

# Kardiyomiopatiye Neden Olan Kardiyak Troponin T Gen Mutasyonlarının Araştırılması

## Analysis of Cardiac Troponin T Gene Mutations Causing Cardiomyopathy

**Running title:** Kardiyomiopatiye TNNT2 gen mutasyonları

Filiz Güçlü-Geyik<sup>1</sup>, Tevfik Demir<sup>2</sup>, Evrim Kömürcü-Bayrak<sup>1</sup>, Fatih Bayrak<sup>3</sup>, Neslihan Çoban<sup>1</sup>, Funda Öztunç<sup>2</sup>, Nihan Erginel-Ünaltuna<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı*

<sup>2</sup>*Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı*

<sup>3</sup>*Acıbadem Üniversitesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı.*

### ÖZET

**Amaç:** Kardiyak Troponin T (*TNNT2*) gen mutasyonları, ani kalp ölümü ve kalp yetmezliği ile karşımıza çıkan klinik olarak heterojen bir grup miyokardiyal hastalığa neden olmaktadır. Bu çalışmada, idiyopatik dilate kardiyomiopati (DKMP) ve hipertrofik kardiyomiopati (HKMP) hastalarında olası *TNNT2* gen mutasyonlarının incelenmesi ve genotip-fenotip ilişkisinin kurulması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada, 23 idiyopatik DKMP'li ve 50 HKMP'li toplam 73 hastanın ve 100 sağlıklı bireyin *TNNT2* gen mutasyonları araştırıldı. *TNNT2* geninin fonksiyonel olarak önemli olan 10. ve 13. ekzonlarında olası yeni mutasyonlar PZR-SSCP yöntemi ile tarandı ve bulunan farklılıklar sanger dizileme ile tanımlandı. Ayrıca, R141W ve ΔK210 mutasyonları PZR-RFLP yöntemi ile DKMP'li hastalarda araştırıldı.

**Bulgular:** Bu çalışmada, *TNNT2* genindeki 2 ekzonda DKMP ve HKMP ile ilişkili mutasyon saptanmadı. DKMP'li 3, HKMP'li 1 ve sağlıklı 2 kişide *TNNT2* geninin 10. ekzonunda rs45527945G>C polimorfizmi bulundu. Bu polimorfizmin nadir allel frekansı, sağlıklı grupta 0.01, DKMP hastalarında 0.07 ve HKMP hastalarında 0.01 olarak belirlendi. DKMP'li hastalar ile sağlıklı bireyler bu polimorfizm için, genotip ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (genotip ve allel frekansları sırası ile;  $p=0.015$  ve  $p=0.046$ ). Hastaların genel fenotipik özellikleri ile bu polimorfizmin genotipleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmedi.

**Sonuç:** Daha geniş vaka-kontrol serilerinde *TNNT2* geninin tüm ekzonların ayrıntılı mutasyon taramasının yapılması DKMP ve HKMP moleküler patofizyolojisinin aydınlatılması açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kardiyak Troponin T, dilate kardiyomiopati, hipertrofik kardiyomiopati, mutasyon taraması

### SUMMARY

**Objective:** Mutations in the cardiac troponin T (*TNNT2*) gene are caused a group of clinically heterogeneous myocardial disease which leads to sudden cardiac death and heart failure. The aim of this study was to investigate *TNNT2* gene mutations in patient with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) and hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and establish genotype-phenotype correlation.

**Material and Methods :** In our study, 23 idiopathic DCM and 50 HCM, total of 73 patients and 100 healthy control individuals were analysed for *TNNT2* gene mutations.. Functionally important exons of *TNNT2* gene; exon 10 and 13, were first screened by PCR-SSCP method for possible new mutations and then different patterns were examined by Sanger sequencing. Moreover, R141W and ΔK210 mutations in *TNNT2* gene are analysed by PCR-RFLP method in DCM patients.

