

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
SİVAS

**BİR TÜRK POPULASYONUNDAKİ PRİMER  
HİPERTANSİYONLU BİREYLERDE *CYP11B2*  
GENİNİN PROMOTOR BÖLGESİNDEKİ -344T/C  
POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**  
Egemen AKGÜN

**Danışman Öğretim Üyesi**  
Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI

**2007**  
**SİVAS**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 nolu kararı ile kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

<b>TEŞEKKÜR</b>	VI
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	VI
	I
<b>TABLO VE RESİM DİZİNİ</b>	VI
	II
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
<b>2.1. Primer (Esansiyel) Hipertansiyon</b>	4
<b>2.1.1. Primer Hipertansiyonun Etiyolojisi</b>	4
<b>2.1.2. Primer Hipertansiyon Üzerine Çevrenin Etkisi</b>	6
<b>2.1.3. Primer Hipertansiyonun Genetik Kökeni</b>	6
<b>2.1.4. Primer Hipertansiyonun İnsidans ve Prevalansı</b>	7
<b>2.1.5. Primer Hipertansiyonun Tedavisi</b>	8
<b>2.2. Primer Hipertansiyonun Monogenik Formları</b>	9
<b>2.2.1. Glukokortikoid ile Tedavi Edilebilen Aldosteronizm</b>	9
<b>2.2.2. Mineralokortikoid Fazlalığı Sendromu</b>	10
<b>2.2.3. Liddle Sendromu</b>	11
<b>2.2.4. Gordon Sendromu</b>	11
<b>2.2.5. Brakidaktilli Otozomal Dominant Hipertansiyon</b>	11
<b>2.3. Primer Hipertansiyonla İlişkili Polimorfizmler</b>	12
<b>2.3.1. Anjiyotensinojen Genotipi</b>	12
<b>2.3.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) Genotipi</b>	13
<b>2.3.3. <math>\beta_2</math> Adrenerjik Reseptörü Genotipi</b>	13

2.3.4.	G Proteini Genotipi	14
2.3.5.	Nitrik Oksit Sentaz Genotipi	14
2.3.6.	$\alpha$ -Adducin Genotipi	15
2.4.	Aldosteronun Hipertansiyondaki Rolü	15
2.4.1.	Aldosteronun Biyosentezi	15
2.4.2.	Aldosteronun Yapısı	17
2.4.3.	Aldosteronun Üretiminin Düzenlenmesi	17
2.4.4.	Aldosteronun Fizyolojik Etkileri	18
2.4.5.	Aldosteronun Kan Basıncı Üzerine Etkisi	19
2.5.	Aldosteron Sentaz (CYP11B2) Enzimi	20
2.6.	CYP11B2 Geninin Genetik Özellikleri	21
2.7.	CYP11B2 Gen Ekspresyonunun Kontrolü	23
2.8.	CYP11B2 Geni -344T/C Polimorfizmi ve Primer Hipertansiyon Arasındaki İlişki	26
2.9.	CYP11B2 Gen mutasyonları ve Polimorfizmlerinin Diğer Hastalıklarla İlişkisi	27
2.10.	Polimorfizm Tanımı ve Genetik Polimorfizmlerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	29
2.10.1.	Tek Nükleotid Polimorfizmleri	30
2.10.2.	Restriksiyon Bölge Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi	30
2.10.2.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction)	30
2.10.2.2.	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	35

<b>3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar</b>	<b>35</b>
<b>3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Enzimler</b>	<b>35</b>
<b>3.1.2. Kullanılan Cihazlar</b>	<b>36</b>
<b>3.1.3. Kullanılan Plastik Malzemeler</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Çalışma Grubu</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Kan Örneklerinin Alınması</b>	<b>38</b>
<b>3.4. DNA İzolasyonu</b>	<b>39</b>
<b>3.5. CYP11B2 Geni -344T/C Polimorfizminin Genotiplendirilmesi</b>	<b>40</b>
<b>3.6. Agaroz Jel Elektroforezi</b>	<b>42</b>
<b>3.6.1. Jelin Hazırlanması</b>	<b>42</b>
<b>3.6.2. Jelde DNA'nın Koşturulması</b>	<b>43</b>
<b>4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	<b>44</b>
<b>5. BULGULAR</b>	<b>45</b>
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>52</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>59</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>60</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>61</b>
<b>EKLER</b>	<b>83</b>

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yardım ve önerilerini esirgemeyip her türlü desteği sağlayan, hayata bambaşka bir gözle bakmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ergün Pınarbaşı'na, çalışmalarım boyunca beni destekleyip yönlendiren Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ahmet Çolak, Yrd. Doç. Dr. İzzet Yelkovan'a ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D. öğretim üyesi sevgili hocam Prof. Dr. Ferda Perçin'e, her zaman beni benden daha çok düşünen doktora öğrencisi arkadaşım Meral Yılmaz'a, sıkıştığım her an yanımda olan değerli arkadaşlarım Gonca Dönmez ve Gülşen Güneş'e, tez çalışmam için gerekli olan kan örneklerini toplamamda yardımcı olan C.Ü. Tıp Fakültesi Dahiliye A.D. öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Abdülkerim Yılmaz ve can dostum Mehmet Alkanat'a, ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, hayatım boyunca destek ve sevgilerini esirgemeyen annem ve babam, Emine ve Ahmet Akgün'e candan teşekkür ederim.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b>	GRA' ya (Glikokortikoid ile Düzelen Aldosteronizm) neden olan kimerik gen duplikasyonu	9
<b>Şekil 2.</b>	İnsan adrenal korteksinde kolesterolden aldosteron ve kortizol sentezi	16
<b>Şekil 3.</b>	Aldosteronun aldehit ve yarı asetal (hemiasetal) şekli	17
<b>Şekil 4.</b>	Aldosteronun nefron distal toplayıcı tubülündeki hücre içi etkileri	19
<b>Şekil 5.</b>	CRE (Ad1), Ad5 ve NBRE-1 cis-elementleri	25
<b>Şekil 6.</b>	<i>CYP11B2</i> -344T/C polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü	51

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.1.</b>	18 yaş ve üzerindeki bireyler için kan basıncı değerlerinin tanımı ve sınıflandırılması	4
<b>Tablo 2.1.</b>	Primer hipertansiyonun patogeneğinde rol alan olası faktörler	5
<b>Tablo 3. 5. 1.</b>	PCR koşulları	41
<b>Tablo 3. 5. 2.</b>	PCR Programı	41
<b>Tablo 3. 5. 3.</b>	RFLP koşulları	42
<b>Tablo 5.1.</b>	Hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylerin demografik ve klinik özellikleri	45
<b>Tablo 5.2.</b>	Hasta ve kontrol gruplarındaki <i>CYP11B2</i> geni -344 bölgesi genotip ve allel dağılımları	46
<b>Tablo 5.2.1.</b>	Hasta ve kontrol gruplarındaki erkek bireyler arasındaki <i>CYP11B2</i> geni -344 bölgesi genotip dağılımları	47
<b>Tablo 5.2.2.</b>	Hasta ve kontrol gruplarındaki kadın bireyler arasındaki <i>CYP11B2</i> geni -344 bölgesi genotip dağılımları	47
<b>Tablo 5.3.1.</b>	Hastalığın ortaya çıkmasında, hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)	48
<b>Tablo 5.3.2.</b>	Hastalığın ortaya çıkmasında, hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (T alleli için)	49
<b>Tablo 5.4.</b>	Çalışma popülasyondaki tüm bireylerin genotip ve kan basınçları karşılaştırması	50
<b>Tablo 6.</b>	<i>CYP11B2</i> geni -344 polimorfizminin coğrafi bölge ve etnik gruplara göre dağılımı	55



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Arteriyel kan basıncının normal olarak kabul edilen sınırların üzerine çıkmasına sistemik arteriyel hipertansiyon, sistemik hipertansiyon ya da kısaca hipertansiyon denir. Hipertansiyon, batı toplumundaki yetişkin nüfusun yaklaşık %20'sini etkileyen ve kardiyovasküler hastalıklar, felç, miyokardiyal enfarktüs ve son safha böbrek hastalıklarının şekillenmesinde önemli katkıları bulunan genel bir sağlık sorunudur (1).

Hipertansiyon, etiyojisine göre primer (esansiyel, idiyopatik, nedeni bilinmeyen) ve sekonder (ikincil, nedeni bilinen) olarak iki gruba ayrılır. Primer hipertansiyon, arteriyel kan basıncının herhangi bir sebep olmaksızın yükselmesi olarak tanımlanır. Sekonder hipertansiyonun ise nedeni saptanabilir ve daha çok genç yaşlardaki bireylerde görülür (2-4).

İnsan primer hipertansiyonu, multifaktöriyel kökene sahip bir hastalık olup, hastalığın yatkınlık genleri ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimiyle şekillendiği düşünülmektedir. Primer hipertansiyonda anne-baba, çocuklar ve kardeşler arasındaki kan basıncının korelasyonu oldukça dikkat çekicidir. Çocuklar ve anne-babaları arasındaki bu ilişki, yeni doğmuş bebeklerde gösterilmiştir (5). İkizler arasında yapılan çalışmalarda da kan basıncı açısından aynı uyum gözlenmiştir (6).

Diğer taraftan eşler, evlat edinilmiş çocuklar ile anne-babaları ve aynı ailenin evlat edinilmiş çocukları ile gerçek çocukları arasında yapılan çalışmalarda, bu bireyler arasındaki kan basıncı ilişkisinin, az ya da ilişkisiz olduğu gösterilmiştir (7-11). Bundan dolayı primer hipertansiyonun ailesel varlığı ortak yaşam biçiminden (örneğin beslenme) çok, genetik belirleyici faktörlere bağlıdır. İkiz ve aile çalışmaları, kan basıncındaki değişimlerin yaklaşık %30-60'ının genler tarafından belirlendiğini göstermektedir (12).

Hipertansiyonun popülasyondaki dağılımı, bu multifaktöriyel ya da karmaşık hastalığa neden olan pek çok yatkınlık geninin olabileceğini işaret etmektedir (1, 13). Diğer genlerdeki anomaliler ya da diyetle sodyum alımı gibi

çevresel faktörlerle birlikte olmadan da tek bir gendeki genetik değişimlerin tek başlarına kan basıncı üzerine etkili olmaları mümkündür. Bundan dolayı, gen-gen ve gen-çevre ilişkilerini kanıtlamak oldukça zordur (13). Örneğin, iki farklı genetik değişim birlikte çalışarak kan basıncını yükseltme üzerine, tek başlarına yapabilecekleri etkiden çok daha güçlü bir etki oluşturabilirler.

Diğer taraftan genetik polimorfizmler ve hipertansiyon arasındaki ilişkinin varlığını destekleyen çalışmalar artarak devam etmektedir. Bir popülasyonda iki ya da daha fazla alternatif fenotipin varlığı polimorfizm olarak tanımlanır. Bir lokus dikkate alındığında en yaygın allelin popülasyondaki oranı, %99'un altındaysa bu lokus polimorfik olarak değerlendirilir ve allel sayısı arttıkça toplumda o gen için polimorfizm artar (14). Renin-Anjiyotensin-Aldosteron (RAA) sistemi geniş arter yapısı, su ve tuz homeostazisi ve kan basıncının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol üstlenir. Bundan dolayı da bu sistemi oluşturan proteinleri kodlayan genler, primer hipertansiyonun gelişimindeki en önemli adaylardandır.

Modern moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılmasıyla, RAA sistemi ile ilişkili pek çok gen polimorfizmi tanımlanmıştır. Anjiyotensinojen, ACE (angiotensin-converting enzyme),  $\alpha$  Adducin ve Aldosteron Sentaz gen polimorfizmleriyle hipertansiyon arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek için pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda ilgili genlere ait polimorfizmlerle hipertansiyon arasındaki ilişkiyi doğrulayan bulgular olduğu kadar, bir ilişki olmadığını belirten sonuçlar da ortaya çıkmıştır. Primer hipertansiyonla ilişkili genetik polimorfizmler hakkında geniş bilgi Bölüm 2.3'de verilmiştir.

Aldosteron sentezindeki önemli rolü nedeniyle, aldosteron sentaz enzimini kodlayan aldosteron sentaz (*CYP11B2*) geni (Gene Bank Accession Number: NM\_000498.3), RAA sistemine ait genler arasında en çok ilgi çekenlerden birisi olmuştur. Aldosteron sentaz enzimi, insan adrenal bezlerinin zona glomeruloza hücrelerindeki aldosteron sentezinin en önemli üç basamağında görev alır. Deneysel çalışmalar, bir mineralokortikoid olan aldosteronun böbrekler

aracılığıyla kan basıncı üzerine etkisine ek olarak, kalp ve vasküler kollojen sentezinin en önemli uyarıcı oluğunu göstermiştir. Geniş arterler, özellikle aorttaki aldosteron reseptörlerinin varlığı (15) ve aldosteronun endojen vasküler sentezinin keşfi (16), bu hormonun geniş arter yapısının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

*CYP11B2* geninin değişik bölgelerinde şekillenen mutasyonların, enzimin aktivitesinde meydana getirdiği değişimler birkaç *in-vitro* alışmada gösterilmiştir (Bölüm 2.6). Bugüne kadar *CYP11B2* geninde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır (17-20). Bunlardan en önemlisi -344T/C polimorfizmidir. Bu polimorfizmin şekillendiği bölge, *CYP11A1*, 11β-hidroksilaz (*CYP11B1*), 21-hidroksilaz (*CYP21*), 17α-hidroksilaz/17.20 liyaz (*CYP17*) ve aromatazı (*CYP19*) da içeren, çalışılmış tüm steroid hidroksilaz genlerinin tam ekspresyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörü SF-1'in (steroidogenik faktör 1) bağlandığı bölgenin içerisinde yer alır.

*CYP11B2* geninin -344 bölgesinde oluşan polimorfizmin, SF-1'in bu bölgeye bağlanma yatkınlığı üzerine etkilerinin de araştırıldığı iki farklı çalışmada, SF-1'in T alleli içeren -344 bölgesine olan bağlanma eğiliminin C alleli içerene göre yaklaşık dört kez daha düşük olduğu rapor edilmiştir (21, 22). Bu bulgulara dayanılarak, *CYP11B2* geninin transkripsiyonel regülasyon bölgesindeki bu polimorfizmle primer hipertansiyonun ilişkili olabileceği öngörölmüştür (23-36).

Biz de çalışmamızda, tüm hipertansiyon olgularının yaklaşık %95'inden sorumlu olan Primer (Esansiyel) Hipertansiyon'un, Aldosteron Sentaz enzimini kodlayan *CYP11B2* geninin promotor bölgesindeki -344T/C (Ref SNP ID: rs1799998) polimorfizmi ile anlamlı bir birlikteliğinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Primer (Esansiyel) Hipertansiyon

Primer hipertansiyon, nedeni tam olarak ortaya konulamayan ancak ortaya çıkışında genetik, çevresel ve bireysel birçok faktörün rol oynadığı karmaşık bir hastalıktır. Arteriyel kan basıncının normal olarak kabul edilen sınırları günümüzde hala tartışma konusudur. Avrupa Birliği Hipertansiyon Derneği (ESH: European Society of Hypertension), Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) ve Uluslararası Hipertansiyon Derneği (ISH: The International Society of Hypertension), 18 yaş ve üzerindeki erişkinlerde sistolik kan basıncının 140 mmHg ve diyastolik kan basıncının 90 mmHg'nin üzerine çıkmasını hipertansiyon olarak sınıflandırmaktadır (37,38) (Tablo 1.1). Bununla birlikte arteriyel kan basıncı; yaşa, ölçümün yapıldığı ortama, ölçümü yapan kişiye ve arteriyel kan basıncı ölçülen kişinin o anki durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir (39).

**Tablo 1.1.** 18 yaş ve üzerindeki bireyler için kan basıncı değerlerinin tanımı ve sınıflandırılması (40).

Kan basıncı Sınıflandırması	Sistolik (mmHg)	Diyastolik (mmHg)
Normal	<120	<80
Prehipertansiyon	120-139	80-89
Hipertansiyon Evre I	140-159	90-99
Hipertansiyon Evre II	≥160	≥100

#### 2.1.1. Primer Hipertansiyonun Etiyolojisi

Hipertansiyon, etiyojisine göre primer (esansiyel, idiyopatik, nedeni bilinmeyen) ve sekonder (ikincil, nedeni bilinen) hipertansiyon olarak iki gruba ayrılır. Primer hipertansiyon, henüz tam açıklanamamış nedenlerle arteriyel kan basıncının sürekli, normal olarak kabul edilen değerlerden yüksek olmasıdır.

Sekonder hipertansiyonun ise nedeni saptanabilir ve daha çok genç yaşlardaki bireylerde görülür (2-4).

Sekonder hipertansiyon, hastalığın nedeninin bilindiği sistemik hipertansiyon olarak tanımlanır. Nedenlerin çoğu böbrek ve nöroendokrin fonksiyonlardaki bozukluklarla ilişkilidir (3).

Primer hipertansiyon, renovasküler bir hastalık, böbrek yetmezliği, feokromositoma ve aldosteronizm gibi ikincil nedenlerin bulunmadığı yüksek kan basıncı olarak tanımlanır. Hipertansif hastaların %90-95'i primer hipertansiyon grubuna girer (2, 3). Psikolojik stresle ilişkili olarak sempatik sinir sistemi aktivitesinde artış, endotelin ve tromboksan gibi vazokonstriktörlerin ve sodyum tutucu hormonların aşırı üretimi, potasyum ve kalsiyum alımının yetersiz olması, artmış ya da uygunsuz renin sekresyonu, prostaglandinler ve nitrik oksid gibi vazodilatatörlerin eksiklikleri, direnç damarlarında konjenital anomaliler, Renin-Anjiyotensin sistemindeki bozukluklar, diabetes mellitus, insülin direnci, obezite, damar büyüme faktörlerinde aktivite artışı ve hücrel iyon transportunda değişme, genetik ve çevresel faktörler gibi birçok fizyopatolojik faktör, primer hipertansiyonun oluşmasında rol oynar (3, 4) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Primer hipertansiyonun patogenezinde rol alan olası faktörler (41).

Adrenoreseptör durumu	Genetik faktörler
Alkol tüketimi	Hücrel transportun hormonal inhibisyonu
Baroreseptör refleksleri	Hücre içi katyon konsantrasyonu
Vücut ağırlığı	Böbrek hastalıkları
Katekolaminler ve onların metabolizmaları	Nöroendokrin faktörler (örneğin, vasopressin, endorfin, serotonin)
Elektrolitlerin hücrel transportu	Böbrek fonksiyonunda anormallikler
Diyet (sodyum, potasyum, kalsiyum)	Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi
İlaçlar (örneğin, hormonal kontraseptivler)	Tuz duyarlılığı
Duygusal, fizyolojik faktörler ve stres	Vasküler direnç

### **2.1.2. Primer Hipertansiyon Üzerine Çevrenin Etkisi**

Canlıların tüm yaşamları boyunca ya da belirli zaman diliminde etkili olabilen çevresel etmenler, iç (örneğin, cinsiyet) ya da dış (örneğin, beslenme, stres gibi) faktörlerden meydana gelir (42). Çevresel etmenler, gen ekspresyonunu stimüle ederek doğrudan ya da gen ürünleri ile etkileşime girerek dolaylı olarak fenotipi etkileyebilir. Örneğin, çevresel faktörlerden biri olan yüksek tuz alımı, sodyumun atılımını arttıran ve bu sebepten ötürü de tuzun hipertansif özelliğine karşı organizmayı koruyan renin geninin ekspresyonunu uyarır.

Aşırı kalori alımıyla oluşan obezite, yüksek düzeyde alkol ve tuz alımının (özellikle düşük potasyum ve kalsiyum alımı ile birlikte) ve sedanter yaşam tarzı, genetik olarak duyarlı kişilerde kan basıncını yükseltmektedir (43, 44).

Hipertansiyonu tetikleyen genlerin etkilerinden bağımsız olarak, kan basıncının zamanla yükselme eğilimi, diyet ve fiziksel aktivite gibi çevresel faktörlere de bağlıdır.

