da farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.6.1).



*şekil 3.6.1. Ekzon 6 SSCP jel örneği*

**3.7. Ekzon 7:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 7'de farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.7.1).



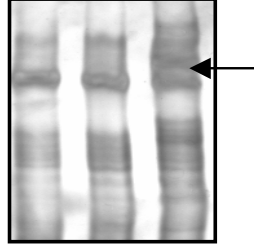
*şekil 3.7.1. Ekzon 7 SSCP jel örneği*

**3.8. Ekzon 8:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 8'de farklı bir DNA bant örneğine rastlanmamış ve herhangi bir baz değişimi tanımlanamamıştır (şekil 3.8.1).



*şekil 3.8.1. Ekzon 8 SSCP jel örneği*

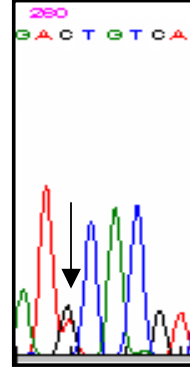
**3.9. İtron 8:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, intron 8-ekzon 9 bağlanma bölgesinde farklı bir DNA bant örneği tespit edilmiş olup (şekil 3.9.1), daha sonra DNA dizi analiz yöntemiyle, herhangi bir amino asit değişimine neden olmayan 141246:A/C polimorfizmi gösterilmiştir (şekil 3.9.2).



Şekil 3.9.1. Ekzon 9

SSCP jel örneği

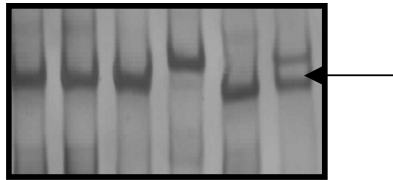
değişimi



Şekil 3.9.2. İntron 8'deki

heterozigot 141246: A /C

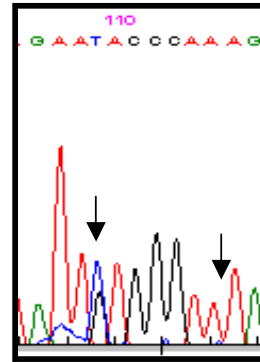
**3.10. Ekzon 9:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 9'da farklı bir DNA bant örneği tespit edilmiş olup (şekil 3.10.1), daha sonra DNA dizi analiz yöntemiyle, herhangi bir amino asit değişimine neden olmayan 141348:T/C ve 141354:G/A polimorfizmleri gösterilmiştir (şekil 3.10.2).



Şekil 3.10.1. Ekzon 9

SSCP jel örneği

ve



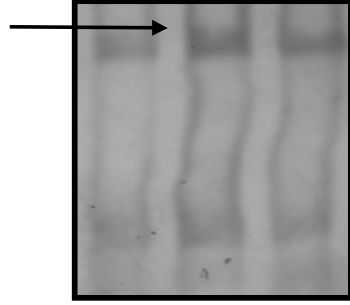
Şekil 3.10.2. ekzon 9'daki

heterozigot 141348: T/C

homozigot 141354: G/A değişimleri

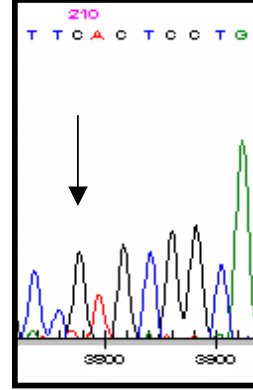


**3.11. İtron 10:** SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 10-intron 10 bağlanma bölgesinde farklı bir DNA bant örneği tespit edilmiş olup (şekil 3.11.1), daha sonra DNA dizi analiz yöntemiyle, herhangi bir amino asit değişimine neden olmayan ve Türk Popülasyonuna özgü 145408:T/C polimorfizmi, ilk olarak çalışmamızda tanımlanmıştır (şekil 3.11.2).