**Results:** In this study, no mutation associated with DCM and HCM detected in two exons of *TNNT2*. The rs45527945G>C polymorphism in exon 10 of *TNNT2* was observed in three DCM patients, one HCM patient and two healthy individuals. Minor allele frequency of this polymorphism was 0.01 in control group (healthy individuals), 0.07 in DCM, and 0.01 in HCM patients. The genotype and allele frequencies of this polymorphism were significantly different between DCM patients and healthy individuals (genotype and allele frequencies;  $p = 0.015$  and  $p = 0.046$ ). There were no statistically significant differences between the phenotype of patients and the genotype of this polymorphism.

**Conclusion:** We thought that screening all exons of *TNNT2* gene in larger case-control series will be important for unravelling the molecular pathophysiology of DCM and HCM.

**Keywords:** Cardiac troponin T, Dilated Cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, mutations screening

## Giriş:

Kardiyomiyopatiler, kardiyak disfonksiyon ile ilişkili kalp kasını tutan heterojen bir grup hastalıktır. Koroner arter hastalığı, hipertansiyon, valvuler hastalık veya konjenital kalp hastalığının olmadığı durumlarda görülür (Elliott P, 2008). Kardiyomiyopatiler morfolojik ve patofizyolojik olarak dilate, hipertrofik, restriktif ve aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Richardson P, 1996).

Dilate kardiyomiyopati (DKMP), ventriküler dilatasyon, sistolik fonksiyonda bozulma ve ilerleyici refrakter kalp yetmezliği ile karakterize edilen kardiyomiyopati tipidir (Richardson P, 1996). Dilate kardiyomiyopati, en sık (%60) görülen kardiyomiyopati tipi olup genel populasyonda sıklığı 100.000 de 40 ile 50 arasındadır (Codd MD, 1986). DKMP, vakaların %70'inde sporadik, %30'unda ailesel olarak ortaya çıkar (Grunig E, 1993). Dilate kardiyomiyopatinin, bilinen bir nedeni yok ve sporadik olarak gelişmiş ise idiyopatik dilate kardiyomiyopati olarak adlandırılır. İdiyopatik dilate kardiyomiyopati kalp yetmezliğinin genç yaşlarda en sık nedenidir ve kalp transplantasyonu gerektiren durumların başında gelmektedir. Çocuklarda idiyopatik DKMP'nin prevalansı 2,6/100.000 olarak bildirilmiştir (Arola A, 1997). Hipertrofik kardiyomiyopati (HKMP), baskın olarak sol ventrikülün hipertrofisi ve bozulmuş diastolik fonksiyon ile karakterize edilen miyokardiyum hastalığıdır (Richardson P, 1996). Otozomal dominant kalıtım gösteren HKMP, gençlerde ani kalp ölümünün en yaygın nedenlerinden biridir ve sıklığı 500 kişide 1'dir (Fatkin D, 2002; Richardson P, 1996). Sarkomerik proteinleri, hücre iskeleti proteinleri ve nüklear membran proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların kardiyomiyopatilere (Dilate ve hipertrofik kardiyomiyopati) neden olduğu bilinmektedir (Osterziel KJ, 2005; Tester DJ, 2011; Hershberger RE, 2009). Sarkomerik bir protein olan troponin T'yi kodlayan *TNNT2* gen mutasyonları, mutasyonun tipine ve lokalizasyonuna bağlı olarak çoğunlukla DKMP (fenotip MIM no: 601494) ve HKMP'ye (fenotip MIM no: 115195) neden olmaktadır. Ayrıca ailesel restriktif kardiyomiyopati (fenotip MIM no: 612422) ve sol ventriküler noncompaction (fenotip MIM no: 601494) hastalığında gen-fenotip ilişkileri gösterilmiştir. *TNNT2* gen mutasyonları, ailesel HKMP hastalarının yaklaşık olarak %5-15'inde, ailesel DKMP hastalarının %3'ünde gözlenmektedir (Sehnert AJ, 2002; Hershberger RE, 2009; Bos JM, 2009). *TNNT2* geni R141W ve ΔK210 gen mutasyonlarının, fenotipik olarak DKMP'nin erken yaşlarda başlamasına, bebeklik ve çocukluk döneminde konjestif kalp yetmezliğine, şiddetli ventriküler dilatasyona yol açtığı bilinmektedir (Kamiasago M, 2000; Li D, 2001; Hanson EL, 2002). DKMP ve HKMP'ye neden olabileceği tahmin edilen aday genlerde olası mutasyonlar SSCP (single strand conformation polymorphism) veya DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) gibi mutasyon tarama yöntemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmaktadır. (Villard E, 2005; Kärkkäinen S, 2004; Mogensen J, 2004; Rodríguez-