### **2.1.3. Primer Hipertansiyonun Genetik Kökeni**

Günümüzde genetik faktörlerin primer hipertansiyon patogeneğinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Kan basıncı değişikliklerinin kalıtsal olduğu, kan basıncının ailesel birikimi, monozygotik ve dizigotik ikizler ve biyolojik ve evlat edinilmiş kardeşlerin kan basıncını karşılaştıran epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalar, akrabalar arasında kan basıncının korelasyonunun, kan basıncı sınırları arasında görüldüğünü ortaya koymuştur. Yani yüksek kan basıncına sahip anne-babaların, yüksek kan basıncına sahip çocukları olma eğilimi ile düşük kan basıncına sahip anne-babaların, düşük kan basıncına sahip çocukları olma eğilimi aynıdır (45, 46). Bu bulgular, “insan kan basıncının düzenlenmesinde, kan basıncını yükseltme ve düşürme etkisine sahip bir dizi genin görev aldığı” kavramını destekler.

Uygulanan en ileri tekniklere karşın, hipertansiyonun ya da kan basıncı değişiminin genetik temelini belirlemek karmaşık ve zor bir süreçtir. Hipertansiyonla ilgili genetik çalışmalarda en büyük sorun, kan basıncının

biyolojik değişkenliğidir. Kan basıncında diürnal, mevsimsel ve postural varyasyonlar, diyet ve uyanıklık durumu ile ilişkili değişkenlik, optimum ölçüm tekniklerine rağmen fenotipin belirlenmesinde zorluklar oluşturmaktadır. Hipertansiyonun moleküler ve genetik heterojenitesine ek olarak fenotip belirlenmesindeki bu zorluklar nedeniyle hipertansiyondan sorumlu genler (majör hipertansif genler) henüz tanımlanamamıştır. Fakat, klinikte nadir olarak görülen birkaç monogenik sendrom tanımlanabilmiştir (1, 43, 45-47) (bakınız **Bölüm 2.2**).

#### **2.1.4. Primer Hipertansiyonun İnsidans ve Prevalansı**

Kan basıncı, toplumda sürekli ve normal olarak dağılım gösteren bir değişkendir. Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması (National Health and Nutrition Examination Survey: NHANES) verilerine göre ABD’de, erişkin nüfusun %24’ünün, günümüzde hipertansiyonun uluslararası olarak kabul edilmiş tanı kriterlerine uyduğu hesaplanmıştır. 70 yaş ve üzerindeki kişilerde prevalans %70’e yaklaşmaktadır. Hispanik olmayan Siyah ırkta yaşa göre ayarlanmış prevalans, hispanik olmayan Beyaz ırka ve Meksikalı-Amerikalı nüfusa göre sırası ile %32,4, %23,3, %22,6 oranında anlamlı olarak daha yüksektir (47-49). Hipertansiyon prevalansı, genç yaş gruplarında, erkeklerde kadınlara göre daha yüksekken, daha ileri yaş gruplarında bu eğilim tersine döner.

Tüm dünyada yaklaşık 1 milyar kişinin hipertansiyona sahip olduğu ve her yıl ise yaklaşık 7,1 milyon kişinin hipertansiyona bağlı olarak hayatını kaybettiği saptanmıştır (50).

Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneğinin 2003 yılında yapmış olduğu 7 coğrafik bölgeyi içine alan “Hipertansiyon Prevalans” çalışması ile erişkinlerin %31,8’i hipertansif bulunmuştur. Türkiye’de 60 yaş üzerinde hipertansiyon prevalansı %70’in üzerine çıkmaktadır.

Türk ve Dünya toplumunda hipertansiyonun insidansı hakkındaki veriler yetersizdir. Tanım ve ölçüm tekniklerindeki değişiklikler, farklı toplumlarda hipertansiyon insidansının karşılaştırmalı olarak incelenmesine olanak tanımamaktadır. Hipertansiyonun insidansı yaşın ilerlemesi ile kesin bir şekilde

artar ve yaşamın erken dönemlerinde erkeklerde kadınlara göre daha yüksek oranlarda görülürken, ileri yaşlarda bunun tam tersi söz konusudur. Hipertansiyon insidansının analizinde en güvenilir veriler, Framingham Kalp Çalışmasının verileridir. Amerika Birleşik Devletleri'nin Massachusetts eyaletindeki Framingham kasabasında yapılan bu çalışmada, 5209 denek 30 yıl boyunca izlenmiştir. Buna göre hipertansiyon insidansı, 30–39 yaşları arasında erkeklerde %3,3 ve kadınlarda %1,5 iken, 70-79 yaş arası erkeklerde %6,2 ve kadınlarda %8,6'ya yükselmiştir (51).

Antihipertansif ilaçlarla ilgili prospektif gözlemsel çalışmaların ve rastgele kontrollü çalışmaların verileri, genel kan basıncı düzeyleri ile koroner kalp hastalığı (CHD) ve felç riski arasında sabit, sürekli bir doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir (52, 53). Gelişmiş ülkelerin çoğunda kalp hastalığı ve felç, sırasıyla birinci ve üçüncü önde gelen ölüm sebebidir. (54).

### **2.1.5. Primer Hipertansiyonun Tedavisi**

Primer hipertansiyon, böbrek kan akımını artıran ya da tubuluslardan su ve tuz geri emilimini azaltan iki tip ilaçla tedavi edilmektedir.

Böbrek kan akımını artıran ilaçlar, böbreklere ulaşan sempatik sinir uyarılarını inhibe ederek ya da sempatik transmitter maddelerin böbrek damarları üzerindeki etkisini bloke eden çeşitli vazodilatör ilaçlardır. Ayrıca bu tür ilaçlar, böbrek damarlarının düz kaslarını paralize ederek ya da renin-anjiyotensin sisteminin böbrek damarları ve tubuluslar üzerine etkisini bloke ederek etki gösterirler.

Su ve tuz geri emilimini azaltan ilaçlar (natriüretik ve diüretikler) ise özellikle sodyumun tubulus duvarından aktif taşınmasını engelleyerek etkilerini gösterirler.

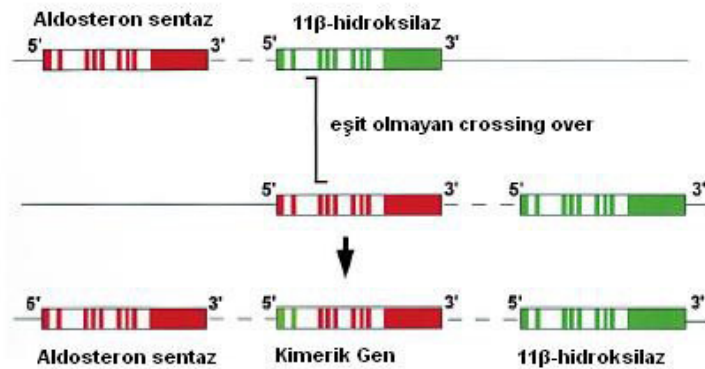


## 2.2. Hipertansiyonun Monogenik Formları

Nefronlardan su ve tuz geri emilimini artırıp azaltarak yüksek ve düşük kan basıncına neden olan 10 tane gende mutasyon tanımlanmıştır (1, 55). Mendeliyen tipi hipertansiyon sendromlarının üç nadir formundan (Glukokortikoid ile Düzeltilen Aldosteronizm, Mineralokortikoid Fazlalığı Sendromu ve Liddle Sendromu) sorumlu mutasyonlar kesin olarak tanımlanmışken, Gordon ve Brakidaktilili Otozomal Dominant Hipertansiyon sendromlarından sorumlu genler henüz tanımlanamamıştır. Ancak bu genler 1, 12 ve 17 numaralı kromozomlarda haritalanmıştır.

### 2.2.1. Glukokortikoid ile Tedavi Edilebilen Aldosteronizm (GRA: Glucocorticoid Remediablen Aldosteronizm)

GRA, otozomal dominant geçiş gösteren bir hastalık olup normal ya da artmış aldosteron değerlerine karşılık baskılanmış renin aktivitesiyle karakterizedir (56). Bunun yanında hipokalemi (düşük serum potasyum değeri) ve metabolik alkalozis (kan pH'sının artması) hastalığın değişken bulgularıdır (57). GRA'lı hastalarda, aldosteron salınımı, anjiyotensin II'den ziyade adrenokortikotropik hormonun (ACTH) kontrolü altındadır.



**Şekil 1.** GRA' ya (Glikokortikoid ile Düzeltilen Aldosteronizm) neden olan kimerik gen duplikasyonu.

GRA'lı ailelerin genetik analizi, GRA'nın adrenal steroid biyosentezi ile ilgili iki geni üzerinde bulunduran 8 nolu kromozomun bir segmentiyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (58). Etkilenen kişiler, aldosteron sentaz ve steroid 11 $\beta$ -hidroksilaz genlerine ek olarak, aldosteron sentaz ve steroid 11 $\beta$ -hidroksilaz genleri arasında mayotik bir yanlış eşleşme (mismatch) ve eşit olmayan gen alışverişine (crossing-over) bağlı olarak oluşan, yeni bir kimerik gen taşırlar (59) (Şekil 1). Oluşan kimerik gen, promotor bölgesini 11 $\beta$ -hidroksilaz geninden, yapısal bölgesini ise aldosteron sentaz geninden alır. Böylece aldosteron sentaz gen ekspresyonu ACTH hormonunun kontrolü altına girer. Bu durum, aldosteronun adrenal fasikülatadan ektopik olarak salınmasına, su ve tuz tutulumuna, plazmada hacim genişlemesine ve kan basıncında artışa yol açar.

### **2.2.2. Mineralokortikoid Fazlalığı Sendromu**

Mineralokortikoid Fazlalığı Sendromu (AME: Apparent Minerlocorticoid Excess), orta derecede ciddi hipertansiyonun erken başlaması ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır (60). GRA'lı hastaların tersine, AME hastalarında aldosteron düzeyleri çok düşüktür. Hipertansiyonun nedeni, mineralokortikoid reseptörünün kortizol tarafından uyarılmasıdır. Aldosteron ve kortizolün renal mineralokortikoid reseptörlerinin güçlü uyarıcıları olduğu *in-vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Mineralokortikoidlere selektif olarak yanıt veren hücreler, kortizolü kortizona metabolize eden 11  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz tip II enzimini içerirler. Oluşan kortizon MR'leri aktive edemediğinden, 11  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz, normalde dolaşımda aldosterondan daha yüksek yoğunluklarda bulunan kortizol tarafından MR'lerin uyarılmasını önler. Bu durum normal kişilerde, MR'lerin *in-vivo* olarak aldosteron tarafından özel olarak aktivasyonunu sağlar (60).

AME'li kişilerde 11  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği vardır. 11  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazın böbreğe spesifik bir izoformunun klonlanması ve bu gende enzim aktivitesinin kaybı ile sonuçlanan mutasyonların gösterilmesi, 11  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliğinin, AME'de görülen hipertansiyondan sorumlu olduğu kesin olarak ortaya konmuştur (61, 62).

### **2.2.3. Liddle Sendromu**

Liddle sendromu, hipokalemi, renin-anjiyotensin sisteminin baskılanması ve düşük aldosteron düzeyleri ile karakterize, otozomal dominant bir hastalıktır (63). GRA ve AME'nin tersine Liddle sendromunda gözlenen hipertansiyon, aldosteronun aşırı üretimi ya da mineralokortikoid reseptörlerinin temel aktivasyonunun aşırı olmasına bağlı değildir. Hastalığın fizyopatolojisinden sorumlu bozukluk, tuz ve suyun böbreklerden aşırı geri emilimidir.

Amiloride duyarlı epitelyal sodyum kanalının (ASSC) beta ve gama alt ünitelerindeki mutasyonlar, Liddle sendromunun genetik temelini oluşturur (64, 65).

### **2.2.4. Gordon Sendromu (PHA Type II:Psödohipoaldosteronizm Tip II)**

Ailesel hipertansiyon olarak tanımlanan Gordon sendromu, hiperkalemi, önemsiz hiperkloremik metabolik asidoz ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır (66). Gordon sendromu, bir multilokus analizinde 1 nolu kromozomun q kolunda ve 17 nolu kromozomun p kolunda haritalanmıştır (67).

### **2.2.5. Brakidaktili Otozomal Dominant Hipertansiyon**

Bu monogenik sendromda brakidaktili ve hipertansiyon her zaman (%100 kosegrasyon) birlikte kalıtılır. Ayrıca bu hastalığı taşıyan bireyler sağlıklı akrabalarından çok daha kısa boya sahiptirler. Hastalıktan sorumlu gen, geniş bir Türk ailesi üzerinde yapılan bir çalışmada kromozom 12'nin kısa kolunda (12p) haritalanmıştır (68). Bu çalışmadan sonra hastalık, biri Amerika Birleşik Devletleri diğeri de Kanada'da olmak üzere iki farklı ailede daha rapor edilmiştir (69). Hipertansiyonun diğeri 4 otozomal formundan farklı olarak kan basıncı, damar içi hacim artışı tarafından etkilenmemektedir. Bunun altında yatan mekanizma henüz bilinmemektedir.

### **2.3. Primer Hipertansiyonla İlişkili Genetik Polimorfizmler**

Hipertansiyon gelişimine katkıda bulunan polimorfizmlerin tanımlanması ve yerlerinin bulunması için, linkaj, aday gen ve asosiyasyon (ilişkilendirme) çalışmaları kullanılmaktadır (70). Fizyolojik hipertansiyon çalışmaları ve kromozomal/genomik harita çalışmaları, yüksek kan basıncı ile ilişkilendirilen bazı “aday” genleri ortaya çıkarmıştır (40, 71). Anjiyotensinojen (AGT), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE),  $\beta_2$  adrenerjik reseptörü, G-proteini  $\beta_3$  alt birimi ve anjiyotensin-II tip I reseptörü gibi renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde görev alan proteinleri kodlayan genlere ait polimorfizmlerin, hipertansiyonun fizyopatolojisinde rol oynayan en önemli etkenler oldukları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarla, bu genlere ait polimorfizmler ile hipertansiyon arasında pozitif olduğu kadar negatif ilişkiler de kanıtlanmıştır.

#### **2.3.1. Anjiyotensinojen Genotipi**

Salt Lake City ve Paris’de, birbiri ile ilişkisi olmayan çalışmalarda elde edilen üç bağımsız gösterge dizisi (anjiyotensinojen lokusunun hipertansif kardeşlerde hipertansiyonla bağlantısı, olgu-kontrol çalışmalarında spesifik anjiyotensinojen varyantlarının hipertansiyonla ilişkisi ve aynı varyantların, plazmada yüksek anjiyotensinojen düzeyleriyle ilişkisi) (62, 72, 73), primer hipertansiyonda, anjiyotensinojen varyantlarının rolünü desteklemektedir.

Yapılan bir meta analizde ise 11 çalışmanın sonuçları bütünleştirilmiş ve 5493 hastanın verilerinin değerlendirilmesi sonucunda Anjiyotensinojen (AGT) genindeki M235T (M: Methionin, T: Treonin) polimorfizminin hipertansiyonla anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (62).

Son yıllarda AGT genine ait iki farklı polimorfizm [anjiotensinojen geninin promotor bölgesindeki G(-6)A (G: Guanin, A: Adenin) ve T174M (T:Treonin, M:Methionin)] üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. İspanya-Mayorka’da yapılan bir çalışmada, T174M polimorfizmi ile hipertansiyon arasında anlamlı bir ilişki bulunurken, M235T ve G(-6)A polimorfizmleri ile bir ilişki bulunamamıştır (74). Tayvan’da yapılan bir başka çalışmada ise

araştırmacılar, M235T ve G(-6)A polimorfizmleri ile hipertansiyon arasında anlamlı bir birliktelik bulunduğunu fakat T174M polimorfizmi ile bir ilişki bulunamadığını belirtmişlerdir (75). İspanya (76) ve ek Cumhuriyetinde (77) yapılan iki farklı çalışmada ise T174M, M235T ve G(-6)A polimorfizmleri ile hipertansiyon arasında bir ilişki bulunamamıştır.

### **2.3.2. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) Genotipi**

ACE geni, 250 baz çiftlik bir DNA fragmentinin bulunup bulunmamasına bağlı olarak şekillenen bir insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmi taşır. Bu polimorfizm, delesyon (D/D) allelini taşıyanlarda, yüksek plazma ACE aktivitesi ile ilişkilidir (78, 79, 80). Ayrıca ACE genindeki bu I/D polimorfizmini taşıyan gen lokusunun, aterosklerotik hastalıklar, kardiyak hipertrofi gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol oynadığı öne sürölmüş olsa da hipertansiyonla ilişkisi pek de açık değildir (62, 81). Framingham Kalp alışması'ndaki 3000'in üzerindeki katılımcıdan elde edilen veriler, erkeklerde, ACE geni ile hipertansiyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fakat zayıf bir ilişki göstermiştir. Aynı ilişki kadınlarda gösterilememiştir (82). Hipertansiyon ile ACE insersiyon (I/I) alleli arasında güçlü bir ilişki, iki ayrı çalışmada daha rapor edilmiştir (83, 84). Ancak diğer pek çok çalışma grubunda ise ilişki bulunamamıştır (80, 85- 87).

### **2.3.3. $\beta_2$ Adrenerjik Reseptörü Genotipi**

İnsan  $\beta_2$  adrenerjik reseptöründe pek çok değişik polimorfizm bulunmuştur. Bunlar arasında hipertansiyonla ilişkili en önemli polimorfizm, arjininin glisine (amino asit 16'da) dönüştüğü pozisyon 1309'daki tek baz değişimidir (62,88,89). Afrika-Karaıpler popölyasyonunda yürütölen bir assosiyasyon çalışmasında, Gly16 varyantı ile hipertansiyon arasında pozitif bir ilişki gösterilmiştir (89). Buna karşılık "Berger Kan Basıncı" alışmasından elde edilen veriler, Gly16 varyantı ve kan basıncı arasında doza bağımlı negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir (88).

#### **2.3.4. G Proteini Genotipi**

G proteini  $\beta 3$  alt ünitesi (GNB3) geninde bulunan polimorfizmleri, G proteini aktivitesi ve hücre içi sinyal iletiminde artışa neden olmaktadır (88,89). Artan bu aktivite,  $G_i$  bağımlı hormonal yanıtı etkileyebileceğinden bu gen üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Çalışma gruplarının çoğunluğunu Beyaz ırka ait bireylerin oluşturduğu dört farklı çalışmada, GNB3 genindeki C825T (C: Cytosine, T: Tyimine) polimorfizmi ile hipertansiyon arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (90, 92-94). Kuzey Çin'in Han bölgesindeki geniş bir popülasyon üzerinde yapılan bir başka çalışmada, C825T polimorfizmi ile yine aynı genin C1429T ve A(-350)G polimorfizmlerinin hipertansiyonla ilişkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, Kuzey Çin Han popülasyonunda C825T ve C1429T polimorfizmleri ile hipertansiyon arasında anlamlı bir ilişki bulamazken, A(-350)G polimorfizmi ile hipertansiyonun ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (95).

#### **2.3.5. Nitrik Oksit Sentaz Genotipi**

Nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından sentezlenen Nitrik Oksit (NO), endotelial fonksiyonun düzenlenmesi ve kan basıncının kontrolünde oldukça önemli bir rol oynar (96). Miyamoto ve ark. nın, Japonya'daki iki farklı bağımsız popülasyon (Kyoto n=428, Kumamoto n=421) üzerinde yaptıkları çalışmada, eNOS geninin 7. ekzonundaki G894T (G: Guanine, T: Tyimine) polimorfizminin primer hipertansiyona yatkınlık oluşturacak bir faktör olduğunu belirtmişlerdir (97). Bu çalışmayı destekleyecek şekilde, Jia ve ark., 2003 yılında bir Çin popülasyonunda yaptıkları çalışmada, eNOS geninin 7. ekzonundaki G894T polimorfizmi ile hipertansiyon arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (98). Bu çalışmalara karşılık, Zhao ve ark., 2006 yılında geniş bir Çin popülasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, eNOS genindeki T(-386)C, intron 4b/a ve G894T polimorfizmleri ile primer hipertansiyon arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (99).