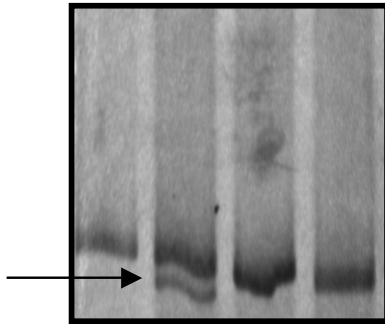
*Şekil 3.11.1. intron 10  
SSCP jel örneği*

*değişimi*

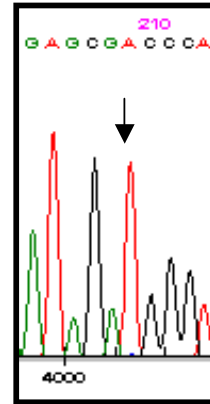


*Şekil 3.11.2. İtron 10'daki  
homozigot 145408: T /C*

**3.12. Ekzon 11:** Heterodubleks tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon 11'de farklı bir DNA bant örneği tespit edilmiş olup (şekil 3.12.1), daha sonra yapılan DNA dizi analiz yöntemiyle, herhangi bir amino asit değişimine neden olmayan, 147217:C/A polimorfizmi gösterilmiştir (şekil 3.12.2).



*Şekil 3.12.1. Ekzon 11*



*Şekil 3.11.2. Ekzon 11'deki*

*değişimi*

*SSCP jel örneği*

*homozigot 147217: C /A*

Ekzon11'deki 147217:C/A değişimi için hasta ve kontrol grubu arasında yapılan çalışmada, iki grup arasında C/A değişimi için ve C ve A allelleri için anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 3.12.1., Çizelge 3.12.2.).

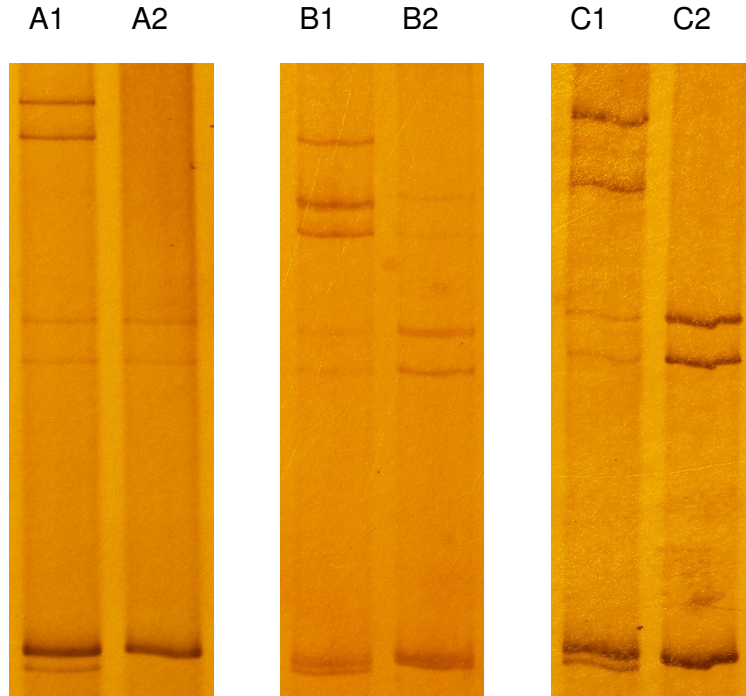
*Çizelge 3.12.1. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki 147217:C/A sıklığı*

GRUPLAR	n	C/C	C/A	A/A
Kontrol	87	80 (0.91)	2 (0.03)	5 (0.06)
Hasta	69	64 (0.92)	1 (0.02)	4 (0.06)

*Çizelge 3.12.2. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki 147217 C ve A allel sıklığı*

Allel	n	C	A
Kontrol	174	162 (0.93)	12 (0.07)
Hasta	138	129 (0.93)	9 (0.07)

Heterodubleks tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda, ekzon11'de farklı DNA bant örneklerine rastlandı (Şekil 3.12.3.A1, .A2, şekil 3.12.3.B1, .B2, şekil 3.12.3.C1, .C2). Yapılan DNA dizi analiz yöntemiyle, farklı sayıda bulunabilen üç nükleotit (CAG)<sub>n</sub> tekrarları tanımlandı. Ekzon 11'de bulunan 21 bç'lik delesyona, hasta ve kontrol gruplarında rastlanmamış olup 21 bç'lik delesyon ve CAG tekrar bölgeleri (şekil 3.12.4) gösterilmiştir.