García MI, 2010).

Buna bağlı olarak, DKMP ve HKMP'nin etyopatogenezinde rol aldığı bilinen *TNNT2* geninin fonksiyonel olarak önemli iki bölgesinde oluşması muhtemel yeni mutasyonların hipertrofik ve idiyopatik dilate kardiyomiyopati hastalarda PCR-SSCP yöntemi ile taranması amaçlanmıştır. Ayrıca, idiyopatik dilate kardiyomiyopati çocuk hastalarda *TNNT2* geninde R141W ve ΔK210 mutasyonlarının araştırılması da çalışmaya dahil edilmiştir. Böylece, kardiyak troponin T'de fonksiyonel değişime sebep olabilecek patojenik mutasyon bulma ihtimalinin fazla olduğu bölgeler taranarak kardiyomiyopati ile ilişkisi ilk kez Türk hastalarda araştırılmış olacaktır.

## Gereç ve Yöntemler:

### Çalışma Grubu

Elektrokardiyografik (EKG), ekokardiyografik, telekardiyografik ve laboratuvar tetkikleri sonucunda klinik olarak 23 idiyopatik DKMP ve 50 HKMP tanısı konmuş toplam 73 hasta ve kardiyomiyopatisi olmayan 100 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma Yerel Etik Kurul tarafından onaylandı ve her katılımcıya çalışma hakkında detaylı bilgi verilerek "Bilgilendirilmiş Onay Formu" imzalatıldı. DKMP'li hastaların yaş ortalaması  $8 \pm 4.2$  dağılımı 2-20 yaş iken, HKMP için yaş ortalaması  $47 \pm 17$ ; dağılım 17-74 yaşdır. Kontrol grubunun ortalaması yaş  $55.0 \pm 12.9$  ve yaş dağılımı 33-83 yaş aralığındadır.

### Genetik analiz

Genomik DNA, periferik kan lökositlerinden standart tuzla çöktürme yöntemi kullanılarak elde edildi. *TNNT2* geninin fonksiyonel olarak önemli olan 10. ve 13 ekzon bölgeleri mutasyon analizi için sırasıyla

Ex10 for: 5'- ATGCAGGTTTCTGTACCTGCGATG - 3' ;

Ex10 rev: 5'- TGATGATGAATAGAGAGGGGCCTG - 3' ;

Ex13 for: 5'- TTACTCTGCTTCCCACAC - 3' ve

Ex13 rev: 5'- ATCAGCAAAGCCCAGAAAGG - 3'

primerleri kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edildi. SSCP (Single strand conformation polymorphism) analizi için, PZR ürünleri %50'lik formamid içeren yükleme solüsyonu içerisinde 95°C'de denatüre edilerek mobilite farklılıklarına göre bantların ayrılmasını sağlanması amacıyla non-denatüre poliakrilamid jelle (ekzon10 için % 12'lik ve ekzon 13 için % 8'lik) yüklendi. Örnekler sabit volt ve ısıda yürütüldü. Poliakrilamid jel, gümüş nitrat ile boyanarak örneklere ait bantlar analiz edildi. Tek bazlık değişimlere hassas bir teknik olan SSCP analizinde bulunan farklılıklar Sanger dizileme analizi ile tanımlandı. *TNNT2* geninin 10. ekzonun da Arg141Trp (R141W) mutasyonu Hpa II restriksiyon enzimi (RE) kullanılarak PZR-RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizi) yöntemi ile incelendi. *TNNT2* geninin 13. ekzon bölgesinde bulunan ΔK210 gen mutasyonu ise PZR ve % 10 poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile incelendi.