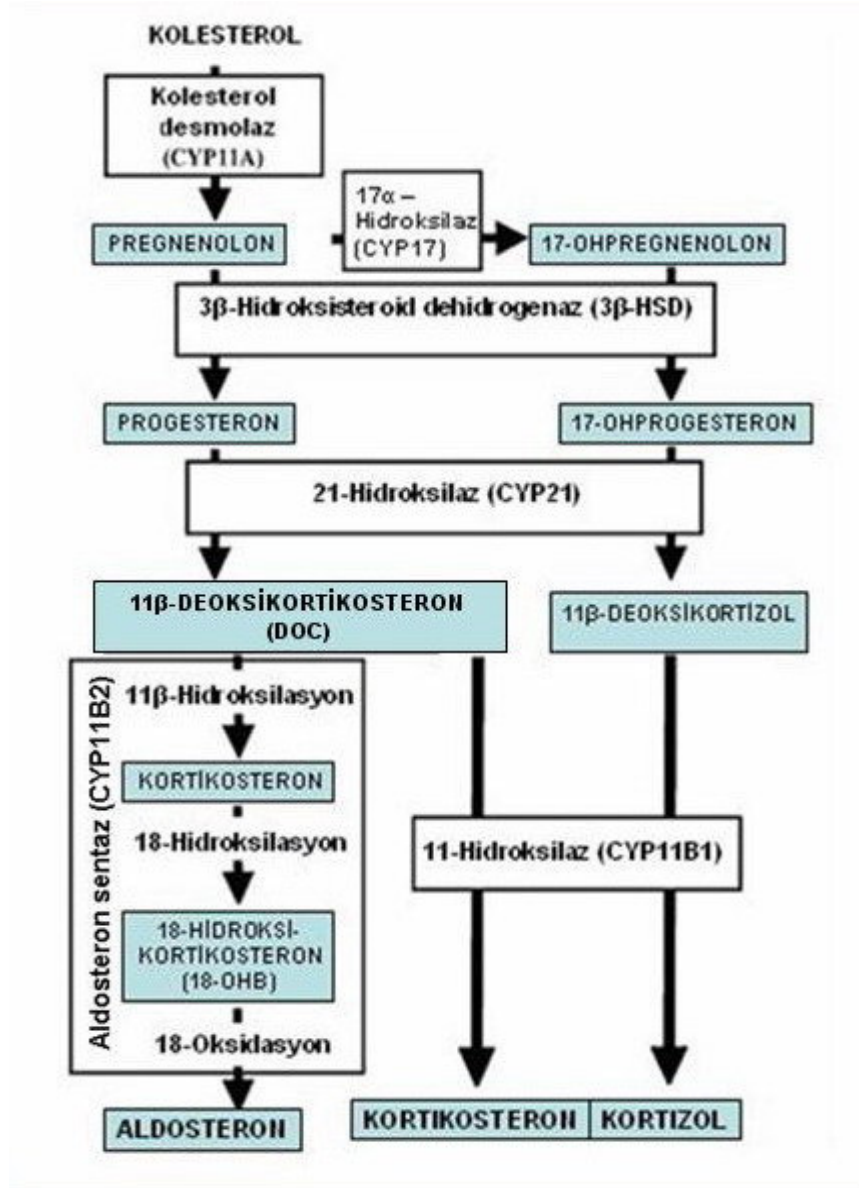
### **2.3.6. $\alpha$ -Adducin Genotipi**

Adducin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden oluşan heterodimerik bir iskelet proteinidir. Her bir alt birim, farklı kromozomlardaki farklı genler (*ADD1*, *ADD2* ve *ADD3*) tarafından kodlanmaktadır. İnsan ve ratlardaki  $\alpha$ -adducin alt birimi mutasyonları, renal tubüler hücrelerde sodyum, potasyum-ATPaz aktivitesinin uyarılmasına yol açar (62). Bunun sonucunda böbrek sodyum geri emilimi artar ve hipertansiyon şekillenir (100). Manunta ve ark. nın 1998 yılında yaptığı linkaj ve asosiyasyon çalışmalarında, insan  $\alpha$ -adducin genindeki bir nokta mutasyonunun (Gly460Trp) hipertansif hastalarda, kontrol grubundaki bireylere oranla çok daha sık gözlemlendiği ortaya konulmuştur (101).

## **2.4. Aldosteronun Hipertansiyondaki Rolü**

### **2.4.1. Aldosteronun Biyosentezi**

En önemli insan mineralokortikoidi olan aldosteronun sentezi, adrenal korteksin zona glomeruloza hücrelerinde, çoğu birime özgü hidroksilasyon olan bir dizi biyokimyasal reaksiyonla gerçekleştirilir. Adrenal kortekste bu reaksiyonlar dört enzim tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2). Bu enzimlerden  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi kısa zincirli dehidrogenaz ailesine, geri kalan üç enzim ise; kolesterol desmolaz (CYP11A), 21-Hidroksilaz (CYP21) ve aldosteron sentaz (CYP11B2), Sitokrom P450 ailesine aittir (102, 103).



**Şekil 2.** İnsan adrenal korteksinde kolesterolden aldosteron ve kortizol sentezi.

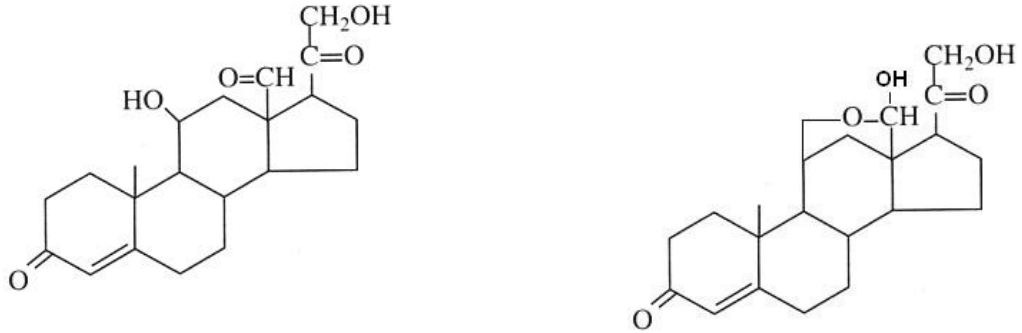
Aldosteron sentezindeki ilk aşama, ACTH ya da cAMP'nin adrenal bezi uyarmasıdır. Bu uyarı kolesterolün sterol taşıyıcı bir proteine bağlanarak mitokondriye getirilmesini sağlar. Mitokondrideki CYP11A1 enzimi (side chain cleavage enzyme) ile kolesterolün yan zincirinin ayrılması ve oksitlenmesi sonucunda pregnenolon oluşur. Oluşan pregnenolon, mitokondriden düz endoplazmik retikuluma taşınır ve burada 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz



enziminin etkisiyle progesteron meydana getirilir. Progesteronun 21 numaralı karbon atomuna, CYP21 enzimi tarafından hidroksil (-OH) grubunun eklenmesiyle 11 $\beta$ -deoksikortikosteron (DOC) oluşur. Aldosteron sentezinin en önemli son üç basamağında ise deoksikortikosteronun sırasıyla 11-hidroksilasyonu, 18-hidroksilasyonu ve 18-oksidasyonu gerçekleştirilir. Bu adımların tümü *CYP11B2* geni tarafından kodlanan “aldosteron sentaz” enzimi tarafından gerçekleştirilir.

#### 2.4.2. Aldosteronun Yapısı

Aldosteron yapı bakımından kortikosterona benzer. Tek fark, kortikosteronun 18 numaralı karbon atomunda metil grubu yerine bir aldehit grubunun bulunmasıdır. Bu aldehit grubu, 1 numaralı karbon atomundaki hidroksil grubuyla komşu olduğundan aldosteronun yarıasetal (hemiasetal) biçiminin oluşumuna olanak sağlar. Bu nedenle aldosteron, aldehit ve yarıasetal şeklinde bulunur ve miktar olarak denge halindedir (Şekil 3).



Aldehit Şekil

Yarı asetal (hemiasetal) şekil

**Şekil 3.** Aldosteronun aldehit ve yarı asetal (hemiasetal) şekli.

#### 2.4.3. Aldosteronun Üretiminin Düzenlenmesi

Aldosteron üretiminin düzenlenmesinde başlıca rolü plazma potasyum değerleri ve Anjiyotensin II üstlenir.

Plazma potasyum değerindeki ufak bir artış, aldosteron üretimi için kuvvetli bir uyarı oluşturur. Örneğin hücre dışı sıvıdaki potasyum iyonlarındaki 1 meq/L'lik bir artış, aldosteron salınımının üç kat artmasına neden olur (104). Renin-anjiyotensin sistemi tarafından kontrol edilen Anjiyotensin II (Ang II), hücre dışı sıvı hacmi ya da sodyum iyonlarındaki azalmaya yanıt olarak aldosteron salgısını uyarır (105). Diğer faktörler de aldosteron üretimini etkileyebilir. Özellikle Adrenokortikotropik hormon (ACTH), aldosteron üretimini uyaran akut bir etki oluşturur (106). Yani ACTH enjeksiyonunu takiben sadece birkaç gün aldosteron salınımı artar fakat etkisi daha sonra ortadan kaybolur.

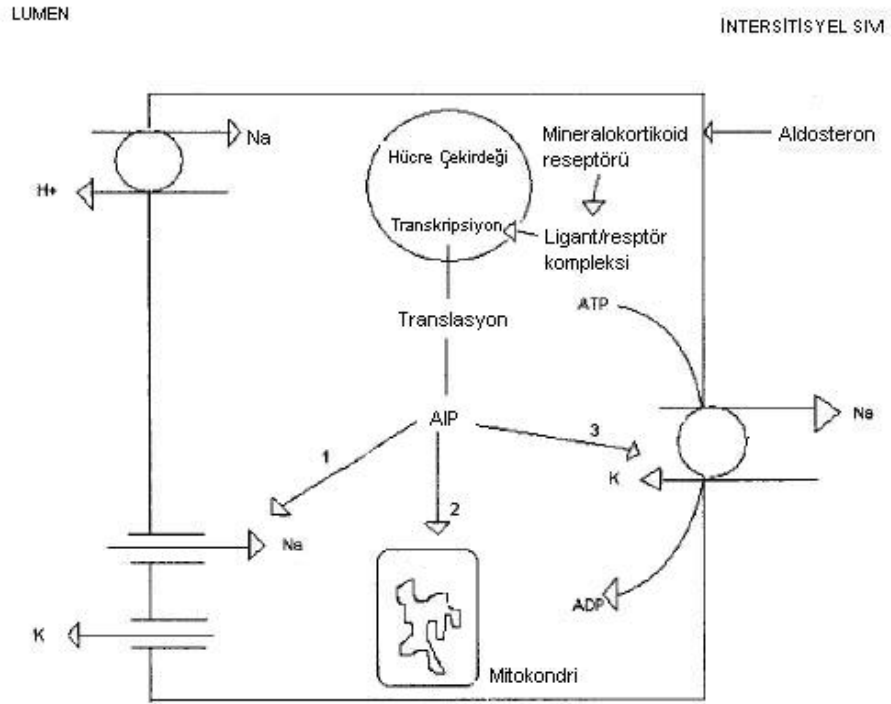
#### **2.4.4. Aldosteronun Fizyolojik Etkileri**

Aldosteron, steroid/tiroid/retinoid/orfan reseptör süper ailesine ait bir hücre içi reseptörü olan mineralokortikoid reseptörüne (MR) bağlanır. Bağlanma gerçekteştiğinde, ligant/reseptör kompleksi hücre çekirdeğine girer. Burada bir transkripsiyon faktörü gibi çalışarak DNA düzenleyici elementlerle doğrudan etkileşime girer (107).

Aldosteronun öncelikli hedef organı böbreklerdir. MR, renal distal nefron bölgesinde oldukça yüksek bir yoğunlukta bulunur. Bunun yanında diğer epitelyal bölgeler, örneğin, kolon, ter kanalları ve tükürük bezleri de MR açısından oldukça zengindir. MR'ın ayrıca kalp, beyin damar düz kasları, karaciğer ve periferel kan lökositleri gibi epitelyal olmayan bölgelerde de bulunduğu kanıtlanmıştır (108).

Aldosteronun bilinen en önemli etkisi, böbreklerden sodyum iyonlarının geri emilimini artırması ve epitelyal salgı bölgelerinden potasyum ve hidrojen iyonlarının atılmasını sağlamasıdır (105). Aldosteron etkisiyle gerçekteşen sodyum ve potasyum taşıması, böbreklerde tüm tubüller boyunca gözlense de daha çok kortikal toplayıcı tubüllerin luminal hücreleri ve henle kulpunun distal tubüllerinde gerçekteşir. Apikal olarak konumlanmış epitelyal sodyum kanalları (ENaC), sodyum iyonlarının böbrekten geri emilimini sağlayan en önemli faktörlerden biridir (109).

Aldosteron/MR kompleksinin DNA düzenleyici elemanlara bağlanmasıyla transkripsiyonu aktive edilen genlerden üretilen proteinler, aldosteron etkisiyle üretilmiş proteinler (AIP) olarak isimlendirilmiştir. AIP, hücre membranının apikal bölgesindeki hücresel enerji üretimine etki eder ve/veya hücrenin bazolateralindeki Na/K-ATPaz pompasını etkileyerek sodyumun geri emilimini sağlar. Aynı zamanda da potasyum ve hidrojen iyonlarının atılmasını artırır (110) (Şekil 4).



**Şekil 4.** Aldosteronun nefron distal toplayıcı tubülündeki hücre içi etkileri. AIP (aldosteron etkisiyle üretilen protein); 1. AIP'nin hücrenin apikal membranındaki sodyum kanalları üzerine etkisi; 2. AIP'nin mitokondriyal enerji üretimi üzerine etkisi; 3. AIP'nin enerji bağımlı Na/K-ATPase üzerine etkisi.

#### 2.4.5. Aldosteronun Arteriyel Kan Basıncına Etkisi

Aldosteronun atardamar basıncı üzerindeki etkisi iki yolla oluşur. Birincisi, dolaşım kanını yani plazma hacmini ve kalbin dakika hacmini artırır. İkincisi ise çevresel damarlara doğrudan etkileyerek damar direncini artırır.

MR'nin damar düz kaslarındaki aktivasyonu, çevresel damarlarda adrenerjik uyarıya benzer bir yanıt oluşmasını sağlar. Bununla birlikte aldosteronun MR ile bağlanmasını kalp dokusundaki kollojen biçimlenmesinde değişime neden olduğu kanıtlanmıştır (111). Muhtemelen, çevresel kan damarlarındaki benzer bir etki yükselmiş kan basıncının sürdürülmesini sağlamaktadır.

Yaklaşık 10 yıl önce, aldosteronun hızlı, genomik olmayan (non-genomic) etkisi keşfedilmiştir. Bu buluş, aldosteronun böbreklerden başka diğer organ ve dokular üzerine olan etkilerinin araştırılmasına öncülük etmiştir. İlk olarak Wehling ve ark. aldosteronun düz kaslar üzerine hızlı, genomik olmayan etkisini tanımlamışlardır (112). Bundan sonra aldosteronun genomik olmayan etkileri, iskelet kaslarında (113), kolon epitelyal hücrelerinde (114) ve miyokardiyal hücrelerde de (115) tanımlanmıştır. Genomik olmayan etkinin, artmış damar direncinin gelişimiyle bağlantılı olduğu (116) ve bundan dolayı da insan hipertansiyonu ve kardiyovasküler hastalıklarına bir katkısının olabileceği düşünülmektedir.

## **2.5. Aldosteron Sentaz (CYP11B2: Cytochrome P450, Subfamily XIB, Polypeptide 2) Enzimi**

CYP11B2, moleküler ağırlığı yaklaşık 50 kDa olan bir mitokondriyal sitokrom P450 enzimidir. Sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonların çoğu organik bileşiklerin hidroksilasyonudur. Ancak bu enzimler; N-oksidasyon, N-, S- ve O dealkilasyon, sülfoksidasyon, epoksidasyon, peroksidasyon, deaminasyon, desülfürasyon, dehalojenasyon ve N oksit gibi redüksiyon reaksiyonlarını içeren oldukça geniş bir spektruma yayılmış tepkimeleri gerçekleştirebilirler. Sitokrom P450 enzimleri, ilaçlar ve diğer xenobiyotiklerin metabolize edilmesi ve steroid hormonlar, safra asitleri ve prostaglandinler gibi önemli endojen bileşiklerin anabolizmasından sorumludurlar (117).

Steroid biyosentezinde rol alan P450 enzimleri, membrana bağlanan proteinler olup bir kısmı (CYP11A, CYP11B1 ve CYP11B2) mitokondriyal membranlara bağlanırken bir kısmı da (CYP17, CYP19 ve CYP21) endoplazmik retikuluma (mikrozomal) bağlanır. Bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunan P450 enzimleri, *heme* grubu içeren bir protein süper ailesinin üyeleridir. Bu enzimler, *in-vitro* olarak CO<sub>2</sub> ile kompleks halindeyken ışığı maksimum 450 nm'de absorbe ettiklerinden bu ismi almışlardır. Sitokrom P450 enzimleri, kolesterolden steroid biyosentezi esnasında steroid sübstratlarının kesilmesi ve hidroksilasyonunu katalizler (118).

İnsan *CYP11B2* geninin kodladığı aldosteron sentaz enzimi, öncü proteinler içeren 503 aminoasit halinde sentezlenir ve moleküler ağırlığı 48,5 kDa'dır. *CYP11B2* gen ürünü, mitokondrinin iç membranına lokalize olur. Enzim, mitokondri matriksinin içine translokasyondan sonra ayrılan, 24 aminoasitlik bir N-terminal mitokondriyal hedef dizisi içerir. Bundan dolayı da olgun enzim 479 aminoaside sahiptir (119-121). Aldosteron sentaz enziminin işlevi bakınız **Bölüm 2.4.1.**'de açıklanmıştır.

## 2.6. *CYP11B2* Geninin Genetik Özellikleri

Mornet ve White, *CYP11B1* geni üzerinde yaptıkları çalışmalar esnasında cross-hibrid bir gen izole etmişlerdir (122). *CYP11B1* geni ile *CYP11B2* olarak isimlendirilen bu yeni genin kodlayan dizileri %93, intronları ise %90 benzerlik göstermekteydi. Ancak yeni izole edilen bu genin 5' bölgesinin *CYP11B1* geninden oldukça farklı olduğu bulunmuş ve eğer bu gen eksprese oluyorsa farklı bir şekilde regüle edilebileceği düşünülmüştür.

*CYP11B2* geni, Kawamoto ve ark. tarafından 1992 yılında bir insan genomik DNA kütüphanesinden izole edilmiştir (123). *CYP11B2* geni ilk izole edildiğinde bu genin bir pseudogen ya da 11 $\beta$ -hidroksilaz enzimini kodlayan *CYP11B1* geni ile yakından ilişkili, düşük aktiviteli bir gen olabileceği düşünülüyordu (122). Kawamoto ve ark., her ne kadar bu iki genin ekzonları %93

oranında birbirine benzese de (her iki gen de 9 ekzon ve 8 intron içermektedir) *CYP11B2* geninin promotor bölgesinin nükleotid dizilerinin *CYP11B1* geninden oldukça farklı olduğunu belirtmişlerdir. COS-7 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalar, *CYP11B2* geninin kodladığı enzimin, aldosteron ve 18-oksokortizol sentezini katalizlemeye yarayan steroid 18-hidroksilaz aktivitesi ve bunun yanında 11 $\beta$ -hidroksilaz aktivitesine de sahip olduğunu göstermişlerdir. Diğer taraftan *CYP11B1*, aynı hücrelerde sadece 11 $\beta$ -hidroksilaz aktivitesine sahip bir enzim kodlamaktadır. Kawamoto ve ark. bu bulgular ışığında, bu iki enzimin iki farklı gen tarafından kodlandığını ve *CYP11B1* geni tarafından kodlanan enzimin glikortikoid sentezinde rol alırken *CYP11B2* geni tarafından kodlanan enzimin mineralokortikoid sentezinde görev aldığını rapor etmişlerdir (123).