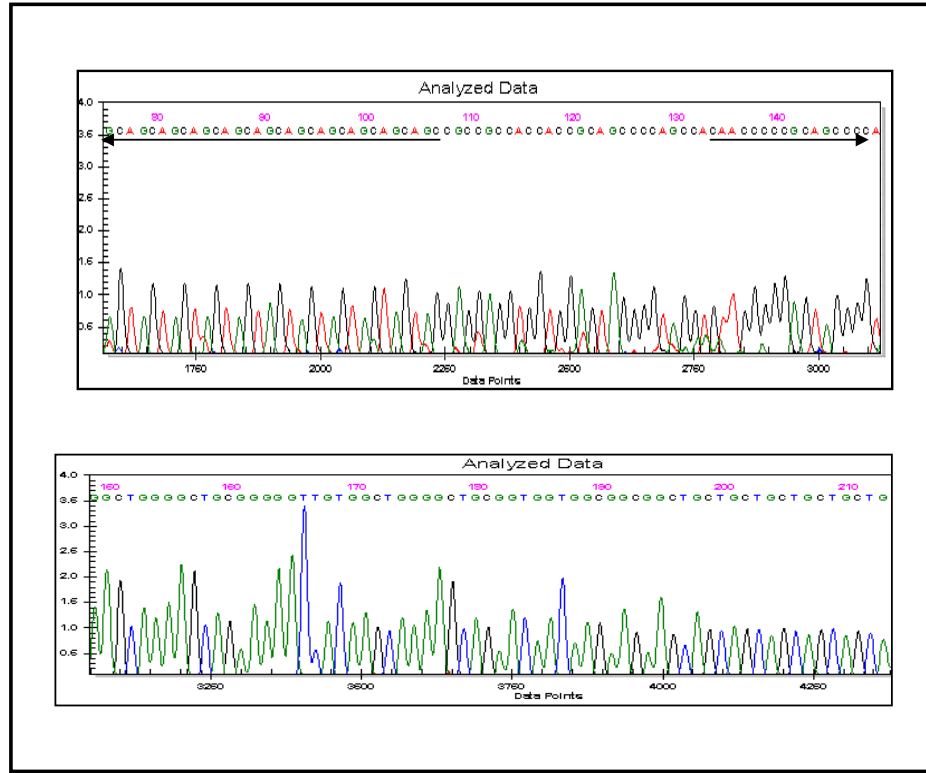
*Şekil 3.12.3. A1. n= 5, A2. n=11, şekil 3.12.3.B1. n=6, B2. n=9,*

*şekil 3.12.3.C1. n=7, C2. n=11*

Ekzon11'deki üç nükleotit tekrar polimorfizmi için hasta ve kontrol grubu arasında yapılan çalışmada anlamlı bir fark bulunamadı (Çizelge 3.12.3).

**Çizelge 3.12.3. Kontrol ve Mİ hasta grubu arasındaki üç nükleotit (CAG) tekrar polimorfizm sıklığı**

Allele (CAG) <sub>n</sub>	(CAG) <sub>5</sub>	(CAG) <sub>6</sub>	(CAG) <sub>7</sub>	(CAG) <sub>9</sub>	(CAG) <sub>11</sub>
Controls (n=87)	6 (7%)	1 (1.2%)	2 (2.3%)	29 (33,5%)	49 (56%)
Patients (n=69)	1 (1,5%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	35 (51%)	31 (44.5%)