### İstatistiksel Analiz

Genotip ve allelik dağılımlarının ki-kare hesaplamaları Hardy-Weinberg equilibrium test ile karşılaştırıldı

(<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>). Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edildi. Sürekli değişkenlerin grup karşılaştırılmasında student t-testi ve kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise ki-kare testi kullanıldı. P değerinin 0.05'in altında bulunması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bütün istatistiksel analizler SPSS (versiyon 10.0) yazılımı kullanılarak yapıldı.

### **Bulgular :**

İdiyopatik dilate kardiyomyopati hastalarının klinik değerlendirmesi Tablo 1'de gösterilmektedir. DKMP'li hastaların yaş ortalaması  $8 \pm 4.2$  dağılımı 2-20 yaş aralığındadır. İdiyopatik DKMP'li 13 hastada kalp yetmezliği (%56.5) ve sadece 1 hastada aritmi mevcuttur. Hastaların ailelerinde ani ölüm öyküsü yoktur. Hastaların sol ventrikül ejeksiyon fraksiyon ortalaması 34.35 iken fraksiyon kısalma ortalaması 15.89'dur. HKMP için yaş ortalaması  $47 \pm 17$ ; dağılım 17-74 yaşdır. HKMP'li hastaların %56.5'inde kalp yetmezliği vardır, %30'unda aile öyküsü pozitifdir ve %22'sinde ani kalp ölümü mevcuttur (Tablo 2).

İdiyopatik DKMP'li hastalar ve sağlıklı bireyler, TNNT2 geninin 10. ve 13. ekzonları bilinen mutasyonlar açısından incelendi. İncelenen hasta ve sağlıklı bireylerde R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonları tespit edilmedi.

Dilate ve hipertrofik kardiyomyopati hastalar ile sağlıklı bireylerin TNNT2 geni 10. ekzonunun SSCP analizi sonucunda, 3 idiyopatik DKMP'li, 1 HKMP'li hastada ve 2 sağlıklı bireyde diğer örneklerden farklı bant paterni saptandı (Şekil 1). Bu farklı bant paternindeki nükleotid farklılığının tanımlanması amacı ile örnekler sanger dizileme metodu ile dizilendi. Dizileme analizi sonucunda, bu bant paternine TNNT2 geninin intronik bölgesinde yer alan rs45527945 (NM\_001001430.1:c.459+57G>C) polimorfizminin neden olduğu belirlendi. Bu nadir bant paternine sahip olan örneklerde bu polimorfizm heterozigot (GC) genotipde iken yaygın bant paterni bulunan örneklerde homozigot (GG) genotipe sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Çalışma grubunda, bu polimorfizmin mutant homozigot genotipi olan CC genotipi saptanmadı. Hasta ve sağlıklı bireylerin TNNT2 geni 13. ekzonunun SSCP analizi sonucunda hasta ve sağlıklı bireylerde farklı bir bant paterni gözlemlendi (Şekil 2).