Bu iki genin, dizi benzerlikleri nedeniyle hem 11 $\beta$ -hidroksilaz hem de aldosteron sentaz aktivitesine sahip tek bir atasal genin duplikasyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir (124). Bu düşünce iki genin genomik olarak yakınlığı (yaklaşık 40.000 bp) ve hemen hemen aynı olan yapısal benzerlikleri ile desteklenmektedir.

İlk olarak Mornet ve White, somatik hücre hibrid hatlarını kullanarak *CYP11B2* genini, 8. kromozomun q kolunda (8q21-22) haritalamışlardır (122). Taymans ve arkadaşları, radyasyon hibrid analizleri, bu geni içeren BAC (Bacterial Artificial Chromosome) klonunu izolasyonu ve floresan *in-situ* hibridizasyon (FISH) yöntemlerini kullanarak insan *CYP11B2* geni lokusunu haritalamışlardır. Bu çalışmaya göre *CYP11B2* gen lokusu, kromozom 8'in uzun kolunun merkeze en uzak segmentinde ve polimorfik marker D881704'ün proksimalinde bulunmaktadır. Bu bölge, FISH yöntemiyle doğrulanmış olup sitogenetik bantlamada kromozom 8q23.4 bölgesine karşılık gelmektedir (125).

*CYP11B2* geninin değişik bölgelerindeki mutasyonların, enzimin aktivitesinde meydana getirdiği değişimler pek çok *in-vitro* çalışmada tanımlanmıştır. *CYP11B2* enzimindeki Glu198Asp ve Val386Ala ikili mutasyonunun, enzimin 11 $\beta$ -hidroksilaz, 18 $\beta$ -hidroksilaz ve 18-oksidad aktivitesinde azalmaya neden olduğu Potrat-Doyen ve ark. tarafından

gösterilmiştir (126). *CYP11B2* geninin COS-1 hücrelerindeki analizi sonucunda Arg181Trp mutasyonunun enzimin 11 $\beta$  hidroksilasyon aktivitesini etkilemediği fakat 18 hidroksilasyon ve oksidasyon aktivitelerinin her ikisini birden azalttığı bildirilmiştir (127). Bechtel ve ark. ise Ile112Pro mutasyonu sonucunda enzimin 11 $\beta$  hidroksilasyon aktivitesinin 3 kat, 18 hidroksilasyon aktivitesinin ise 2 kat arttığını belirtmişlerdir (128). Bu araştırmalar, *CYP11B2* geninin değişik bölgelerinde meydana gelen mutasyonların, aldosteron sentezinin son üç enzimatik reaksiyon aşamasını da birbirinden bağımsız olarak ve farklı derecelerde değiştirebileceğini göstermektedir.

### 2.7. *CYP11B2* Gen Ekspresyonun Kontrolü

Aldosteronun güçlü tuz tutma aktivitesinden dolayı, yüksek yapılı canlıların hayatta kalabilmesi, aldosteronun plazma düzeyinin tam olarak ayarlanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu yüzden aldosteron üretimi değişik hormon ve plazma iyon konsantrasyonları ile kontrol altında tutulmaktadır (**bakınız Bölüm 2.4.3.**).

İnsan ve kemirgenlerde, adrenal bezlerden mineralokortikoid ve glukokortikoid hormon üretimi, CYP11B izoenzimlerini kodlayan genlerdeki değişik *cis* elementlere ve *trans*-acting faktörlere bağlıdır. Pek çok korunmuş *cis*-elementi, farklı türlerdeki *CYP11B* genlerinin 5' ucunu çevreleyen bölgelerinde tanımlanmıştır (129). Sığırlarda yapılan DNase I footprint analizleriyle, *CYP11B* genlerinin 5' ucunu çevreleyen bölgelerinde, nükleer proteinlerin bağlandığı ve Ad1'den Ad6'ya kadar isimlendirilmiş pek çok bölge bulunmuştur (130, 131). Benzer diziler insan *CYP11B1* (132) ve *CYP11B2* (133) genlerinde de gösterilmiştir.

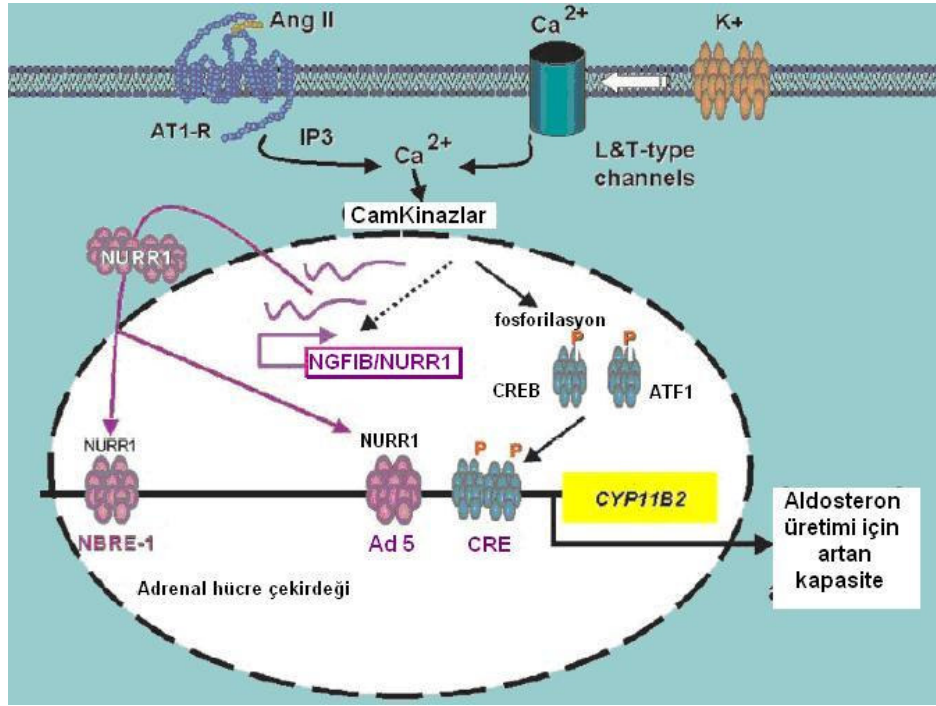
İnsan *CYP11B2* geninin promotor bölgesi üç önemli *cis*-elementi içerir. Bunlar; -71/ -64'deki CRE, -129/-114'deki Ad5 ve -776/-759'daki NBRE-1'dir (134). Yapılan çalışmalar, insan *CYP11B2* geninin CRE (cAMP-responsive element) bölgesine ATF-1, ATF-2 ve CREB (CRE-binding protein)

transkripsiyon faktörlerinin, Ad5 ve NBRE-1 (NGFIB response element) bölgesine ise sırasıyla SF-1(steroidogenik faktör-1)/COUP-TF(Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor) ile NGFIB (Nerve Growth Factor-Induced Clone B) ve/veya NURR1 (Nur-Related Factor 1) transkripsiyon faktörlerinin bağlandığını göstermiştir (135, 136) (Şekil 5).

Sodyum/potasyum iyonları ile renin ve anjiyotensin dönüştürücü enzimin karşılıklı etkileşimiyle üretilen anjiyotensin II (Ang II) enzimi, aldosteron üretiminin en güçlü düzenleyicileridir. ACTH ise aldosteron üretiminin bir diğer uyarıcısıdır. Ang II ve  $K^+$ , kalsiyum bağlayan protein [Kalmodulin (CaM)]'in etkisiyle şekillenen hücre içi kalsiyum sinyal yolunu kullanırlar. Şu ana kadar pek çok CaM-düzenleyici kinaz tanımlanmıştır. Ancak aldosteron üretiminde, Ang II ve  $K^+$ 'nin kullandığı CaM-düzenleyici kinazlar, CaMKI ve CaMKIV'tür (134).

Ang II ve  $K^+$ , hücre içi kalsiyum iyon yoğunluğunun artmasına neden olur. Artan kalsiyum iyon yoğunluğu ise akım düşürücü (lower-stream) sinyal molekülleri ve sonuç olarak da Nurr1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar. (134).





**Şekil 5.** CRE (Ad1), Ad5 ve NBRE-1 cis-elementleri gösterilmektedir. Ang II ve Ang II Tip 1 reseptörü (AT-1), IP3 (inozitoltrifosfat) aracılığıyla hücre içi kalsiyum yoğunluğunu yükseltirken,  $Ca^{2+}$  ve  $K^+$ , voltaj duyarlı L&T tipi kanalları kullanarak hücre içi kalsiyum yoğunluğunu yükseltir. Artan kalsiyum miktarı ise CaMKI ve CaMKIV'ün aktivasyonunu sağlar. Aktive olan CaMKI ve/veya CaMKIV, ATF-1 ve CREB'i fosforile ederek bu transkripsiyon faktörlerinin, insan *CYP11B2* geninin CRE elementine bağlanmasını artırır. Diğer taraftan Ang II, CaMKI ve/veya CaMKIV aracılığı ile NGFIB ve/veya NURR1 transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon ve translasyonunu artırır. NGFIB ve/veya NURR1, Ad5 ve NBRE-1 cis-elementlerine bağlanır. ATF-1/CREB ve NGFIB/NURR1'in uygun cis-elementlere bağlanmasıyla da insan *CYP11B2* genin ekspresyonu artar (134).

Wang ve arkadaşları, rat adrenal bezlerinden hazırlanmış cDNA kütüphanesinde bir serin-spesifik protein kinaz olan salt-inducible kinase (SIK)'ı bulmuşlardır (137). Daha sonraki çalışmalar, üç farklı SIK izoformunun değişik dokularda eksprese edildiğini göstermiştir. Bu izoformlardan SIK2, özellikle zona glomeruloza hücrelerinde oldukça fazla miktarda eksprese edilir. SIK proteininin cAMP-responsive element (CRE)-binding protein (CREB) aracılığıyla

gerçekleşen transkripsiyonel aktivasyonu önlediğini çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (138-140).

P450 steroidogenik enzimlerinin gonadlar ve adrenal bezlerde hücre spesifik ekspresyonunu sağlayan bir transkripsiyon faktörü, 1992 yılında bulunmuştur. DNA'ya bağlanan bu çekirdek proteini, SF-1 (steroidogenik faktör-1) ya da Ad4BP (Ad4 bağlanan protein) olarak adlandırılmıştır. Orfan çekirdek reseptörü ailesine ait bir protein olan SF-1, gonadlar ve adrenal bezlerinin koordineli gelişimi için gereklidir. SF-1'in, yetişkin adrenal bezleri ve gonadlarında, kolesterol yan zincir ayırıcı enzim (*CYP11A1*) (141, 142), 11 $\beta$ -hidroksilaz (*CYP11B1*) (143), 21-hidroksilaz (*CYP21*) (144), 17 $\alpha$ -hidroksilaz/17,20 liyaz (*CYP17*) (145,146) ve aromataz (*CYP19*) (147) genlerini içeren, çalışılmış tüm steroid hidroksilaz genlerinin tam olarak ekspresyonu için gerekli olduğu bulunmuştur. SF-1 aynı zamanda, steroidogenik akut düzenleyici protein (148), 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz tip II (149) ve ACTH reseptörü (150,151) gibi steroidogenezisin diğer önemli elemanlarının tam ekspresyonu için de gereklidir. Bununla beraber, SF-1'in insan *CYP11B2* gen ekspresyonu üzerine etkisi tam olarak açıklanamamıştır. İnsan *CYP11B2* geni Ad4 elementinin (AAGGT/CC), SF-1 için bir bağlanma bölgesi olduğu bulunmuştur. 5' bölgesinde bir seri delesyon oluşturulmuş insan *CYP11B2* geniyle yapılan reporter gen çalışmaları, Ad4 elementinin *CYP11B2* geninin ekspresyonunda gerekli olmadığını göstermiştir (152). Bundan dolayı da insan *CYP11B2* geni, tam ekspresyonu için SF-1 gerektirmeyen ilk insan steroid hidroksilaz genidir.

## **2.8. *CYP11B2* Geni -344T/C Polimorfizmi ve Primer Hipertansiyon Arasındaki İlişki**

Aldosteron sentaz enzimi, insan adrenal bezlerinin zona glomeruloza hücrelerindeki aldosteron sentezinin en önemli üç basamağında görev alır. Deneysel çalışmalar, bir mineralokortikoid olan aldosteronun böbrekler aracılığıyla kan basıncı üzerine etkisinden farklı olarak, kalp ve damarlardaki

kollojen sentezinin en önemli uyarıcı oluşunu göstermiştir. Geniş arterler, özellikle aorttaki aldosteron reseptörlerinin varlığı (15) ve aldosteronun endojen vasküler sentezinin keşfi (16), bu hormonun geniş arter yapısının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Aldosteron sentaz enzimini kodlayan *CYP11B2* geninin değişik bölgelerinde şekillenen mutasyonların, enzimin aktivitesinde meydana getirdiği değişimler birkaç *in-vitro* çalışmada gösterilmiştir. Şu ana kadar *CYP11B2* geninde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır (17-20). Bunlardan biri olan -344T/C tek baz değişiminin şekillendiği bölge, transkripsiyon faktörü SF-1'in (steroidogenik faktör 1) bağlanma bölgesidir.

*CYP11B2* geninin -344 bölgesinde oluşan polimorfizmin, SF-1'in bu bölgeye bağlanma yatkınlığı üzerine etkilerinin de araştırıldığı iki farklı çalışmada, SF-1'in T alleli içeren -344 bölgesine olan bağlanma eğiliminin C alleli içerene göre yaklaşık dört kez daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgulara dayanılarak, *CYP11B2* geninin transkripsiyonel regülasyon bölgesindeki bu polimorfizmle primer hipertansiyonun ilişkili olabileceği öngörülmüştür (23-36).

## **2.9. *CYP11B2* Gen mutasyonları ve Polimorfizmlerinin Diğer Hastalıklarla İlişkisi**

Aldosteron sentaz geninin değişik bölgelerinde şekillenen mutasyonların konjenital hipoaldosteronizme neden olduğu pek çok çalışma ortaya konmuştur.

Mitsuuchi ve ark. 1992 yılında, *CYP11B2* geninin 3. ekzonunda meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucunda 181. aminoasitin arjininden triptofana dönüşmesinin konjenital hipoaldosteronizme neden olduğunu rapor etmişlerdir (153). Yine aynı çalışmada Mitsuuchi ve ark., *CYP11B2* geninin 7. ekzonundaki bir başka nokta mutasyonu sonucunda 386. aminoasitin valinden alanine dönüşmesinin konjenital hipoaldosteronizme neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma üç farklı aileden gelen 3 hasta üzerinde yapılmış ve hastalığa sahip bireylerin hepsinin bu nokta mutasyonu açısından homozigot olduğu ve

ailelerinde bu hastalıktan etkilenmemiş bireylerin heterozigot olduğu rapor edilmiştir (153).

Mitsuuchi ve ark. nın konjenital hipoaldosteronizme sahip bir hasta üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada ise *CYP11B2* geninin 1. ekzonunda meydana gelen 5 baz çiftlik bir delesyonun, bu gende çerçeve kaymasına neden olarak aynı ekzonda bir DUR kodonu oluşturduğunu bulmuşlardır. Buna bağlı olarak bu bireyde aldosteron sentezinin hiç gerçekleşmediğini belirtmişlerdir (154).

Bunlara ek olarak, *CYP11B2* geni -344T/C polimorfizminin kalp yetmezliği ve sol ventiküler büyüme ile bir ilişkisinin olabileceğini belirten çalışmalar da yayınlanmıştır. McNamara ve ark. nın 2006 yılında Afrika kökenli Amerikalılar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *CYP11B2* geni -344T/C polimorfizmi ile kalp yetmezliği arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada -344C allelinin yüksek aldosteron üretimine neden olduğu ve miyokardiyal aldosteron reseptörlerinin uyarılmasının apoptozis oranını artırdığını öne sürmüşlerdir (155). Stella ve ark. nın 2004 yılında, daha önce hiç tedavi görmemiş Beyaz Irka ait hipertansif hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise -344T alleli ile sol ventrikül duvarının kalınlaşması arasında pozitif bir ilişki bulduklarını rapor edilmiştir (156). Buna karşılık Delles ve ark., genç hipertansif bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada, -344C alleli ile sol ventiküler büyüme arasında anlamlı bir ilişki söz etmişlerdir. Bu çalışmayı destekleyecek şekilde, Kupari ve ark. nın normotansif bireylerden oluşturdukları çalışma grubunda ise -344C genotipine sahip bireylerdeki sol ventrikül büyümesinin diğer genotip taşıyıcılarına göre çok daha fazla olduğu rapor edilmiştir (157).

## **2.10. Polimorfizm Tanımı ve Genetik Polimorfizmlerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler**

Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca'da “*çok şekillilik*” anlamı taşıyan bir sözcüktür.

Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir.

Popülasyon genetikçileri, bir gen lokusu için, nadir alleller en az %1 frekansına sahip ve bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görülürlerse polimorfik olarak tanımlarlar. Popülasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen varyant, polimorfik olarak adlandırılmaktadır.

Polimorfizmler, türlerin buldukları ortama adaptasyonlarını kolaylaştırarak, evrimsel süreçte ayakta kalabilmelerine olanak verir.

Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) ya da DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), VNRT (Variable Number of Tandem Repeats: değişken ardışık tekrarlar), SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism: tek iplikçik yapısal çeşitlilik), Allel Spesifik Oligonükleotid (ASO) gibi laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (158).

### **2.10.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP: Single Nucleotide Polymorphism)**

Adından da anlaşılacağı gibi bu polimorfizm tipinden tek bir nükleotid sorumludur. SNP'lerin çoğu, tek bir nükleotidin bir başka nükleotidle yer değiştirmesi şeklindedir. Ancak SNP tanımı, tek bir nükleotidin insersiyon ya da delesyonunu da içerir (Basit Indel Delesyonları). Bazı SNP'ler ise restriksiyon bölgelerinde değişimlere yol açar (Restriksiyon Bölge Polimorfizmleri, RSP: Restriction Side Polymorphism). İnsan genomunun yaklaşık %1,5'i, kodlayan DNA dizileri içerir ve SNP'lerin çoğu intron ve intergenik diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde şekillenir.

### **2.10.2. Restriksiyon Bölge Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi**

SNP'lerin ortaya çıkışı, yeni bir restriksiyon bölgesinin şekillenmesine ya da var olan bir restriksiyon bölgesinin kaybolmasına neden olabilir. Geçmişte RSP'lerin belirlenmesi için Southern hibridizasyon yöntemi (değişikliğe uğramış restriksiyon fragmentlerini belirlemek için prob kullanılmasını içeren yöntem) kullanılmaktaydı. Bu yöntemin kullanılmasıyla RSP'ler Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak isimlendirilmişlerdir. Şu anda ise RSP'ler, çok daha basit, PCR kökenli bir yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemde, polimorfik restriksiyon bölgeyi her iki uçtan içine alacak şekilde düzenlenmiş primerler kullanılarak amplifiye edilmiş ürün, uygun restriksiyon enzimlerince kesilir ve agaroz jel elektroforeziyle kesim ürünleri büyüklüklerine göre tiplendirilir.

#### **2.10.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction)**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ilgilenilen spesifik DNA dizilerinin, iki oligonükleotid primeri kullanılarak enzimatik olarak sentezlendiği bir *in-vitro* moleküler biyoloji tekniğidir. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA bölgelerinin sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilmesi ve çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlaması, bu

teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Yöntem 1983 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş ve Mullis, bu keşfinden dolayı kimya dalında Nobel ödülünü kazanmıştır (159, 160).