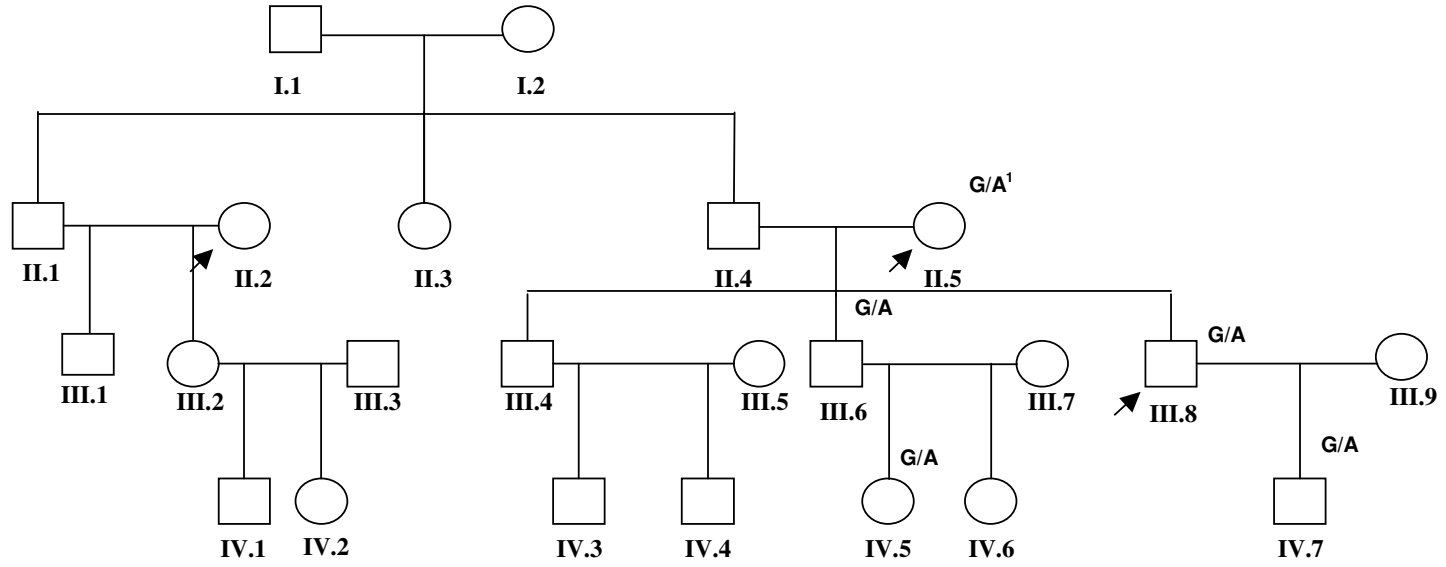


**Şekil 3.12.4 Ekzon11'deki 21 bç'lik delesyon ve (CAG) tekrarlarının meydana geldiği bölgeler**

Miyokard infarktüs'üne maruz kalmış bireylerin oluşturduğu indeks (D) ailesinde (şekil 3.12.5) tanımlanan polimorfizmlerin dağılımı çizelge 3.12.4'de gösterilmiştir. Ayrıca, koagülasyonda etkili olan FV Leiden ve protrombin 20210 mutasyonları için bu ailede yapılan taramada, protrombin mutasyonuna rastlanamazken, aileden beş bireyde FV Leiden mutasyonu heterozigot olarak bulunmuştur. Bu ailede ekzon 11'de bulunan 21 bç'lik delesyona rastlanmamıştır. Diğer ailede ise MEF2A gen ekzonlarında veya ekzon-intron bağlanma bölgelerinde herhangi bir polimorfizme ve ekzon 11'deki 21 bç'lik delesyona rastlanmamıştır.

**Çizelge 3.12.4. (D) indeks ailesi 141246:A/C, 141348:T/C, 141354:G/A, 145408:T/C, 147217:C/A polimorfizmlerinin dağılımı**

Ekzon/İntron	Baz	
İntron 8	141246:A/C	II.3 (+/-), III.1 (+/-), III.2 (+/+), III.7 (+/-), III.8 (+/+), IV.2 (+/-), IV.5 (+/-)
Ekzon 9	141348:T/C	II.3 (+/-), III.1 (+/-), III.2 (+/-), III.7 (+/-), III.8 (+/+), IV.2 (+/-), IV.5 (+/-)
Ekzon 9	141354:G/A	II.3 (+/+), III.1 (+/+), III.2 (+/+), III.7 (+/+), III.8 (+/+), IV.2 (+/+), IV.5 (+/+)
İntron 10	145408:T/C	III.2 (+/+)
Ekzon 11	147217:C/A	II.5 (+/+), III.8 (+/+)



Şekil 3.12.5. (D) aile soyağacı

<sup>1</sup> *Heterezigot FV Leiden mutasyonu*

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda kalp rahatsızlıklarının nedenleriyle ilgili yapılan genetik çalışmaların sayısı artmıştır. Yapılan çalışma tiplerinden en çok bilineni, hastalıklarla ilgili aday genlerin ortaya konması ve bu genler üzerindeki değişimlerin tanımlanmasıdır. Bunun için geniş aile bireylerinde genetik bağlantı analizleri kullanarak hastalıkla ilişkili genler gösterilebilmektedir.

Bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan MEF2A proteini, kas oluşumuyla ilişkili genlerin aktivasyonunda ve kas hücrelerinin çoğalmasında etkili bir faktördür. Endotel hücrelerinde de fazlasıyla sentezlenmektedir. Endotel fonksiyonu ve sürekliliğinde gerekli olan bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir (Attie 2004).