rs45527945 polimorfizminin allel frekansı idiyopatik DKMP'li hastalarda 0.07 HKMP'li hastalar ve sağlıklı bireylerde 0.01 olarak bulundu. HKMP'li hastalar ile sağlıklı bireyler rs45527945 polimorfizminin genotip ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=1.000$ ). İdiyopatik DKMP'li hastalar ile sağlıklı bireyler rs45527945 polimorfizmi için genotip ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (sırası ile genotip ve allel frekansları için  $p=0.015$  ve  $p=0.046$ ). Bu polimorfizmin GG, GC genotipleri ile hastaların genel fenotipik özellikleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmedi (Tablo 3). rs45527945 polimorfizminin DKMP'nin klinik septomlarının şiddetinde

bir farklılık oluşturabileceği düşünülerek bu polimorfizmin hasta grubumuzdaki klinik bulgularla bağlantısı incelendi. Bunun sonucunda, rs45527945 polimorfizmini GC heterozigot olarak taşıyan bir hastada aritmi gözlenmemekte iken diğer hastalarda gözlenmemektedir. Ayrıca, aynı hastada kalp yetmezliği, sol ventriküler hipertrofi ve kardiyomegali bulunmaktadır. Diğer iki hastanın birinde kalp yetmezliği, sol ventrikül hipertrofisi bulunmazken kardiyomegalisi olduğu gözlenmiştir. Diğer bir hastada ise, kardiyomegali ve sol ventriküler hipertrofi gözlenirken kalp yetmezliği gözlenmemektedir. rs45527945 polimorfizmini GC heterozigot olarak taşıyan HKMP'li hasta 73 yaşında ve septomları 70 yaşında ortaya çıkmıştır. Maksimal duvar kalınlığı 2.1 cm iken sol atrium boyutu 5.6 cm'dir. Hastada obstrüktif HKMP ve asimetric septal hipertrofi bulunmaktadır. Hastanın ailesinde ani ölüm öyküsü ve aile hikayesi bulunmamaktadır.

### **Tartışma :**

Kalp kasılmasında troponin T proteininin önemli bir rolü vardır. Kasılmada, aktin ve miyozin filamentleri arasındaki etkileşimin olabilmesi için öncelikle aktin filamentini oluşturan troponin kompleksi bileşenleri ile tropomiyozin arasındaki etkileşimin gerçekleşmesi gerekmektedir. Kardiyak troponin T'nin, alfa-tropomiyozin ve troponin C ile bağlandığı bölgeler bu açıdan önem taşımaktadır. Dolayısıyla, TNNT2 geninin 10. ve 13. ekzonlarının kodlama bölgeleri özellikle sarkomerik proteinler ile bağlantı bölgelerine denk gelmektedir. Bu durum göz önüne alınarak çalışmamızda SSCP yöntemi ile DKMP ve HKMP'ye sebep olabilecek 10. ve 13. ekzonlardaki muhtemel mutasyonlar araştırılmıştır. İnceleme sonucunda DKMP ve HKMP'li hasta gruplarında hastalık ile ilişkili mutasyon saptanmadı. Hasta ve sağlıklı bireylerde, TNNT2 geninin ekzon-intron bağlantı bölgelerini kapsayan 10. ekzonun intron-ekzon bağlanma bölgesine yakın bir noktada rs45527945 polimorfizmi belirlendi. Çalışmamızda bu polimorfizmin nadir allelinin hastalarda daha sık rastlanması ve farklı klinik fenotipe sahip hastalarda gözlemlenmesi DKMP'nin patogeneğinde modifiye edici bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu durum ancak, rs45527945 polimorfizminin fonksiyonel düzeydeki etkilerinin incelenmesi ile ya da bağlı olabileceği diğer fonksiyonel varyantlar ile ilişkilendirildiğinde anlaşılabilir.