Günümüzde polimeraz zincir reaksiyonu, kalıtsal hastalıkların saptanması, bulaşıcı hastalıkların tanısı, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini), tarım (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evrim çalışmaları (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) ve DNA computing (silikon kökenli bilgisayar teknolojileri yerine DNA molekülü ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak yapılan bir hesaplama türü) gibi oldukça geniş bir alanda kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenilen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, bir çift sentetik oligonükleotid primeri kullanılarak, bu iki primerin 5' uçları ile sınırlandırılmış olan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. Bir PCR döngüsü sırasıyla, DNA çift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), sentetik oligonükleotid primerlerin hedef DNA bölgesine bağlanması (annealing) ve primerlerin yeni DNA zincirini oluşturacak şekilde uzaması (extension) aşamalarından meydana gelir. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Böylece, 20 döngülük bir PCR sonucunda tek bir hedef diziden yaklaşık bir milyon kopya ( $2^{20}$ ) oluşturulur. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana bileşen vardır:

1. Çoğaltılmak istenen DNA fragmentini (tek bir gen, genin bir bölümü ya da DNA'daki kodlamayan bir dizi) içeren **kalıp DNA**
2. Çoğaltılacak bölgenin başlangıç ve bitiş bölgesini belirleyecek olan iki adet **oligonükleotid primeri**
3. **Taq Polimeraz** ya da başka bir ısıya dayanıklı polimeraz enzimi
4. DNA polimerazın kalıp DNA'dan sentezleyeceği yeni zincir için kullanacağı **Deoksiribonükleotid-trifosfatlar (dNTP)**
5. Kullanılan DNA polimeraz için uygun bir kimyasal çevre sağlayacak olan **tampon karışımı**

PCR işlemi, reaksiyonun her bir adımında gereksinim duyulan ısıtma ve soğutma işlemlerini gerçekleştiren ve Isı Döngü Cihazı (Thermal Cycler) adı verilen bir makinede gerçekleştirilir.

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir. Başlangıçta, PCR reaksiyonu için *E. coli*'nin DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti kullanıldı (159, 160). Ancak bu enzim her PCR döngüsünün başlangıcında, iki DNA zincirinin ayrılması için gerekli olan yüksek ısıda inaktive olmaktadır. Bu yüzden yüksek ısıya dayanabilen termostabil DNA polimeraz arayışına gidildi. Şu anda termostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen *Taq* DNA polimerazdır. Normalde enzim miktarı 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir (enzimin yarılanma ömrü yaklaşık 30 döngüdür). *Taq* DNA polimerazın bir dezavantajı da 3'-5' proofreading ekzonükleaz aktivitesinin olmamasıdır. Bu yüzden enzim yaklaşık olarak her



10.000 bazda bir hata yapmaktadır. Eğer bu hata, reaksiyonun erken evrelerinde meydana gelirse elde edilen PCR ürününün büyük bir kısmı bu durumdan etkilenebilecektir. Verimliliği azaltan bir diğer faktörde yoğunluğu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır.

### **2.10.2.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Restriksiyon enzimleri, bakteriyel virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonlara karşı savunma ajanları gibi işlev gören prokaryotik proteinlerdir. Bu enzimin keşfine yol açan ilk gözlemler, bazı bakteri soylarının “*konakçı kontrolündeki sınırlama*” (*host-controlled restriction*) olarak anılan bir fenomen olan bakteriyofaj enfeksiyonlarına bağışıklığın gösterildiği zaman olan 1950’lerin başlarında yapılmıştır. Bu enzimler bakterilerde doğal olarak bulunur ve bakterileri, yabancı kaynaklardan gelen (örneğin bakteriyofajlar) DNA’yı spesifik tanıma bölgelerinden keserek korurlar. Kendi DNA’sında bulunan spesifik tanıma bölgeleri mutasyonla modifiye edildiğinden, konakçı bakteri DNA’sı bu kesim işleminden korunur. Restriksiyon endonükleazların üç ayrı sınıfı bulunmaktadır. Bunlar işlev olarak birbirinden çok az farklılık göstermektedir. Diğer yandan, tip II restriksiyon endonükleazlar gen klonlanmasında oldukça önemli olan kesici enzimlerdir. Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 ya da 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan spesifik bir nükleotid dizisini tanır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keserler (161).

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA’nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. Genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod **Restriksiyon Fragment uzunluk (Length) Polimorfizmi** olarak adlandırılmaktadır. Tüm RFLP deneyleri, bir ya da daha fazla restriksiyon enzim ile DNA’yı kesmeyi kapsar. Kesilen DNA parçaları doğrudan boyama ya da otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklerine göre ayrılır. Küçük fragmentler büyük fragmentlere oranla jel elektroforezinde daha

hızlı hareket eder. Jel üzerine yüklenecek olan baz uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA'lar arasındaki farklılıkların (polimorfizm) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz yer değiştirmeleri ya da inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemeleridir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir örneği meydana getirir ve bu durum bize, bireyler arasındaki genetik polimorfizmi değerlendirmemize izin verir (162).

RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Enzimler

Tris-base	Sigma
Asetik asit	E-Merck
EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)	Sigma
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma
Amonyum Asetat	E-Merck
%96'lık Mutlak Alkol	Riedel- de Haen
Agaroz	Sigma
Formamid (%37)	Sigma
Xylene Cyanol	Sigma
Bromfenol Blue	Bio Basic Inc.
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	MBI Fermentas
PCR tamponu	MBI Fermentas
MgCl <sub>2</sub>	MBI Fermentas
dNTP karışımı	MBI Fermentas
<i>Hae</i> III Restriksiyon Endonükleaz	MBI Fermentas
R <sup>+</sup> tamponu	MBI Fermentas
Proteinaz K	MBI Fermentas
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder	MBI Fermentas

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Otomatik Mikro Pipetler	Gilson
P10	
P20	
P200	
P1000	
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer
Santrifüjler	
Masaüstü Makro Santrifüj	Mistral 1000 MSE
Soğutmalı Makro Santrifüj	Harrier 18/80 Refrigerated
Masaüstü Mikro Santrifüj	Sanyo Microcentaur
Hassas Tartı	Denver Instrument Company
Manyetik Karıştırıcı	BIBBY Stuart
Vorteks	Clifton Cyclone
pH Metre	Metle Toledo MP 2200
Mikrodalga fırın	BEKO MD 1500
Elektroforez Güç Kaynağı	EC 1000-90
Elektroforez Tankı	Whatman Biometra
Jel Görüntüleme	Vilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic Printer UP-895CE
UV Transilluminator	UVP Chromato-vue. Transilluminator
Spektrofotometre	Labomed. Inc. Spectro UV- Visdouble Beam PC Scanning
İnkübatör	Gallenkamp

### 3.1.3 Kullanılan Plastik Malzemeler

Tüm deneyler, sterilize edilmiş kilitlenebilir polipropilen test tüplerinde gerçekleştirildi. Sıvılar, sterilize edilmiş pipet uçları kullanılan otomatik pipetlerle transfer edildi. 1 ml'den daha büyük hacimdeki sıvılar için tek kullanımlık plastik pipetler kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm tüpler ve pipet uçları, buhar otoklavlanmasıyla (121°C'de 30 dakika) sterilize edildi.

Mikro santrifüj Tüpleri	Axygen
0,2 ml	
1,5 ml	
2,0 ml	
Test Tüpleri	LP's
15 ml	
50 ml	
Pipet Uçları	Axygen
0,5–10µl Beyaz	
1–200µl Sarı	
100–1000 µl Mavi	
Plastik Pipetler	Stripette

### 3.2. Çalışma Grubu

Araştırmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dahiliye Kliniğine başvuran, Primer Hipertansiyon kesin tanısı konmuş, 15.02.2005 tarih ve 2004 – 2/8 karar nolu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulu kararı gereğince izin alınmış ve aşağıdaki ölçütleri karşılayan, yaşları 19 ile 70 arasında değişen 99 kadın ve 92 erkek toplam 191 kişi, hasta grubuna dahil edildi.

- Diabetes mellitus hastalığının olmaması
- Diyabetik nefropatinin olmaması
- Böbrek fonksiyon testlerinin normal olması
- Yeni tanı almış olması ve daha önce tedavi almamış olması
- Tiroid fonksiyon testlerinin normal olması
- Kortizol düzeyinin normal olması
- Renal dopler ultrasonografinin normal olması

Yukarıdaki ölçütlere sahip olan hastalar çalışmaya dahil edilirken yukarıdaki ölçütlerin bir ya da birkaçına sahip olmayan hastalar çalışmaya alınmadı.

Çalışmaya dahil edilmesi planlanan bireylerin sessiz bir ortamda 15 dakika istirahat etmeleri sağlandıktan sonra yapılan üç kan basıncı ölçümünün ortalaması, sistolik kan basıncı için 139 mmHg ve diyastolik kan basıncı için 89 mmHg'nin üstünde olan bireyler hasta grubuna dahil edildi.

Kontrol grubu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine rutin kontroller için başvuran, yaşları 22-70 arasında değişen, geçmişinde felç, diabetes mellitus, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, kronik böbrek yetmezliği olmayan 110'u kadın ve 102'si erkek olmak üzere toplam 212 kişi kontrol grubuna dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilmesi planlanan bireylerin sessiz bir ortamda 15 dakika istirahat etmeleri sağlandıktan sonra yapılan üç kan basıncı ölçümünün ortalaması, sistolik kan basıncı için 140 mmHg ve diyastolik kan basıncı için 90 mmHg'nin altında olan bireyler kontrol grubuna alındı.

### **3.3. Kan Örneklerinin Alınması**

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dahiliye kliniğine başvuran, primer hipertansiyon kesin tanısı konmuş

hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere, Dahiliye kliniği ilgili doktorları tarafından yapılacak çalışma hakkında gereken açıklamalar yapılmış, izin belgesini imzalamaları sağlanmıştır. Daha sonra, yaklaşık olarak 5 ml olacak şekilde alınan venöz kan örnekleri, 15 ml'lik EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) bulunan steril tüplere konularak C.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir.

### 3. 4. DNA İzolasyonu

Çalışma grubundaki bireylerden alınan 5 ml venöz kan, steril EDTA'lı tüplere aktarıldı. Kandan genomik DNA izolasyonu için “yüksek tuz konsantrasyonu yöntemi ile DNA izolasyonu yöntemi” kullanıldı (163).

- Hasta ve kontrol gruplarından alınarak EDTA'lı steril tüplere konan 5 ml venöz kanın üzerine, kanın üç katı oranında olacak şekilde (kan ve bidistile toplamı 15 ml olacak şekilde) steril edilmiş, daha önceden soğutulmuş +4°C'deki bidistile su eklendi.
- Tüplerdeki kanın su ile karışmasını sağlamak için tüp birkaç kez hafif bir şekilde elde çalkalandı.
- 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kanın elemanlarının çökmesi sağlandı.
- Santrifüj işlemi sonrasında tüplerin üzerinde oluşan süpernatant atılarak dipte kalan çökelti üzerine yine üç katı hacimde olacak şekilde bidistile su konularak aynı devir ve sürede santrifüj yapıldı.
- Bu işlem dört kez daha tekrarlandı.
- Son yapılan santrifüjden sonra tüplerin üst kısmında kalan süpernatant atıldı. Altta kalan çökelti üzerine hücre içeriğinin serbest kalabilmesi için hücre zarını yıkmak ve genomik DNA'yı proteinlerden arındırmak için 100 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat), 30µl proteinaz K (10mg/ml) ve 1500 µl Nuclei Lysis tamponu eklendi ve bir gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi.

- Ertesi gün etüvden çıkarılan tüplerin içerisine 1000 µl, 10 M Amonyum Asetat eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletildi ve ardından tüpler 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi.
- Üstte kalan süpernatant, dipte kalan çökelti karışmayacak şekilde yeni bir tüpe aktarıldı.
- Yeni bir tüpe alınan süpernatantın iki katı oranda olacak şekilde üzerine absolü alkol eklendi.
- Hafifçe ileri-geri çalkalandığında genomik DNA gözlemlendi. DNA, ince bir pipet ucu yardımıyla sıvı içerisinden alındı.
- Daha önce etiketlenen 1,5 ml’lik steril ependorf tüplerine konulan 250 µl TE tamponu içerisine, elde edilen DNA konuldu. DNA’nın tampon içerisinde çözünmesi için bir gece oda ısısında bekletildi. Elde edilen DNA örnekleri, genotipleme işlemine kadar -20°C’de saklandı.

### **3.5. *CYP11B2* Geni -344T/C Polimorfizminin Genotiplendirilmesi:**

*CYP11B2* geni -344T/C polimorfizmini tanımlamak için **PCR-RFLP** (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanıldı (164).

**PCR yönteminde *CYP11B2* geni -344 bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri;**

CYP11B2F Primer: **5’ CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC 3’**

CYP11B2R Primer: **5’ CCA CCA CCC TGT TCA GCC C 3’**



**Tablo 3. 5. 1. PCR koşulları**

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Yoğunluk</b>	<b>Miktar</b>
PCR tamponu	1X	2.5 µl
dNTP karışımı	2.5 mM	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl
Forward primeri	10 pmol	1 µl
Reverse primeri	10 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0.3 µl
dH <sub>2</sub> O	-	14.7 µl
DNA	~50 ng/µl	1µl

Tablo 3.5.1’de gösterildiği oranlarda hazırlanan karışımdan 24 µl alınarak etiketlenmiş 0,2 ml’lik ependorf tüplere paylaştırıldı. İzole edilmiş DNA örneklerinden 1µl alınarak bu karışımlara eklendi ve tüpler amplifikasyon işlemi için Thermal Cycler cihazına yerleştirildi (toplam volüm: 25µl). Cihaza aşağıda belirtilen program girilerek PCR tepkimesi uygulandı.

**Tablo 3. 5. 2. PCR Programı**

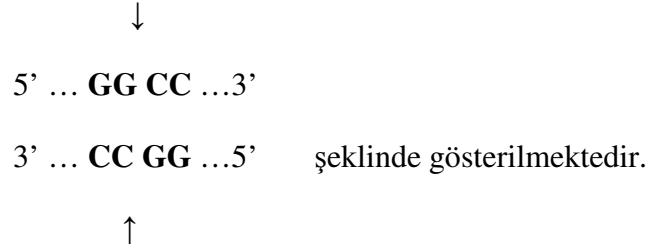
Ayrılma (Denaturation)	94 °C’de 5 dakika	
Ayrılma	94 °C’de 1 dakika	30 döngü
Primerlerin bağlanması (Annealing)	65 °C’de 40 saniye	
Uzama	72 °C’de 45 saniye	
Uzama (Extension)	72 °C’de 7 dakika	

**Tablo 3. 5. 3. RFLP koşulları**

PCR amplifikasyon ürünü	8,5 µl
R <sup>+</sup> tampon solüsyonu	1 µl
<i>Hae</i> III Restriksiyon Endonükleaz enzimi	0,5 µl

Tablo 3.5.3'te verildiği gibi hazırlanan karışım, etiketlenmiş 0.2 ml'lik ependorf tüplere konularak 37 °C sıcaklıkta 1 gece bekletilerek restriksiyon endonükleazın PCR ürünlerini tanıma noktalarından kesmesi sağlandı.

***Hae*III restriksiyon enziminin DNA üzerindeki tanıma bölgesi;**



**3. 6. Agaroz Jel Elektrofrez:**

PCR ve RFLP sonrasında elde edilen ürünler %2 yoğunluktaki agaroz jel elektrofrezinde koşturuldu (164).

**3. 6. 1. Jelin Hazırlanması:**

100 ml'lik jel tankında %2 yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik erlenmayer içine kondu. Üzerine 10X yoğunlukta olan TBE tamponundan (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) X1 (10 ml, 10X yoğunluktaki TBE tamponuna 90 ml bidistile su eklenerek hazırlanır) yoğunlukta hazırlanan 100 ml TBE tamponu kondu ve mikrodalga fırınında ısıtılarak berraklaşması sağlandı. Berraklaşan jelin el yakmayacak ısıya düşürülmesi için

musluk altında soğutuldu. Jel içerisine 5 µl etidyum bromür eklendi ve 100 ml'lik agaroz jel tankına döküldü. PCR ve kesim ürünlerinin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için taraklar yerleştirildi ve jelin donması bekledi (164).

### **3. 6. 2. Jelde DNA'nın Koşturulması**

6 µl PCR ürünü üzerine 2 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam 8 µl karışım kuyucuklara yüklendi. DNA fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 bç (baz çifti) ve 100 bç'lik DNA belirteçleri kullanıldı. 2 µl alınan belirteç 1 µl distile su ve 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Yüklenen DNA'lar 100 voltta 30 dakika koşturuldu ve UV ışığı yardımıyla görüntülendi (164).

#### 4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda; hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaş, BMI, sistolik ve diyastolik kan basınçlarının karşılaştırılması için Independent-Samples T testi, hasta ve kontrol grupları arasındaki genotip frekanslarının değerlendirilmesi için ise  $\chi^2$  testi kullanıldı. *CYP11B2* geni -344T/C polimorfizmi genotipleri ile sistolik ve diyastolik kan basınçlarının karşılaştırılması için one-way ANOVA testi kullanıldı İstatistiksel analiz, SPSS 12.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca risk oranları (OR:Odds Ratio) ve güvenlik aralıkları (CI: %95 Confidense Interval)  $\chi^2$  testi ve Fisher's Exact Testi kullanılarak tespit edildi (165).

$\chi^2$  Testi uygulamasında değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için, değerlendirme gözlerine düşen beklenen değer sayısının 5'den küçük olmaması gerekmektedir. Fakat çalışmamızda kaynak olarak gösterilen Jerrold H. Zar'a göre, toplam birey sayısı gözenek sayısına bölüldüğünde, her bir göz için beklenen değerlerin ortalama sayısı 6 olursa  $\chi^2$  analizi yapılabilmektedir. Bulguların değerlendirilmesinde bu açıklama göz önünde tutulacaktır (166).

## 5. BULGULAR

Çalışmamızda primer hipertansiyon tanısı konmuş 191 birey (92 erkek, 99 kadın), hasta grubu olarak ve 212 birey (102 erkek, 110 kadın) ise kontrol grubu olarak incelemeye alındı.

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş, BMI, sistolik ve diyastolik kan basıncı ortalamaları Independent-Sample T testine göre değerlendirildi (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** Hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylerin demografik ve klinik özellikleri

	Primer Hipertansiyon (erkek/kadın)	Kontrol (erkek/kadın)	p Değeri
Birey Sayısı	191 (92/99)	212 (102/110)	
Yaş (yıl)	49.24±11,60 (47.77±10.85/50.61±12.10)	49.59±12.49 (48.11±13.23/50.96±11.66)	> 0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,72±2,64 (25.59±1.83/25,85±3.22)	25,65±1,58 (25.58±1.73/25.72±1.44)	< 0.05
SKB (mmHg)	159.08±12.73 (158.57±11.77/159.55±13.60)	118.07±4.43 (118.32±5.10/117.84±3.71)	< 0.05
DKB (mmHg)	98.21±7.32 (98.45±8.31/98.21±7.32)	74.74±4.83 (75.39±5.40/74.14±4,16)	< 0.05

Tabloda verilen değerler, (Ortalama Değer ± Standart Sapma) şeklindedir. BMI (Body Mass Index), vücut kitle indeksi; SKB, sistolik kan basıncı; DKB, diyastolik kan basıncıdır.

Bireyleri yaş ortalamalarının, hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 49.24 ve 49.59 olduğu tespit edildi. BMI değerlerinin ortalaması, hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 25.72 ve 25.65 olarak belirlendi. Sistolik ve diyastolik kan basınçları ortalamaları, hasta grubunda sırasıyla 159.08 ve 98.21 olarak tespit edilirken kontrol grubunda sistolik ve diyastolik kan basınçları ortalamaları sırasıyla 118.07 ve 74.74 olarak belirlendi. İstatistiksel değerlendirmeye göre, her

iki grup arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Buna karşılık hipertansiyon grubunun BMI, sistolik ve diyastolik kan basıncı verilerinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ).

*CYP11B2* geninin promotor bölgesindeki -344. pozisyonundaki timin bazının sitozin bazıyla yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen polimorfizmin hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımı Tablo 5.2 'de gösterilmektedir. Gözlenen genotip frekansları, Hardy-Weinberg Dengesine uygunluk göstermektedir (Tablo 5.2).

**Tablo 5.2.** Hasta ve kontrol gruplarındaki *CYP11B2* geni -344 bölgesi genotip ve allel dağılımları

		Primer Hipertansiyon (n=191)	Kontrol (n=212)	p Değeri
Genotipler	-344CC	51 (0.267)	56 (0.264)	> 0.05
	-344CT	95 (54/41) (0.497)	107 (51/56) (0.505)	
	-344TT	45 (0.236)	49 (0.231)	
Allel Frekansları	C	0.515	0.516	> 0.05
	T	0.485	0.484	

Parentez içindeki sayılar genotip frekansını göstermektedir.