Wang L. et. al. (2003) yılında, geniş ölçekli ve Mİ maruz kalmış bireylerin bulunduğu aile üzerinde yaptıkları çalışmada, ekzon 11'de 21 bç'lik bir delesyon tanımlamışlar ve bu çalışmayı koroner arter hastalığının otozomal dominant formu olarak yayınlamışlardır. Çalışma yapılan ailede, çeşitli yaşlarda Mİ geçiren dokuz birey bulunmaktaydı. Bu bireylerden üçü 45 ve altı yaşlardayken Mİ'ya maruz kalmış ve ikisi hayatını kaybetmiştir. Daha sonra 50 CAD/Mİ hastalığı bulunan sporadik hastalarla yaptıkları çalışmada, 21 bç'lik delesyona rastlayamamışlardır. Daha sonra, Weng L. et. al. (2005) yılında yaptıkları çalışmada, CAD'lı 300 hastada MEF2A'ya bağlı olabilecek herhangi bir mutasyon bulunamazken, 300 bireyden oluşan ve herhangi bir CAD hastalığı geçirmemiş bireylerden oluşan kontrol grubunda, bir kişide 21 bç'lik delesyon bulmuşlar ve bu grup, MEF2A mutasyonlarının otozomal dominant CAD hastalığının direkt bir nedeni olamayacağını vurgulamışlardır. MEF2A geninin lokalize olduğu 15q26 bölgesinde (*D15S120*) markırına göre yaklaşık 93 genin bulunduğu ve hala tanımlanmamış ve fonksiyonları gösterilememiş bu genlerin de Mİ gelişiminde etkisi olabileceğini düşünülmektedir (Altshuler and Hirschhorn 2005). Bizim yaptığımız çalışmada da, erken Mİ geçirmiş 69 hasta birey ve 89 bireyden oluşan kontrol gruplarında 21 bç'lik delesyona rastlanamamıştır. Çalışmamız, diğer çalışmalar kadar birey sayısına sahip olmamasına rağmen, bu mutasyonun, otozomal dominant CAD hastalığının direkt bir nedeni olamayacağı sonucunu desteklemektedir. Wang L. et. al. (2003) MEF2A geni üzerinde



buldukları 21 bç'lik delesyonun, proteinin lokalizasyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Ancak invitro yapılan bu çalışma, proteinin invivo şartlarda Mİ gelişmesindeki rolünü tam olarak açıklayamamaktadır.

Vasküler endotel, vasküler tonun sürekliliği, kan dolaşımının regülasyonu, koagülasyon ve inflamasyon cevap, vasküler düz kas hücrelerinin ve kardiak miyositlerin gelişmesini de içine alan kardiovasküler sistemde etkilidir (Olson 2004). Sentezlenen MEF2A, koroner arterlerin endotel ve düz kas hücre yüzeylerinde yüksek oranda bulunmaktadır (Olson 2003). Kardiovasküler sistemin gelişimi süresince gerekli genlerin işlevselliği ve MEF2A için hedef genlerin belirlenmesi önemlidir. MEF2A'nın Mİ gelişimi üzerindeki rolü çalışılırken, çevre şartları, diğer etkili olabilecek genler ve bunların birbirleriyle ilişkisi göz önünde bulundurulmalıdır.

Weng L. et. al. (2005) yılında CAD'lı 300 hasta birey ve 300 herhangi bir CAD hastalığı geçirmemiş bireyden oluşan kontrol grubu arasında ekzon11'de yer alan üç nükleotit (CAG) tekrar polimorfizmleri için anlamlı bir sonuç bulamamışlardır. K. Kajimoto et. al. (2005) yaptıkları çalışmada da aynı sonucu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da, hasta ve kontrol grupları arasında ekzon11'de yer alan üç nükleotit (CAG) tekrar polimorfizmleri için anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Ancak bu tekrarlar 21 bç'lik delesyonun bulunduğu bölgeye çok yakın olması ve 21 bç'lik kısalmanın protein lokalizasyonunda etkili olması sebebiyle bu en küçük (CAG) tekrarlarının protein üzerindeki etkisinin olup olmadığının, invitro olarak gösterilmesinin önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

P. Gonzalez et. al. (2006), İspanya popülasyonundaki 483 CAD/MI hasta ve 1189 sağlıklı bireyden oluşan gruplar arasında yapılan çalışmada, 279L allelini taşıyan kişilerin Mİ geçirme riskinin kontrol grubuna göre üç kat anlamlı olduğu gösterilmiştir (p=0.009). MEF2A proteinin transkripsiyon aktivasyon bölgesine yakın bir yerde bulunan ve transkripsiyon aktivasyon düşüşüne neden olan (Bhagavatula, Fan et al. 2004) ekzon 7'deki bu değişim bizim çalışmamızda bulunamamıştır.