Kamisago ve grubu, TNNT2 geninde ilk defa  $\Delta$ K210 delesyon mutasyonunu dilate kardiyomyopati 2 ailede tanımlamışlardır (Kamisago M, 2000).  $\Delta$ K210 delesyon mutasyonu tanımlanan bu ailelerde mutasyonu taşıyan 13 bireyin ikisi infantil, üçü 10'lu yaşlarda, dördü 20'li, geri kalanlar ise daha ileri yaşlarda hastalık tanısı almışlardır (Kamisago M, 2000). Kamisago'nun hasta grubunda özellikle ani ölüm frekansının yüksek oluşu dikkat çekicidir. Daha sonra Hanson ve grubu, DKMP'li 61 aile ve 53 idiyopatik bireyde, TNNT2 gen mutasyonlarının varlığını araştırmış ve yedi üyeli bir ailede  $\Delta$ K210 mutasyonunu saptamıştır (Hanson EL, 2002). Ayrıca Hanson'un  $\Delta$ K210 mutasyonunu tanımladığı bireylerde fenotipik olarak ani kalp ölümleri, atriyal fibrilasyon ve atrioventriküler blok içeren ileti sistemi hastalıkları ve kalp yetmezliği gözlemlenmektedir. Bir



başka çalışmada, Li ve grubu 72 üyeli bir ailenin 20 bireyinde DKMP ile ilişkili *TNNT2* geninde R141W mutasyonunu tanımlamışlardır (Li D, 2001). R141W mutasyonunun tanımlandığı ailede, 20 bireyin 14 tanesi hayattadır. Yaşları 1 ila 5 arasında değişen beş çocuk hayatta değilken 2,5 yaşındaki bebekte otopsi sonucu DKMP tanısı doğrulanmıştır. Hayatta olan 14 aile üyesinin 12 tanesinde ekokardiyografik sonuçlar 10 yaşından önce ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada aynı aile içinde farklı fenotipler oluşturmaktadır. Kardiyak septomlar, bu mutasyonu taşıyan bazı bireylerde 20'li yaşlarda saptanmışken, bazı bireylerde 40'lı yaşlara gelmelerine rağmen DKMP bulgusuna rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmaların karakteristik özelliği, mutasyon verilerinin geniş ailelerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilmesidir. Özellikle bu gene ait mutasyonlar bu araştırmalarda çalışılan ailelerin sadece bir ya da ikisinde belirlenebilmiş diğerlerinde rastlanmamıştır. Bu durum mutasyonun ailelere özgü kaldığına işaret etmektedir. R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarının sadece birkaç ailede belirlenmesi ve populasyonda rastlanmaması ailelerdeki homojen fenotiplerle açıklanabilir.

Bizim çalışmamızda incelenen hasta grubu, akraba olmayan sporadik çocuk olgulardan oluşmakta ve çalışmada büyük aileler yer almamaktadır. Hastalığın başlangıç yaşının erken olması yönünden bu mutasyonların tanımlandığı çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Hastaların fenotip özellikleri açısından bakıldığında çalışma grubunda 13 hastada kalp yetmezliği bulunurken sadece bir hastada aritmi gözlenmiştir. Olguların ailelerinde ani kalp ölüm öyküsü ve atriyal fibrilizasyon bulunmamaktadır. Fenotipleri itibari ile bu hastalar bir birlerine benzerlik göstermekte ve homojen bir grup niteliği taşımasına rağmen literatürde mutasyon tanımlanan ailelerdeki hastaların fenotipleri ile benzerlik göstermemektedirler. Dolayısı ile elde ettiğimiz veriler R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarının belirli fenotipten sorumlu olabileceği yönündedir. Özellikle geniş katımlı, homojen klinik gösteren aile çalışmaları ve bağlantı analizi çalışmaları ile bu mutasyonların etkileri irdelenebilir. Bu çalışmada araştırılan olgularda, R141W ve  $\Delta$ K210 mutasyonlarından farklı mutasyonların bulunma ihtimali mevcuttur.