*CYP11B2* -344T/C genotiplerinin frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0.267 ve 0.264, CT genotipi için 0.497 ve 0.505, TT genotipi için ise 0.236 ve 0.231 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla C alleli için 0.515 ve 0.516, T alleli için 0.485 ve 0.484 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak, polimorfik allel dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $\chi^2$ : 0.022,  $p$ : 0,986). Bu bulgulara ek olarak, primer hipertansiyon grubundaki erkeklerle kontrol grubundaki erkekler arasında, bu üç genotipin dağılımı

değerlendirildiğinde, anlamlı bir fark bulunamadı ( $\chi^2$ : 1.884, p: 0.390) (Tablo 5.2.1). Aynı sonuç kadınlar arasında yapılan değerlendirmede de elde edildi ( $\chi^2$ : 2.235, p: 0.327) (Tablo 5.2.2).

**Tablo 5.2.1.** Hasta ve kontrol gruplarındaki erkek bireyler arasındaki *CYP11B2* geni -344 bölgesi genotip dağılımları

	Genotipler			Allel Frekansları		P Değeri
	-344CC	-344TC	-344TT	C	T	
Primer Hipertansiyon (n=92)	22 (0.239)	54 (0.587)	16 (0.174)	0.533	0.467	> 0.05
Kontrol (n=102)	26 (0.255)	51 (0.50)	25 (0.245)	0.505	0.495	

Parantez içindeki sayılar genotip frekanslarını belirtmektedir.

**Tablo 5.2.2.** Hasta ve kontrol gruplarındaki kadın bireyler arasındaki *CYP11B2* geni -344 bölgesi genotip dağılımları

	Genotipler			Allel Frekansları		P Değeri
	-344CC	-344TC	-344TT	C	T	
Primer Hipertansiyon (n=99)	29 (0.293)	41 (0.414)	29 (0.293)	0.50	0.50	> 0.05
Kontrol (n=110)	30 (0.273)	56 (0.509)	24 (0.218)	0.527	0.473	

Parantez içindeki sayılar genotip frekanslarını belirtmektedir.

*CYP11B2* geninin -344T/C polimorfizminin hastalığın çıkışında bir risk faktörü olup olmadığı,  $\chi^2$  ve Fisher's Exact Testine göre değerlendirildi (Tablo 5.3.1 ve 5.3.2).

**Tablo 5.3.1.** Hastalığın ortaya çıkmasında, hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)

	Genotip		Odds ratio (%95 CI)	p Değeri
	-344TT	-344CT + -344CC		
Primer Hipertansiyon (n=191)	45 (0.236)	146 (0.764)	0.975 (0.62-1.55)	> 0.05
Kontrol (n=212)	49 (0.231)	163 (0.769)		

Odds ratio kısmında verilmiş parantaz içindeki sayılar %95'lik güvenlik aralığını ifade etmektedir.

TT genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olduğundan, CT ve CC polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin primer hipertansiyon hastalığının ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için 0.236 ve 0.231, CT + CC genotipleri için 0.764 ve 0.769 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, -344C alleleline sahip bireylerin, -344T allelini taşıyan bireylere göre primer hipertansiyon hastalığına yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşımadıkları belirlendi. ( $\chi^2$  : 0.975, P: 0.504) (%95 CI: 0.62-1.55) (Tablo 5.3.1). Buna ek olarak, -344T/C polimorfizminde baskın allel olma açısından çeşitli popülasyonlar arasında fark gözlemlendiğinden aynı değerlendirme, CT ve TT genotip frekansları birleştirilerek de yapıldı. Genotip frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0.267 ve 0.264, CT + TT genotipleri için 0.733 ve 0.736 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, -344T alleleline sahip bireylerin, -344C allelini taşıyan bireylere göre primer hipertansiyon hastalığına yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşımadıkları belirlendi. ( $\chi^2$  : 0.985, P: 0.519) (%95 CI: 0.63-1.53) (Tablo 5.3.2).



**Tablo 5.3.2.** Hastalığın ortaya çıkmasında, hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (T alleli için)

	Genotip		Odds ratio (%95 CI)	p Değeri
	-344CC	-344CT + -344TT		
Primer Hipertansiyon (n=191)	51 (0.267)	140 (0.733)	0.985 (0.63-1.53)	> 0.05
Kontrol (n=212)	56 (0.264)	156 (0.736)		

Odds ratio kısmında verilmiş parantaz içindeki sayılar %95'lik güvenlik aralığını ifade etmektedir.

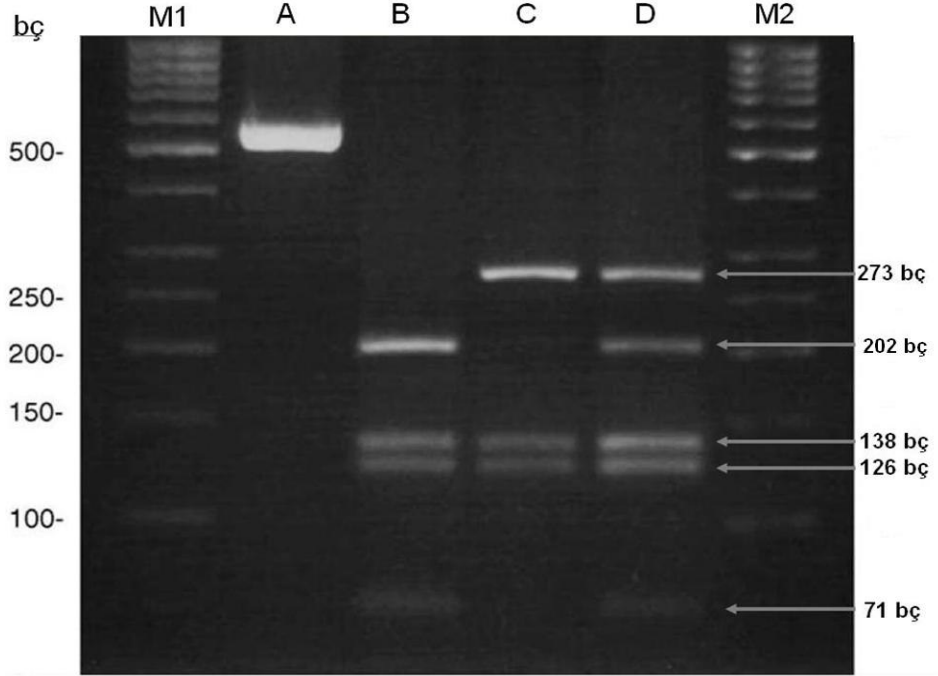
Son olarak, hasta ve kontrol grubundaki bireylerin sahip oldukları genotip ve kan basınçları karşılaştırması, One-way ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo5.4).

**Tablo 5.4.** Çalışma popülasyondaki tüm bireylerin genotip ve kan basınçları karşılaştırması

	Genotip			p Değeri
	-344CC	-344CT	-344TT	
Birey Sayısı	107	202	94	
Yaş (yıl)	49.91±12.13	49.20±12.40	49.77±11.17	> 0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.85±2.05	25.49±2.29	25.93±1.90	> 0.05
SKB (mmHg)	136.27±22.62	139.18±23.79	135.34±19.31	> 0.05
DKB (mmHg)	86.63±12.68	86.46±13.42	83.73±13.36	> 0.05

CC, CT ve TT genotiplerine sahip bireylerin sistolik/diyastolik kan basınçları ortalamaları sırasıyla 136.27/86.63, 139.18/86.46 ve 135.34/83.73 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, polimorfik allel dağılımları ile sistolik ve diyastolik kan basınçları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $p > 0.05$ ).

*CYP11B2* genin promotor bölgesindeki -344T/C polimorfizminin varlığının belirlenmesi için primerlerle sınırlandırılmış bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda 537 bp'lik bir DNA dizisi elde edildi. Bu dizi, *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında, -344 pozisyonunda T (timin) bazının bulunması, bu bölgede *HaeIII* için kesim bölgesi oluşturmamaktadır ve sonuç olarak enzimin iki tanıma bölgesi bulunmaktadır. Ancak, aynı pozisyonda C (sitozin) bazının olması durumunda amplifiye edilmiş dizi üzerinde yeni bir kesim bölgesi oluşmaktadır ve yeni kesim bölgesi ile enzim için toplam üç tane tanıma bölgesi bulunmaktadır. Böylece kesim sonrasında homozigot TT alleli için 273, 138 ve 126 bp'lik üç fragment, homozigot CC alleli için 202, 138, 126 ve 71 bp'lik dört fragment ve heterozigot TC alleli için 273, 202, 138, 126 ve 71 bp olmak üzere beş fragment elde edildi (Şekil 6).



**Şekil 6.** *CYP11B2* -344T/C polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü. Çalışma grubundaki üç bireyden elde edilmiş DNA'lar etidyum bromid ile muamele edilmiş %3'lük low melting agaroz jelde yürütülmüştür.

**A:** PCR sonucu elde edilen 537 bç uzunluğundaki fragment.

**B:** PCR ürününün *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle elde edilen homozigot CC alleli. 202, 138, 126 ve 71 bç'lik dört fragment

**C:** PCR ürününün *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle elde edilen homozigot TT alleli. 273, 138 ve 126 bç'lik üç fragment

**D:** PCR ürününün *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesiyle elde edilen heterozigot TC alleli. 273, 202, 138, 126 ve 71 bç olmak üzere toplam beş fragment

**M1 ve M2:** Marker (belirteç) olarak Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder.

Ölçüler baz çifti olarak verilmiştir.

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hipertansiyon, tüm dünyada yaklaşık olarak bir milyar kişinin etkilendiği ve endüstrileşmiş toplumlardaki yetişkin popülasyonun %25'ini etkileyen oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Hipertansif popülasyonun %90-95'i ise primer hipertansiyonlu bireylerden oluşur.

İkizler ve evlat edinilmiş çocuklar üzerinde yapılan geniş popülasyon çalışmalarının sonuçları, kan basıncının düzenlenmesinde oldukça güçlü bir genetik katkının olduğunu kanıtlamaktadır. Bulgular, kan basıncındaki değişimlerin %30'unun genetik olarak belirlenebileceğini işaret etmektedir (12).

Epidemiyolojik çalışmalar, popülasyondaki kan basıncı dağılımının sabit bir şekilde süreklilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bundan dolayı da kan basıncındaki değişimlerin genetik sebebini sadece Mendeliyen tipi hipertansiyon sendromlarına bağlamak yanlış olur. Muhtemelen birçok gen, çevresel faktörlerle etkileşime girerek, duyarlı kişilerde kan basıncını yükseltmektedir.

Reinin-Anjiyotensin-Aldosteron (RAA) Sistemi, sodyum/su homeostazisi yoluyla kan basıncının düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynar. Bundan dolayı, bu sistemin elemanlarını kodlayan genler ve bu genlerin sahip olduğu polimorfizmler, hipertansiyon gelişimi için en olası adaylardır (167). RAA sisteminde görev alan aldosteron, periferal kan damarları ve böbrekler yoluyla damar içi hacim ve damar direncini artırıp sodyum dengesini kontrol ederek kan basıncının ayarlanmasına yardımcı olur (105). Aldosteron ise bir mitokondriyal Sitokrom P450 enzimi olan aldosteron sentaz (CYP11B2) enzimi tarafından adrenal bezlerin zona glomeruloza hücrelerinde, bir dizi biyokimyasal reaksiyonla sentezlenir (123, 168). Şu ana kadar *CYP11B2* geninde pek çok polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan -344T/C tek baz değişiminin şekillendiği yer, SF-1 (steroidogenik faktör 1) adı verilen bir transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesidir (21, 22). -344 bölgesi, *CYP11B2* geninin promotor bölgesi içerisinde yer almaktadır. Yapılan birkaç çalışmada, -344T/C polimorfizminin *CYP11B2* geninin promotor aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. White ve ark., SF-1

transkripsiyon faktörünün, *CYP11B2* promotorundaki -344C alleleline, -344T allelinden 4 kat daha güçlü bağlandığını bulmuştur (21). Basset ve ark. ise SF-1'in C alleleline, T allelinden daha sıkı bağlandığını fakat SF-1'in adrenal *CYP11B2* gen ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olmadığını rapor etmişlerdir(22). Buna karşılık Clyne ve ark., sırasıyla SF-1 ve COUP-TF transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı -71/-64 ve -129/-114 pozisyonlarındaki iki farklı elementin, *CYP11B2* transkripsiyonunu artırdığını belirtmiştir (152). Bu bilgiler ışığında, henüz bilinmeyen başka bir orfan-çekirdek reseptörünün SF-1 bölgesine bağlanarak *CYP11B2* geninin transkripsiyon oranını değiştirmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir (33).

Çalışmamızın yapılma amacı, RAA sisteminin bir elemanı olan aldosteron sentaz enzimini kodlayan *CYP11B2* geninin -344 bölgesindeki T/C polimorfizminin, primer hipertansiyon hastalığının gelişiminde bir risk faktörü olup olmadığını saptamaktır. Çalışmamızda, tüm popülasyonu göz önünde bulundurduğumuzda elde ettiğimiz genotip dağılımlarını, CC için 0,266, CT için 0,501 ve TT için 0,233; allel frekanslarını ise C alleli için 0,52 ve T alleli için 0,48 olarak tespit ettik. Bu sonuçlara bakarak Türk popülasyonunda, *CYP11B2* geninin -344 bölgesindeki sık rastlanılan allelin C alleli olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz bu veriler daha önce Kafkas popülasyonunu içine alan iki farklı çalışmadaki genotip dağılımları ve allel frekansları ile uyum göstermektedir (169, 170). Russo ve ark., Güney İtalya'daki Beyaz Irka ait 811 kişi üzerinde yaptıkları on beş yılı kapsayan bir çalışmada (Olivetti Kalp Çalışması), *CYP11B2* geninin -344T/C polimorfizmi ile kan basıncı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada elde ettikleri genotip dağılımlarının, CC için 0,262 , CT için 0,514 ve TT genotipi için 0,224 olarak, allel frekanslarını ise C alleli için 0,52, T alleli için 0,48 olduğunu rapor etmişlerdir (169). Brand ve ark. nın bir başka Kafkas popülasyonu (Almanya-Berlin) üzerinde yaptıkları çalışmada, *CYP11B2* geni -344 bölgesi genotip dağılımlarını CC için 0,337, CT için 0,435 ve TT için 0,226 olarak, allel frekanslarını ise C alleli için 0,54, T alleli için 0,46 olarak belirtmişlerdir (170). Buna karşılık, Schunkert ve ark. Almanya'nın Augsburg

bölgesindeki, Beyaz ırka ait 1445 kişi üzerinde yaptıkları bir çalışmada (MONICA: MONItoring trends and determinants in CARDiovascular disease), popülasyonundaki genotip dağılımlarının CC için 0,218, CT için 0,494 ve TT için 0,288, allel frekanslarının ise C alleli için 0,46 ve T alleli için 0,54 olduğunu rapor etmişlerdir (171). Bu çalışmayı destekleyecek biçimde Edoardo ve ark., İtalya'nın Leogra bölgesindeki Beyaz Irka ait 437 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada, *CYP11B2* geni -344 genotip dağılımını CC için 0,153, CT için 0,510 ve TT için 0,336 olarak, allel frekanslarını ise C alleli için 0,408 ve T alleli için 0,592 olarak rapor etmişlerdir (172).

*CYP11B2* geninin -344 bölgesindeki polimorfizm açısından diğer ırklar incelendiğinde (Siyah ırk ve Güney Asyalılar), her iki ırkta da T allel frekansının C allel frekansına göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Zhu ve ark.nın İngiltere'nin güneybatısında yaşayan 191 Beyaz ve 235 Siyah ırka ait kişi üzerinde yaptıkları çalışmada, Siyah ırka ait kişilerden oluşan çalışma popülasyonundaki genotip frekansları CC için 0,055, CT için 0,311 ve TT için 0,634 olarak, allel frekansları ise C alleli için 0,21 ve T alleli için 0,79 olarak bildirilmiştir (173). Bu çalışmayı destekleyecek şekilde, Barbato ve ark.nın Londra'nın güneyinde yaşayan 1313 (456 Beyaz, 441 Siyah ve 416 Güney Asyalı) kişi üzerinde yaptıkları bir multi-etnik popülasyon çalışmasında, Siyah Irka ait bireyler için elde edilen genotip dağılımlarının CC genotipi için 0,039, CT genotipi için 0,340 ve TT genotipi için 0,621 olduğunu, allel frekanslarının ise C alleli için 0,21 ve T alleli için 0,79 olduğunu rapor etmişlerdir (30). Yine aynı çalışmada, Asyalı bireyler arasındaki genotip dağılımlarını CC için 0,190, CT için 0,493 ve TT için 0,317 olarak, allel frekanslarını ise C alleli için 0,44 ve T alleli için 0,56 olarak bildirmişlerdir. Matsubara ve ark.nın Japonya'nın Ohasama bölgesinde yaşayan 802 Asyalı birey üzerinde yaptıkları popülasyon çalışmasında elde ettikleri genotip dağılımları, CC genotipi için 0,14, CT genotipi için 0,44 ve TT genotipi için 0,42 olarak, allel frekansları ise C alleli için 0,36 ve T alleli için 0,64 olarak belirlenmiştir (174). Sonuç olarak, genotip ve allel dağılımları açısından çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, Russo ve ark. ve Brand ve ark.

nın yaptığı çalışmalar ile uyumlu bulunurken (169, 170), açıklanan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmamıştır (30, 171-174).

**Tablo 6.** *CYP11B2* geni -344 polimorfizminin coğrafi bölge ve etnik gruplara göre dağılımı

Popülasyon	Örnek Büyüklüğü	Genotip Dağılımları			Referans
		CC	CT	TT	
Almanya	1445 (Beyaz)	315 (0.218)	714 (0.494)	416 (0.288)	171.
İtalya	437 (Beyaz)	67 (0.153)	223 (0.510)	147 (0.336)	172.
İngiltere	456 (Beyaz)	98 (0.215)	216 (0.474)	142 (0.311)	30.
	441 (Afrikalı)	17 (0.039)	150 (0.340)	274 (0.621)	
	416 (Güney Asyalı)	79 (0.190)	205 (0.493)	132 (0.317)	
Japonya	802 (Doğu Asyalı)	111 (0.318)	354 (0.442)	337 (0.420)	174.
Türkiye	403 (Beyaz)	107 (0.266)	202 (0.501)	94 (0.233)	Bu çalışma

Bu sonuçlara bakılarak, bu allelik varyant dağılımının coğrafi bölge ve etnik gruplara göre değişebildiği söylenebilir (Tablo 6). Ancak değişik coğrafi bölgelerde bulunan insanlardaki allelik frekans dağılımındaki farkın nedeni henüz açıklanamamaktadır.

Çalışma popülasyonumuzu oluşturan hasta ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımı ve allelik frekanslar ayrı ayrı incelendiğinde; *CYP11B2* -344T/C genotiplerinin frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0.267 ve 0.264, CT genotipi için 0.497 ve 0.505, TT genotipi için ise 0.236 ve 0.231 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla C alleli için 0.515 ve 0.516, T alleli için 0.485 ve 0.484 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak, polimorfik allel dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $\chi^2$ : 0.022,  $p > 0.05$ ). Davies ve ark.nın İngiltere'nin Glasgow şehrinde yaşayan Beyaz ırka ait 138 hipertansif ve

200 normotansif birey üzerinde yaptıkları çalışmada, *CYP11B2* geninin -344 bölgesindeki genotip dağılımlarını, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0,08 ve 0,20, CT genotipi için 0,65 ve 0,54 ve TT genotipi için 0,27 ve 0,26 olarak, hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekanslarını ise sırasıyla C alleli için 0,40 ve 0,47, T alleli için 0,60 ve 0,53 olarak rapor etmişlerdir (27). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hipertansif bireylerdeki T allel frekansının C allelinin frekansına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (p: 0,009). Bu çalışmayı destekleyecek şekilde, Brand ve ark.nın Fransa'da yaşayan 380 hipertansif ve 293 normotansif birey üzerinde yaptıkları çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hipertansiyon grubundaki bireylerde, T allel frekansının C alleleline göre anlamlı derecede yüksek olduğu (p: 0,010) belirtilmiştir (33). Bu çalışmalara karşılık Tsukada ark.nın Japonya'da yaşayan 250 hipertansif ve 221 normotansif birey üzerinde yaptıkları çalışmada, hipertansif bireylerdeki C allel frekansının normotansif bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu (p: 0,010) rapor etmişlerdir (26). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, açıklanan diğer çalışmaların verileriyle uyumlu değildir (26, 27, 33).