Son zamanlarda genom ve proteom alanındaki ilerlemeler, kompleks hastalıklardaki genlerin tanımlanmasında etkili yöntemler haline gelmiştir. Mİ veya CAD oluşumunda etkili olan ve genetik kontrol altında olduğu düşünülen bir çok faktör için genetik çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, ACE (anjiyotensin-dönüştürücü enzim), APOA5 (apolipoprotein A5), LTA-alfa (limfotoksin-alfa), MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz), Protrombin mutasyonları, FVL (faktör 5 Leiden) gibi genler üzerinde yapılacak çalışmalar, çoklu faktörlerin altında gelişen koroner arter hastalıkları için önemlidir. Trombozda etkili olan FVL mutasyonunun Türk popülasyonundaki sıklığı %9.8'dir (Akar 1999). Kan basıncı ile ilişkili olan ACE I/D polimorfizmi için D allelinin Türk popülasyonunda Mİ ile ilişkili olduğu bulunmuştur (p=0.03) (Akar, Aras et al. 1998). Bu gibi oranların diğer genlerdeki değişimlerin sıklığıyla beraber verilmesi yeni aday gen çalışmalarına doğru bakış açısı sağlaması yönünden önemlidir. Ayrıca bu genlerin sıklığının bilinmesi Türk popülasyonunda Mİ gelişmesi ve doğru yaklaşımlar belirlenmesi açısından önemlidir.

MEF2A ile ilgili yaptığımız çalışmanın, diğer çalışmalarla benzer sonuçları vermesinden dolayı hala bir tartışma konusu olan MEF2A ve Mİ arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması ve popülasyon çalışması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışmada erken Mİ ile ilişkili olabilecek anlamlı MEF2A gen varyantlarına rastlanmamış ve Türk Popülasyonunda MEF2A genin genotipik veya allelik frekansları anlamlı bulunamamıştır.

## KAYNAKLAR

- Akar, N. (1999). Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara, Antip.
- Akar, N., O. Aras, et al. (1998). "Deletion polymorphism at the angiotensin-converting enzyme gene in Turkish patients with coronary artery disease." Scand J Clin Lab Invest **58**(6): 491-5.
- Altshuler, D. and J. N. Hirschhorn (2005). "MEF2A sequence variants and coronary artery disease: a change of heart?" J Clin Invest **115**(4): 831-3.
- Archacki, S. and Q. Wang (2004). "Expression profiling of cardiovascular disease." Hum Genomics **1**(5): 355-70.
- Attie, A. D. (2004). "Insig: a significant integrator of nutrient and hormonal signals." J Clin Invest **113**(8): 1112-4.
- Bachinski, L. L., A. Abchee, et al. (1997). "Polymorphic trinucleotide repeat in the MEF2A gene at 15q26 is not expanded in familial cardiomyopathies." Mol Cell Probes **11**(1): 55-8.
- Bhagavatula, M. R., C. Fan, et al. (2004). "Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease." Hum Mol Genet **13**(24): 3181-8.
- Breitbart, R. E., C. S. Liang, et al. (1993). "A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage." Development **118**(4): 1095-106.
- Consortium, I. H. G. S. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-45.
- Cox, D. M., M. Du, et al. (2003). "Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A." J Biol Chem **278**(17): 15297-303.
- Fowgene.
- Fox, C. S., J. F. Polak, et al. (2003). "Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study." Stroke **34**(2): 397-401.
- Giasson, B. I. and W. E. Mushynski (1997). "Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit." J Neurosci **17**(24): 9466-72.
- Gonzalez, P., M. Garcia-Castro, et al. (2006). "The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction." J Med Genet **43**(2): 167-9.
- Hansson, G. N. J. (2001). Pathogenesis of atherosclerosis. USA, Elsevier Science Limited.
- Hobson, G. M., R. Krahe, et al. (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-q23." Genomics **29**(3): 704-11.
- Inamoto, N., T. Katsuya, et al. (2003). "Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population." Stroke **34**(7): 1628-33.
- Jarvik, G. P., T. S. Hatsukami, et al. (2003). "Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(8): 1465-71.
- Kajimoto, K., K. Shioji, et al. (2005). "Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients." Circ J **69**(10): 1192-5.
- Klug and Cummings (2002).

- Knight, J. B., C. A. Eyster, et al. (2003). "Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 14725-30.
- Kumar V., C. S., Robins S. (2003). Temel Pataloju, Nobel Kitap Evi.
- Liu, H., S. Zhang, et al. (2005). "Association between DNA variant sites in the apolipoprotein A5 gene and coronary heart disease in Chinese." Metabolism **54**(5): 568-72.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-41.
- Mao, Z., A. Bonni, et al. (1999). "Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2." Science **286**(5440): 785-90.
- McDermott, J. C., M. C. Cardoso, et al. (1993). "hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors." Mol Cell Biol **13**(4): 2564-77.
- Mehta, J. L., T. G. Saldeen, et al. (1998). "Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **31**(6): 1217-25.
- Molkentin, J. D., B. L. Black, et al. (1995). "Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins." Cell **83**(7): 1125-36.
- Naya, F. J., B. L. Black, et al. (2002). "Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor." Nat Med **8**(11): 1303-9.
- Olson, E. N. (2003). "Coronary artery disease and the MEF2A transcription factor." Sci Aging Knowledge Environ **2003**(48): pe33.
- Olson, E. N. (2004). "Undermining the endothelium by ablation of MAPK-MEF2 signaling." J Clin Invest **113**(8): 1110-2.
- Ornatsky, O. I., D. M. Cox, et al. (1999). "Post-translational control of the MEF2A transcriptional regulatory protein." Nucleic Acids Res **27**(13): 2646-54.
- Oshel, K. M., J. B. Knight, et al. (2000). "Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice." J Biol Chem **275**(31): 23666-73.
- Ozaki, K., Y. Ohnishi, et al. (2002). "Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction." Nat Genet **32**(4): 650-4.
- Ozdogan, H., S. J. Batley, et al. (2002). Mutation analysis of CBP and PCAF reveals rare inactivating mutations in cancer cell lines but not in primary tumours.
- Pollock, R. and R. Treisman (1991). "Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets." Genes Dev **5**(12A): 2327-41.
- Read, T. S. A. A. P. (1999). Human Molecular Genetics 2, Oxford.
- Roitt, I. M. (1993). "The role of autoantigens in the driving of autoimmune diseases." Immunol Ser **59**: 119-29.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, Fritsch, et al. (1989). "Molecular cloning, a laboratory manual."
- Sayed-Tabatabaei, F. A., J. J. Houwing-Duistermaat, et al. (2003). "Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis." Stroke **34**(7): 1634-9.
- Schonbeck, U., G. K. Sukhova, et al. (2000). "Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7458-63.
- Suzuki, E., J. Lowry, et al. (1996). "Structures and chromosome locations of the human MEF2A gene and a pseudogene MEF2AP." Cytogenet Cell Genet **73**(3): 244-9.

- Vallance, P. and N. Chan (2001). "Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance." Heart **85**(3): 342-50.
- Van Berlo, J. H. and Y. M. Pinto (2003). "Polymorphisms in the RAS and cardiac function." Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 932-43.
- Veeranna, N. D. Amin, et al. (1998). "Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M." J Neurosci **18**(11): 4008-21.
- Visvikis-Siest, S. and J. B. Marteau (2006). "Genetic variants predisposing to cardiovascular disease." Curr Opin Lipidol **17**(2): 139-51.
- Wang, L., C. Fan, et al. (2003). "Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease." Science **302**(5650): 1578-81.
- Weng, L., N. Kavaslar, et al. (2005). "Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease." J Clin Invest **115**(4): 1016-20.
- Wheeler, J. G., B. D. Keavney, et al. (2004). "Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies." Lancet **363**(9410): 689-95.
- Yu, Y. T., R. E. Breitbart, et al. (1992). "Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors." Genes Dev **6**(9): 1783-98.
- Zhao, M., L. New, et al. (1999). "Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38." Mol Cell Biol **19**(1): 21-30.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Aksaray ili Ağaçören ilçesinde lise öğrenimini ise Aksaray, Yabancı Dil Ağırlıklı Osman Gazi Lisesinde tamamladı. 2000 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu.

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programında öğrenim görmektedir.