Testosteron ve androjenler gibi eşey hormonlarının, böbreklerin proksimal tubülündeki sodyum emilimi ve RAA sistemi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip oldukları bilinmektedir (175,176). Bundan dolayı da erkek ve kadın eşey hormonlarının *CYP11B2* gen polimorfizmlerine olan duyarlılığı artırabileceği öne sürülmektedir (177). Çalışmamızda, primer hipertansiyon grubundaki erkeklerle kontrol grubundaki erkekler arasında, bu üç genotipin dağılımı değerlendirildiğinde, anlamlı bir fark bulunamadı ( $\chi^2$ : 1.884, p: 0.390). Aynı sonuç kadınlar arasında yapılan değerlendirmede de elde edildi ( $\chi^2$ : 2.235, p: 0.327). Kumar ve ark. nın Avustralya'nın Sydney kentinde yaşayan Beyaz ırka ait 133 hipertansif ve 294 normotansif birey üzerinde yaptıkları çalışmada, kadın hipertansif bireylerdeki C allel frekansının kontrol grubundaki kadınlara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu (p: 0,0010) belirtmişlerdir (32). Buna karşılık, Gu ve ark. nın Çin'in Kuzey Han bölgesindeki 503 hipertansif ve 503 normotansif



Asyalı birey üzerinde yaptıkları çalışmada, hipertansif kadın bireylerdeki T allel frekansının kontrol grubundaki kadınlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu (p: 0,002) rapor edilmiştir (34). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, açıklanan çalışmalarla uyumlu değildir (32, 34)

Çalışmamızda son olarak, TT genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olarak kabul edildiğinden, CT ve CC polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin primer hipertansiyon hastalığının ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için 0.236 ve 0.231, CT + CC genotipleri için 0.764 ve 0.769 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, -344C alleleline sahip bireylerin, -344T allelini taşıyan bireylere göre primer hipertansiyon hastalığına yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşımadıkları belirlendi. ( $\chi^2$ : 0.975, P: 504) (%95 CI: 0.62-1.55). Buna ek olarak, -344T/C polimorfizminde baskın allel olma açısından (C ya da T alleli) çeşitli popülasyonlar arasında fark gözleendiğinden aynı değerlendirme, CT ve TT genotip frekansları birleştirilerek de yapıldı. Genotip frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0.267 ve 0.264, CT + TT genotipleri için 0.733 ve 0.736 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, -344T alleleline sahip bireylerin, -344C allelini taşıyan bireylere göre primer hipertansiyon hastalığına yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşımadıkları belirlendi. ( $\chi^2$ : 0.985, P: 0,519) (%95 CI: 0.63-1.53). Buna karşılık, Wenru ve ark. nın iki farklı Çin popülasyonu (Hani popülasyonu; 172 hipertansif, 133 normotansif ve Yi popülasyonu; 99 hipertansif, 134 normotansif) üzerinde yaptıkları çalışmada, Hani popülasyonundaki genotip frekanslarını hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için 0,610 ve 0,729, CT + CC genotipleri için 0,390 ve 0,271 olarak, Yi popülasyonunda ise TT genotipi için 0,475 ve 0,612, CT + CC genotipleri için 0,525ve 0,282 olarak rapor etmişlerdir (178). Wenru ve ark. her iki popülasyonda da CT + CC genotip frekansının hasta gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğunu ve -344C alleli ile hipertansiyon arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, açıklanan çalışma ile uyumlu değildir (178).

Sonuç olarak, çalışma grubumuzda *CYP11B2* geni -344T/C polimorfizmi ile primer hipertansiyon arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Primer hipertansiyon, bir poligenik sendrom olarak tanımlandığından, çalışma grubundaki birey sayıları artırılarak daha da anlamlı sonuçlara ulaşılabileceğini düşünülmektedir. Bununla birlikte, -344T/C polimorfizmi açısından Türk popülasyonundaki heterozigotluk oranının diğer pek çok toplumdaki oranından fazla olduğu görülmektedir. Her ne kadar *CYP11B2* geni -344T/C polimorfizmi açısından coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasındaki bu farklılıkların sebebi açık olarak ortaya konulamamışsa da, bu gen üzerinde yapılmış ve yapılacak çalışmaların verilerinin bir araya getirilip incelenmesiyle, -344T/C polimorfizmi ve *CYP11B2* genin işlevi arasındaki ilişkinin çok daha net bir şekilde anlaşılacağı düşünülmektedir.

## ÖZET

### BİR TÜRK POPULASYONUNDAKİ PRİMER HİPERTANSİYONLU BİREYLERDE *CYP11B2* GENİNİN PROMOTOR BÖLGESİNDEKİ -344T/C POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

**Giriş:** Aldosteron sentaz (*CYP11B2*), aldosteron sentezindeki en önemli enzimdir. Bu enzimi kodlayan *CYP11B2* geninin promotor bölgesindeki -344T/C polimorfizmi daha önce birçok araştırmacı tarafından yüksek kan basıncıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda, Türk popülasyonundaki primer hipertansif bireylerde bu polimorfizm ile primer hipertansiyon arasındaki ilişki incelenmiştir.

**Yöntem:** Periferik kandan genomik DNA'ları izole edilen hasta (n=191) ve kontrol (n=212) gruplarındaki bireylerde, PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniği kullanılarak *CYP11B2* -344T/C polimorfizminin genotiplendirilmesi yapıldı.

**Sonuç:** *CYP11B2* -344T/C genotiplerinin frekansları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için 0.267 ve 0.264, CT genotipi için 0.497 ve 0.505, TT genotipi için ise 0.236 ve 0.231 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla C alleli için 0.515 ve 0.516, T alleli için 0.485 ve 0.484 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak polimorfik allel dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $\chi^2$ : 0.022, p: 0,986).

**Değerlendirme:** Çalışma popülasyonumuzda, *CYP11B2* -344T/C polimorfizmi primer hipertansiyonun gelişmesinde bir rol oynamamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Aldosteron sentaz, *CYP11B2* geni, Genotip, Polimorfizm, Popülasyon, Promotor.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF THE -344T/C POLYMORPHISM OF *CYP11B2* GENE PROMOTER REGION IN SUBJECT WITH PRIMARY HYPERTENSION IN A TURKISH POPULATION

**Background:** Aldosterone synthase (*CYP11B2*) is a key enzyme in the biosynthesis of aldosterone. -344T/C polymorphism in the promoter region of the *CYP11B2* gene has been reported to be associated with high blood pressure. We investigated the association between this polymorphism and primary hypertension in Turkish population.

**Methods:** *CYP11B2* genotyping was carried out using PCR-PFLP methods in 212 normotensive and 191 primary hypertensive subjects.

**Result:** The frequency of *CYP11B2* -344T/C genotype in essential hypertensive group and normotensive controls in Turkish population were CC: 0.267 vs 0.264; CT: 0.497 vs 0.505 and TT: 0.236 vs 0.231, respectively. Allele frequencies were C: 0.515 vs 0.516 and T: 0.485 vs 0.484, respectively. There were no significant differences between normotensive control and primary hypertensive subjects in both allele and genotype frequencies ( $\chi^2$ : 0.022, p: 0,986).

**Conclusion:** The -344T/C polymorphism of the *CYP11B2* did not play a role in genetic predisposition to developing primary hypertension in our study population.

**Keywords:** Aldosterone synthase, *CYP11B2* gene, Genotype, Polymorphism, Population, Promoter.

## 9. KAYNAKLAR

1. Lifton, R. P. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, May 1996.272(5262):676–680.
2. Kaplan N.M., Lieberman E, Neal V.M.,Kaplan's Clinical Hypertension. Kaplan N.M.(ed), Lippincott Williams Wilkins New York. 2002.
3. Crawford H.C., DiMarco J.P., Crawford Kardiyoloji Cilt 2, ISBN:8783-13-0, 2003.
4. Warrell DA, Timothy MC, Firth JD, Benz EJ, Oxford Textbook of Medicine 4th Edition Volume 2, Oxford Universty Press, New York, 2003.
5. Scherer, B., Friedmann, B., Dumbs, A., Holzmann, K., Weber, P. C. Urinary prostaglandins in human neonates: relationship to kidney function and blood pressure. *Klin. Wochenschr.*, 1981, 58:449.
6. Feinleib, M., Garrison, R., Borhani, N., Rosenman, R., Christian, J. Studies of hypertension in twins. In: O. Paul (ed.), *Epidemiology and Control of Hypertension*. 1975.Stratton, New York, London.
7. Biron, P., Mongeau, J., Bertrans, D. Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children. *Can. Med. Assoc.* 1976. J., 115:773.
8. Feinleib, M., Robert, P. H., Garrison, R. The contribution of family studies to the partitioning of population variations of blood pressure. In: C. F. Sing, M. Skolnicck (eds.), *Genetic Analysis of Common Diseases*, pages 653–673. Liss, New York, 1979.
9. Hamilton, M., Pickering, G. S., Fraser-Roberts, J. A. F., Sowry, G. S. C. The aetiology of essential hypertension: 4. The role of inheritance. *Clin. Sci.*, 1954.13:273–279.
10. Hayes, C. G., Tyroler, H. A., Cassel, J. C. Family aggregation of blood pressure in Evans County, Georgia. *Arch. Intern. Med.* 1971;128:965.

11. Miall, W. E., Heneage, P., Khosla, T., Lovell, H. G., Moore, F. Factors influencing the degree of resemblance in arterial pressure of close relatives. *Clin. Sci.*, 1967.33:271.
12. Ward, R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: J. H. Laragh, B. M. Brenner (eds.), *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, pages 81–100. Raven Press, New York, 1990.
13. Lander, E. S., Schork, N. J. Genetic dissection of complex traits. *Science*, September 1994.265(5181):2037–2048.
14. Terwilliger, JD., Ott, J., : *Handbook of Human Genetic Linkage*. First Ed. Terwilliger JD. , Ott, J. , The John Hopkins University Press, Baltimore. 1994
15. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, et al: Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992;71:503–510.
16. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al: Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension* 1995;25:170 –173.
17. Matsubara M, Omori F, Fujita S, Metoki H, Kikuya M, Fujiwara T, et al. Haplotypes of aldosterone synthase (CYP11B2) gene in the general population of Japan: the Ohasama study. *Clin Exp Hypertens* 2001;23:603–610.
18. Kumar NN, Benjafeld AV, Lin RCY, Wang WYS, Stowasser M and Morris BJ. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene CYP11B2 polymorphisms shows association with essential hypertension. *J Hypertens* 2003; 21:1331–1337
19. Lim PO, Macdonald TM, Holloway C, Friel E, Anderson NH, Dow E, et al. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4398–4402.

20. Nicod J, Bruhin D, Auer L, Vogt B, Frey FJ, Ferrari P. A biallelic gene polymorphism of CYP11B2 predicts increased aldosterone to renin ratio in selected hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2495–2500.
21. White PC, Slutsker L: Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocrin Res* 1995; 21:437– 442.
22. Basset MH, Zhang Y, Clyne P, White PC, Rainey WE, Differential Regulation of aldosterone synthase and 11 $\beta$ -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J. Mol. Endr.* 2002; 28:125-135.
23. Tiago AD, Badenhorst D, Nkeh B, Candy GP, Brooksbank R, Sareli P, Libhaber E, Samani NJ, Woodiwiss AJ, Norton GR, Impact of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Gene Variants on the Severity of Hypertension in Patients With Newly Diagnosed Hypertension. *AmJ Hypertens.* 2003;16:1006–1010.
24. Kosachunhanun N, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Jeunemaitre X, Corvol P, Feri C, Mortensen RM, Hollenberg NK, Williams GH, Genetic determinants of nonmodulating hypertension. *Hypertension.* 2003;42:901-908.
25. Nicod J, Bruhin D, Auer L, Vougt B, Frey FJ, Ferrari F. A biallelic gene polymorphism of CYP11B2 predicts increased aldosterone to renin ratio in selected hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab.*2003;88:2495–2500.
26. Tsukada K, Ishimitsu T, Teranishi M, Saitoh M, Yoshii M, Inada H, Ohta S, Akashi M, Minami J, Ono H, Ohru M, Matsuoka H. Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002;16(11):789-93.
27. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Connell JMC, 1999. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic

differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension*.1999;33:703–707.

28. Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, et al. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2): 266–70.
29. Komiya I, Yamada T, Takara M, et al. Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. *Hypertension* 2000;35(3):699– 703.
30. Barbato A, Russo P, Siani A, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J Hypertens* 2004;22(10):1895– 901.
31. Xu XJ, Wang SZ, Lin RY, et al. Association of the T(-344)C polymorphism of aldosterone synthase gene CYP11B2 with essential hypertension in Xinjiang Kazakh isolated group. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2004;21(6):622–4.
32. Kumar NN, Benjafield AV, Lin RC, et al. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. *J Hypertens* 2003;21(7):1331– 7.
33. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998;32(2):198–204.
34. Gu D, Ge D, He J, et al. Haplotypic analyses of the aldosterone synthase gene CYP11B2 associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese. *Clin Genet* 2004;66(5):409– 16.
35. Pojoga L, Gautier S, Blanc H, et al. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998;11(7):856– 60.



36. Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, et al. Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res* 2001;24(2):105– 9.
37. Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1011-53
38. Guidelines Subcommittee. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens* 1999;17:151-83.
39. Kaplan N.M., Lieberman E, Neal V.M., Kaplan's Clinical Hypertension. Kaplan N.M.(ed), Lippincott Williams Wilkins New York, 2002
40. Aram V. Chobanian, George L. Bakris, Henry R. Black, William C.ushman, Lee A. Green, Joseph L. Izzo, Jr, Daniel W. Jones, Barry J. Materson, Suzanne Oparil, Jackson T. Wright, Jr, Edward J. Roccella and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42:1206–1252
41. Holzgreve, H. Aspects of the pathogenesis of essential hypertension. In: M. Middeke, H. Holzgreve (eds.), *New Aspects in Hypertension*, page 81. Springer, Berlin, Heidelberg, 1986.
42. Zerba, K. E., Sing, C. F. The role of genome type-environment interaction and time in understanding the impact of genetic polymorphisms on lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 1993;4:152–162.
43. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension: part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101:329-35.

44. Oparil S. Diet, micronutrients-special foods. In: Oparil S, Weber MA, eds. Hypertension: companion to Brenner and Rector's The Kidney. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999.
45. Karet FE, lifton RP. Mutations contributing to human blood pressure variation. *Rec Progr Hormone Res* 1997;52:263-76.
46. Harrap SB. Genetics. In: Oparil S, Weber MA, eds. Hypertension: companion to Brenner and Rector's the kidney. Philadelphia. PA: WB Saunders, 1999: ch. 4.
47. Crawford H.C., DiMarco J.P., Crawford Kardioloji Cilt 2, ISBN:8783-13-0,2003.
48. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995;25:305-13
49. Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA* 2003;290:199-206.
50. World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland:WorldHealthOrganization.2002. (<http://www.who.int/whr/2002/>)
51. Dannenberg AL, Garrison RJ, Kannel WB. Incidence of hypertension in the Farmingham Study. *Am J Public Health* 1988;78:676-9.
52. MacMahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part 1. Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;335:765-74
53. Collins R, Peto R, MacMahon S, et al. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part 2. short-term reductions in blood pressure: overview of

- randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990;335:827-38.
54. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999;17:151-83.
  55. Lifton, R. P. Genetic determinants of human hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8545–8551, 1995
  56. Sutherland, D.J., Ruse, J.L., and Laidlaw, J.C. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can. Med. Assoc. J.* 1966;95:1109–1119.
  57. Rich, G.M., Ulick, S., Cook, S., Wang, J.Z., Lifton, R.P., and Dluhy, R.G. (). Glucocorticoid-remediable aldosteronism in a large kindred: clinical spectrum and diagnosis using a characteristic biochemical phenotype. *Ann. Intern. Med.* 1992;116:813–820.
  58. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992 Jan 16;355(6357):262-5.
  59. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104: 545–556.
  60. Bacallao RL, Carone FA. Recent advances in the understanding of polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997 Jul;6(4):377-83.
  61. Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkila, H., et al. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.*, August 1995;10(4):394–399.

62. Stewart, P. M., Krozowsky, Z. S., Gupta, A., et al. Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutations of the 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *Lancet*, 1996;347(8994):88–91.
63. Liddle, G. W., Bledsoe, T., Coppage, W. S. A familial renal disorder stimulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1963;76:199–213
64. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*. 1994 Nov 4;79(3):407-14.
65. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet*. 1995 Sep;11(1):76-82.
66. Luft F. C.. Mendelian Forms of Human Hypertension and Mechanisms of Disease. *Clin. Med. Res.* 2003.1:291-300,
67. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP. Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet* 1997;16:202-205.
68. Luft, F. C. Molecular genetics of human hypertension. *J. Hypertension* 1998;16:1871–1878,
69. Chitayat, D., Grix, A., Balfe, J. W., Abramowicz, J. S., Garza, J., Fong, C. T., Silver, M. M., Saller, D. N., Bresnick, G. H., Giedion, A., Lachman, R. S., Rimoin, D. L. Brachydactyly–short stature–hypertension (Bilginturan) syndrome: report on two families. *Am. J. Med. Genetics*, 1997;73(3):279–285,

70. Luft, F. C., Sharma, A. M. Identifying the genetic determinants of hypertension. *Clin. Invest.*, 1993;71:871–873.
71. Krushkal J, Xiong M, Ferrell R, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Linkage and association of adrenergic and dopamine receptor genes in the distal portion of the long arm of chromosome 5 with systolic blood pressure variation. *Hum Mol Genet.* 1998 Sep;7(9):1379-83.
72. Oparil S, Calhoun DA. High blood pressure. In: Dale DC, Federman DD, eds. *Scientific American Medicine*. New York: Scientific American Inc.; 1999:1-III.
73. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992 Oct 2;71(1):169-80.
74. Marco J, Zabay JM, Garcia-Marco MA, Gomez G, Mulet JM, Munar MA, Soler J, Viader C. Angiotensinogen gene T174M polymorphism: opposite relationships with essential hypertension and obesity in a homogeneous population from Majorca (Balearic Islands, Spain). *Nefrologia.* 2005;25(6):629-36.
75. Wang JH, Lin CM, Wang LS, Lai NS, Chen DY, Cherng JM. Association between molecular variants of the angiotensinogen gene and hypertension in Amis tribes of eastern Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2002 Mar;101(3):183-8.
76. Giner V, Corella D, Chaves FJ, Pascual JM, Portoles O, Marin P, Lozano JV, Armengod ME, Redon J. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and essential hypertension in the Spanish population. *Med Clin (Barc).* 2001 Nov 3;117(14):525-9
77. Vasku A, Soucek M, Tschoplova S, Stejskalova A. An association of BMI with A (-6) G, M235T and T174M polymorphisms in angiotensinogen gene in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002 Jun;16(6):427-30.

78. Dudley, C., Keavney, B., Casadei, B., et al. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. *J. Hypertens.* 1996;14(2):259–262.
79. Dieguez-Lucena, J. L., Aranda-Lara, P., Ruiz-Galdon, M., et al. Angiotensin I-converting enzyme genotypes and angiotensin II receptors - response to therapy. *Hypertension* 1996;28(1):98–103.
80. Sasaki, M., Takashi, O., Luchi, A., et al. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphisms and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed doppler echocardiographic studies. *J. Hypertens.* 1996;14(12):1403–1408.
81. Soubrier F. Blood pressure gene at the angiotensin I-converting enzyme locus: chronicle of a gene foretold.. *Circulation.* 1998 May 12;97(18):1763-5.
82. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1998 May 12;97(18):1766-72.
83. Hingorani, A. D., Jia, H., Stevens, P., et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens.* 1995;13(12):1602–1609.
84. Zee, R. Y. L., Lou, Y. K., Morris, B. J. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;184(1):9–15.
85. Jeunemaitre, X., Lifton, R. P., Hunt, S. C., et al. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat. Genet.* 1992;1(1):72–75,

86. Schmidt, S., van Hooit, M. S., Grobbee, D. E., et al. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch hypertension and offspring study. *J. Hypertens.* 1993;11(4):345–348.
87. Harrap, S. B., Davidson, H. R., Connor, J. M., et al. The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993;21(4):455–460.
88. Timmermann B, Mo R, Luft FC, Gerdts E, Busjahn A, Omvik P, Li GH, Schuster H, Wienker TF, Hoehe MR, Lund-Johansen P. Beta-2 adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1455-60.
89. Kotanko P, Binder A, Tasker J, DeFreitas P, Kamdar S, Clark AJ, Skrabal F, Caulfield M. Essential hypertension in African Caribbeans associates with a variant of the beta2-adrenoceptor. *Hypertension.* 1997 Oct;30(4):773-6.
90. Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):45-8.
91. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med.* 1999 Apr 1;340(13):1012-20.
92. Beige, J., Hohenbleicher, H., Distler, A. & Sharma, A. M. G-Protein beta3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1999;33:1049–51.
93. Benjafeld, A. V., Jeyasingam, C. L., Nyholt, D. R., Griffiths, L. R. & Morris, B. J. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:1094–7.

94. Schunkert, H., Hense, H. W., Doring, A., Riegger, G. A. & Siffert, W. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 1998;**32**:510–3.
95. Li, Biao; Ge, Dongliang; Wang, Yuelan; Zhao, Weiyan; Zhou, Xiaoyang; Gu, Dongfeng; Chen, Runsheng. G Protein  $\beta$ 3 Subunit Gene Variants and Essential Hypertension in the Northern Chinese Han Population. *Annals of Human Genetics* 2005;**69**:468-473(6).
96. Nava E, Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J Hypertens Suppl.* 1995 Aug;**13**(2):39-48.
97. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998 Jul;**32**(1):3-8
98. Jia CQ, Zhao ZT, Wang LH, Hao FR, Feng YQ, Wang SM, Xu XF, Jia CX. Effects of G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene on blood pressure. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2003 Jan;**24**(1):36-9.
99. Zhao Q, Su SY, Chen SF, Li B, Gu DF. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. *Chin Med J (Engl).* 2006 Jul 5;**119**(13):1065-71.
100. Staessen JA, Bianchi G. Adducin and hypertension. *Pharmacogenomics.* 2005 Oct;**6**(7):665-9.
101. Manunta P, Cusi D, Barlassina C, Righetti M, Lanzani C, D'Amico M, Buzzi L, Citterio L, Stella P, Rivera R, Bianchi G. Alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in essential hypertensive patients. *Kidney Int.* 1998 Jun;**53**(6):1471-8.



102. Connell J.M.C., Fraser R., MacKenzie S.M., Friel E.C., Ingram M.C., Holloway C.D., Davies E. The impact of polymorphism in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004;217:243–247.
103. Schenkman JB, Greim H, eds. Cytochrome P450. Vol. 105 of Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1993.
104. Hollenberg N, Williams G, Burger B, Hooshmand I: Potassiums' influence on the renal vasculature, the adrenal, and their responsiveness to angiotensin II in normal man. *Clin Sci Mol Med* 1975;49:527–534.
105. White PC: Mechanism of disease: Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med* 1994;331: 250–258.
106. Connell J, Whitworth J, Davies D, Lever A, Richards A, Fraser R: Effects of ACTH and cortisol administration on blood pressure, electrolyte metabolism, atrial natriuretic peptide and renal function in normal man. *J Hypertens* 1987;5: 425–433.
107. Carson-Jurica M, Adranga N, Solomon H, Connolly T, Tosteson D: Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1980;302:772-776,
108. Orth D, Kovacs W, Debold C: The adrenal cortex. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, 8th Ed, edited by Williams R, Wilson J, Foster D, Philadelphia, W.B. Saunders, 1992, pp 489–619.
109. Horisberger JD: Amiloride sensitive Na channels. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10: 443–449.
110. Komesaroff P, Funder JW, Fuller PJ. Mineralocorticoid resistance. In: *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, London, Balliere Tindall, 1994, pp 333–355

111. Brilla CG, Pick R, Tan LP, Janicki JS, Weber KT: Remodeling of the rat right and left ventricle in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67: 1355–1364.
112. Wehling M, Eisen C, Christ M. Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 1992;90:C5–C9
113. Passaquin AC, Lhote P, Ruegg UT Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 1998;124:1751–1759
114. Doolan CM, Condliffe SB, Harvey BJ Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and  $[Ca^{2+}]_i$  by 17-beta-estradiol in female rat distal colon. *Br J Pharmacol* 2000;129:1375–1386
115. Barbato JC, Mulrow PJ, Shapiro JI, Franco-Saenz R Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. *Hypertension* 2002;40:130–135
116. Wehling M, Spes CH, Win N, Janson C, Schmidt BMW, Theisen K, Christ M Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3517–3522
117. Lisurek M, Bernhardt R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 149-159.
118. Ortiz de Monteliano PR. (ed.). Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York: Plenum, 505-23.
119. Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A., White, P.C. Characterization of two genes encoding human steroid 11  $\beta$ -hydroxylase [P-450(11) $\beta$ ]. *J. Biol. Chem.* 1989;264:20961–20967.
120. Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Yokoyama, Y., Sumimoto, H., Toda, K., Miyahara, K., Kuribayashi, I., Nakao, K., Cloning

and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990a;173:309–316.

121. Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Miyahara, K., Yokoyama, Y., Nakao, K., Hosoda, K., Yamamoto, Y., Imura, H., Shizuta, Y.,. Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-45011 $\beta$ . *FEBS Lett.* 1990b;269:345–349.
122. Mornet, E.; White, P. C. Analysis of genes encoding steroid 11-beta-hydroxylase. *Cytogenet. Cell Genet* 1989;51: 1047.
123. Kawamoto, T.; Mitsuuchi, Y.; Toda, K.; Yokoyama, Y.; Miyahara, K.; Miura, S.; Ohnishi, T.; Ichikawa, Y.; Nakao, K.; Imura, H.; Ulick, S.; Shizuta, Y. : Role of steroid 11-beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1992;89:1458-1462.
124. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11b-hydroxylase isoenzymes. *Endocr Rev* 1994;15:421-38,
125. Taymans, S. E.; Pack, S.; Pak, E.; Torpy, D. J.; Zhuang, Z.; Stratakis, C. A. : Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1998;83:1033-1036.
126. Portrat-Doyen, S., Tourniaire, T., Richard, O., Mulatero, P., Aupetit-Faisant, B., Curnow, K.M., Pascoe, L., Morel, Y., Isolated aldosterone synthase deficiencies caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:4156–4161
127. Pascoe, L., Curnow, K.M., Slutsker, L., Connell, J.M., Rösler, A., White, P.C.,. Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992a;89: 4996–5000.

128. Bechtel, S., Belkina, N., Bernhardt, R., The effect of amino acid substitutions I112P, D147E and K152N in CYP11B2 on the catalytic activities of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:1118–1127.
129. Rainey WE Adrenal zonation: clues from 11 $\alpha$ -hydroxylase and aldosterone synthase. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1999;151:151–160.
130. Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H & Omura T A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Molecular Endocrinology* 1992a; 5:1552–1561.
131. Takayama K, Morohashi K, Honda S, Hara N & Omura T Contribution of Ad4 BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. *Journal of Biochemistry* 1994;116:193–203.
132. Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC & Rainey WE Transcriptional regulation of human 11 $\beta$ -hydroxylase (*hCYP11B1*). *Endocrinology* 2000;141:3587–3594.
133. Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC & Rainey WE Transcriptional regulation of human 11 $\beta$ -hydroxylase (*hCYP11B1*). *Endocrinology* 2000;141 3587–3594.
134. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The Orphan Nuclear receptors NURR1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production. *Mol Endocrinol.* 2004 Feb;18(2):279-90.
135. Bassett MH, Zhang Y, White PC, Rainey WE Regulation of human CYP11B2 and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. *Endocr Res* 2000;26:941–951
136. Sohn YC, Kwak E, Na Y, Lee JW, Lee SK Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol Chem* 2001;276:43734–43739

- 137.** Z. Wang, H. Takemori, S.K. Halder, Y. Nonaka, M. Okamoto, Cloning of a novel kinase (SIK) of SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal, *FEBS Lett.* 1999;453:135–139.
- 138.** X. Lin, H. Takemori, Y. Katoh, J. Doi, N. Horike, A. Makino, Y. Nonaka, M. Okamoto, Salt-inducible kinase (SIK) is involved in the ACTH/cAMP-dependent protein kinase signaling in Y1 mouse adrenocortical tumor cells, *Mol. Endocrinol.* 2001;15:264–1276.
- 139.** H. Takemori, Y. Katoh, N. Horike, J. Doi, M. Okamoto, ACTH-induced nucleocytoplasmic translocation of salt-inducible kinase; implication in the protein kinase A-activated gene transcription in mouse adrenocortical tumor cells, *J. Biol. Chem.* 2002;277:42334–42343.
- 140.** M. Okamoto, H. Takemori, Y. Katoh, Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis, *Trends Endocrinol. Metab.* 2004;15: 21–26.
- 141.** Clemens JW, Lala DS, Parker KL & Richards JS Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1994;134 1499–1508.
- 142.** Liu Z & Simpson ER Steroidogenic factor-1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Molecular Endocrinology* 1997;11:127–137.
- 143.** Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC & Rainey WE Transcriptional regulation of human 11 $\beta$ -hydroxylase (*hCYP11B1*). *Endocrinology* 2000;141:3587–3594.
- 144.** Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP & Parker KL Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Molecular Endocrinology* 1993;7: 852–860.

145. Givens CR, Zhang P, Bair SR & Mellon SH Transcriptional regulation of rat cytochrome P450c17 expression in mouse Leydig MA-10 and adrenal Y-1 cells: identification of a single protein that mediates both basal and cAMP-induced activities. *DNA and Cell Biology* 1994;13:1087–1098.
146. Bakke M & Lund J Mutually exclusive interactions of two nuclear orphan receptors determine activity of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive sequence in the bovine CYP17 gene. *Molecular Endocrinology* 1995; 9:327–339.
147. Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K & Simpson ER Ad4 BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (pii) of the human aromatase p450 (cyp19) gene in the ovary. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:13561–13566.
148. Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Kallen CB & Strauss JF Multiple steroidogenic factor-1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry* 1997;36:7249–7255.
149. Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI & Melner MH Synergistic activation of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:7960–7967.
150. Cammas FM, Pullinger GD, Barker S & Clark AJ The Mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Molecular Endocrinology* 1997;11:867–876.
151. Marchal R, Naville D, Durand P, Begeot M & Penhoat A. A steroidogenic factor-1 binding element is essential for basal human ACTH receptor gene

transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;**274**:28–32.

- 152.** Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis MM, White PC & Rainey WE Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common *cis*-elements. *Molecular Endocrinology* 1997;**11**:638–649.
- 153.** Mitsuuchi, Y.; Kawamoto, T.; Rosler, A.; Naiki, Y.; Miyahara, K.; Toda, K.; Kuribayashi, I.; Orii, T.; Yasuda, K.; Miura, K.; Nakao, K.; Imura, H.; Ulick, S.; Shizuta, Y. : Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: the involvement of point mutations of the P-450(C18) gene (CYP11B2) in CMO II deficient patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992.182: 974-979.
- 154.** Mitsuuchi, Y. Kawamoto, T. Miyahara, K., Ulick, S., Morton, D. H. Naiki, Y. Kuribayashi, I. Toda, K. Hara, T. Orii, T. Yasuda, K.; Miura, K.; Yamamoto, Y.; Imura, H.; Shizuta, Y. Congenitally defective aldosterone biosynthesis in humans: inactivation of the P-450(C18) gene (CYP11B2) due to nucleotide deletion in CMO I deficient patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993,190: 864-869.
- 155.** McNamara MD, Tam WS, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AN, Cohn JN, Feldman AM, Worcel M. Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism Predicts Outcome in African Americans With Heart Failure Results From the A-HeFT Trial. *JACC* 2006;48-6:1277–82
- 156.** Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, Barlassina C, Lanzani C, Bianchi G, CusiD. Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43: 265–270
- 157.** M. Kupari, M. Perola, P. Koskinen, J. Virolainen, P.J. Karhunen, Left ventricular size, mass, and function in relation to angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in humans, *Am. J. Physiol.* 1994;267:H110711.

158. Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö., Renkli Genetik Atlası ISBN: 975-420-035-1, 1995.
159. Mullis, K. B., Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 1987. 155:335–350 .
160. Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., Erlich, H. A. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986. 51(Pt1):263–273.
161. Başbüyük H.H., Bardakçı F., Belshaw R., Quicke D.L.J. Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice. Önder matbaa, Sivas/Turkey, 2000.
162. Klug W.S., Cummings M.R. (Çeviri editörü: Öner C.) Genetik Kavramlar. Palme yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17, 2003.
163. Miller S.A., Dykes D.D., Poldesky H.F., A Simple Salting-Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cell. *Nucl. Acids Res.* 16, 1215, 1988.
164. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
165. Sümbüloğlu K., Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik, Matis Yayınları, Ankara, 1978.
166. Zar J.H. Biostatistical Analysis. Fourth Edition. ISBN:013081542X, Sayfa: 489, 1998.
167. Dzau VJ, Safar ME: Large conduit arteries in hypertension: role of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1988;77:947–953.
168. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol.* 1991;5: 1513–1522.



169. Russo P, Siani A, Venezia A, Iacone R, Russo O, Barba G, et al. Interaction between the -344T/C polymorphism of CYP11B2 and age in the regulation of blood pressure and plasma aldosterone levels: cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2002; 20:1785–1792.
170. Brand E, Schorr U, Ringel J, Beige J, Distler A, Sharma AM. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) -344T/C polymorphism in Caucasians from the Berlin salt-sensitivity trial (BeSST). *J Hypertens* 1999; 17: 1563-67.
171. Schunkert, H., Hengstenberg, C., Holmer, S.R., Broeckel, U., Luchner, A., Muscholl, M.W., Kurzinger, S., Doring, A., Hense, H.W., Riegger, G.A., Lack of association between a polymorphism of the aldosterone synthase gene and left ventricular structure. *Circulation* 1999;99:2255–2260.
172. Edoardo Casiglia, Valerie Tikhonoff, Alberto Mazza, Andrzej Rynkiewicz, Janusz Limon, Sandro Caffi, Francesco Guglielmi, Bortolo Martini, Giancarlo Basso, Mikolaj Winnicki, Achille C. Pessina and Virend K. Somers. C-344T Polymorphism Of The Aldosterone Synthase Gene And Blood Pressure in The Elderly: a Population-Based Study. *J Hypertens* 2005, 23:1991-96
173. Zhu H, Sagnella GA, Dong Y, Miller MA, Onipinla A, Markandu ND, et al. Contrasting associations between aldosterone synthase gene polymorphisms and essential hypertension in blacks and in whites. *J Hypertens* 2003; 21:87–95.
174. Matsubara M, Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H, Omori F, Fujiwara T, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study. *J Hypertens* 2001; 19:2179–2184.
175. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 435–439.

176. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K et al. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor. *Hypertension* 1999; 34: 920–923.
177. Song J, Narita I, Goto S et al. Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy. *J Med Genet* 2003; 40: 372–376.
178. Wenru Tang, Hongyan Wu, Xuhong Zhou, Baowen Cheng, Yongli Dong, Li He, Haijing Yu, Lin Xu, Jing Lu, Kaiyuan Li, Chunjie Xiao. Association of the C-344T polymorphism of CYP11B2 gene with essential hypertension in Han and Yi minorities of China. *Clinica Chimica Acta* 2006;364:222 – 225.

## **EK-1**

### **KULLANILAN ÇÖZELTİ VE TAMPONLARIN HAZIRLANMASI**

#### **Genomik DNA Eldesinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

- *Nüklei Lysis Tamponu*: 10mM Tris-HCl 1.576g, 400mM NaCl 23.4g ve 2mM Na<sub>2</sub>EDTA 0.7g 1000ml bidistile su içerisinde çözdürülerek pH: 8.2'ye ayarlandı. Otoklavda steril edilerek +4°C' de saklandı.
- *Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)*: 10g SDS 100ml bidistile suda çözdürülerek %10'luk çözelti hazırlandı. Sterilizasyon işlemi filtreden geçirilerek yapıldı.
- *Proteinaz K Dilüsyon Tamponu*: Sıvı olarak 20mg/ml hazırlanmış çözeltisi kullanıldı.
- *TE Tamponu (Tris-HCl, EDTA)*: 10 mM Tris-HCl 0.394g, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA 0.093g 250ml bidistile suda çözdürülerek otoklavda steril edildi.
- *Amonyum Asetat*: 10M 148g amonyum asetat 200ml bidistile su içinde çözdürülerek hazırlandı. Bu çözeltinin steril edilmesine gerek yoktur.

#### **Yükleme Tamponunun (Loadind Dye) Hazırlanması**

- Formamid (%95) 9.5 ml
- Xylen Cyanol (%0.5) 0.05 gr
- Bromfenol Blue (%0.5) 0.05 gr

Bu üç kimyasal 15 ml'lik konik santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C' de saklandı.

#### **PCR Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması**

- dNTP solüsyonu: 100 mM stok. Adenin, Timin, Guanin, Sitozin nükleotidlerinin her birinden 2.5 µl alınarak 90 µl bidistile su ile karıştırıldı. 2.5 mM'lık 100 µl dNTP çalışma çözeltisi hazırlandı.

- CYP11B2F primeri: 10 pmol 100 µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 96 pmol'lük stok primer çözeltisinden 10.5 µl alınarak 89.5 µl'lik bidistile suya eklendi.
- CYP11B2R primeri: 10 pmol 100 µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 110 pmol'lük stok primer çözeltisinden 9 µl alınarak 91 µl'lik bidistile suya eklendi.

EK-2

## ÖZGEÇMİŞ KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı-Soyadı:** Egemen Akgün  
**Doğum Yeri Yılı:** Erzurum -1978  
**Medeni Durumu:** Bekar  
**Yabancı Dil:** İngilizce  
**Adres:** Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Biyoloji Anabilim Dalı, 58140, Sivas.  
**Tel:** 346.21910.10-1028  
**E-mail:** [eakgun@cumhuriyet.edu.tr](mailto:eakgun@cumhuriyet.edu.tr)

## ÖĞRENİM VE AKADEMİK DURUM

**Yüksek Lisans:** Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2001.  
**Doktora:** Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi  
Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,  
Sivas, 2007.

## YAYIN LİSTESİ

### Ulusal Yayınlar:

1. **Akgün, E.**, Yılmaz M., Pınarbaşı E. Q-Fever Şüphesi Olan Hasta Serum ve Kan Örneklerinde Nested-PCR Yöntemiyle *Coxiella burnetii*'nin Saptanması. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2006;28(2);50-4.

### Uluslararası Yayınlar:

1. Pınarbaşı E, Percin FE, Yılmaz M, **Akgün E**, Cetin M, Cetin A. Association of microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and pre-eclampsia in Turkish women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2007;33(1):32-7

2. Percin FE, Cetin M, Pinarbasi E, **Akgun E**, Gurlek F, Cetin A. Lack of association between the CYP11B2 gene polymorphism and preeclampsia, eclampsia, and the HELLP syndrome in Turkish women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;127(2):213-7

3. Cetin M, Pinarbasi E, Percin FE, **Akgun E**, Percin S, Pinarbasi H, Gurlek F, Cetin A. No association of polymorphisms in the glutathione S-transferase genes with pre-eclampsia, eclampsia and HELLP syndrome in a Turkish population. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005;31(3):236-41.