Çalışmamız idiyopatik DKMP'nin etyolojik nedenlerinin incelenmesi açısından az sayıda hasta içermektedir. Türk toplumunda idiyopatik DKMP görülme sıklığı üzerine bir çalışma bulunmamaktadır fakat yapılan DKMP çalışmalarında idiyopatik DKMP görülme sıklığı oldukça düşüktür (Özhan H, 2004; Küçükarabacı B, 2008; Alikasifoğlu M, 2003). *TNNT2* gen mutasyonlarının çoğunlukla dominant kalıtılan DKMP'ye neden olduğu bildirilmiştir. Olgularımızda ise hastalık ailesel olarak tanımlanmamaktadır. Buna göre, hasta grubundaki olgu sayısının azlığı ve olgularda ailesel dilate , kardiyomiyopati olmaması bu çalışmanın bir kısıtlılığıdır. Diğer yandan, *TNNT2* gen mutasyonlarının, penetrans düşüklüğü göstermesi sebebiyle mutasyon taşıyan tüm aile bireylerinin bulgu vermiyor olabileceği ihtimali de mevcuttur.

Çocuklarda DKMP'nin, infeksiyöz miyokardit, perinatal asfiksi, doğumsal metabolizma bozuklukları, nöromusküler hastalıklar, koroner arter anomalileri ve DKMP'nin kalıtsallığı gibi birçok etyolojik nedeni olabilir. Çocukluk dönemindeki DKMP, genellikle daha ciddi bir prognoza sahiptir. Buna dayanarak yeni doğan ve genç fare modelleri oluşturularak kardiyak dilatasyon ve kalp yetmezliğine yol açan nedenler birçok çalışma grubu tarafından araştırılmıştır. Hall ve grubu tarafından oluşturulan hayvan modellerinde koneksin 43 seviyesinin azalması ile hastalığın septomlarının erken başladığı ve bozulmuş kardiyak fonksiyondan önce kasılma defektlerinin oluştuğunu göstermişlerdir (Hall DG, 2000). Aynı çalışmada, koneksin 43 seviyesinin azalması ile kalp yetmezliğine yol açan kasılma defektinin başlangıç zamanı arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (Hall DG, 2000). Farklı bir çalışmada, trombomodulin aşırı ekspresyonunun şiddetli DKMP geliştirdiği ve erken doğum sonrası dönemde genellikle ölüme yol açtığını bildirmişlerdir (Sussman MA, 1998). Bu durumda çocukluk çağındaki DKMP'li hastalarda koneksin 43 ve trombomodulin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların araştırılması hastalığın etiyolojinin aydınlatılmasında daha faydalı olabilir.

HKMP'ye neden olan en sık mutasyonlar beta miyozin ağır zincir (MYH7) ve miyozin bağlayan protein C (MYBPC) genlerinde bulunmaktadır. MYH7 ve MYBPC hipertrofik kardiyomiyopati hastalarının yaklaşık %30-60'ından, sadece MYH7 genindeki mutasyonlar hastalığın yaklaşık %30-40'undan sorumlu tutulmaktadır (Greber Platzer S, 2001; Watkins H, 1995). HKMP hastalarının yaklaşık olarak %5-15'inde *TNNT2* gen mutasyonları gözlenir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, HKMP'li hastaların öncelikle MYH7 ve MYBPC gen mutasyonları açısından incelenmesi ve sonrasında bu genlerde mutasyon çıkmayan hastalarda *TNNT2* gen mutasyonu bakılması daha anlamlı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma ile Türk populasyonunda çocukluk çağındaki idiyopatik dilate kardiyomiyopati ve hipertrofik kardiyomiyopati hastalarda *TNNT2* gen mutasyonları ilk defa araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, saptadığımız rs45527945 polimorfizminin DKMP fenotipi ile direkt ilişkili olmadığını fakat bu polimorfizmin hastalarda daha sık görülmesinin hastalığa yatkınlık oluşturabileceğini düşündürmektedir. Daha geniş vaka-kontrol serilerinde *TNNT2* geninin tümünde ayrıntılı mutasyon taraması yapılmasının DKMP ve HKMP patofizyolojisinin aydınlatılması açısından önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, *TNNT2* geni benzer fenotipik bulgular veren, farklı kalp hastalığı tipleri için de aday lokus olarak kabul edilebilir.

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



**Tablo 1: Dilate kardiyomyopati hastalarının klinik özellikleri .**

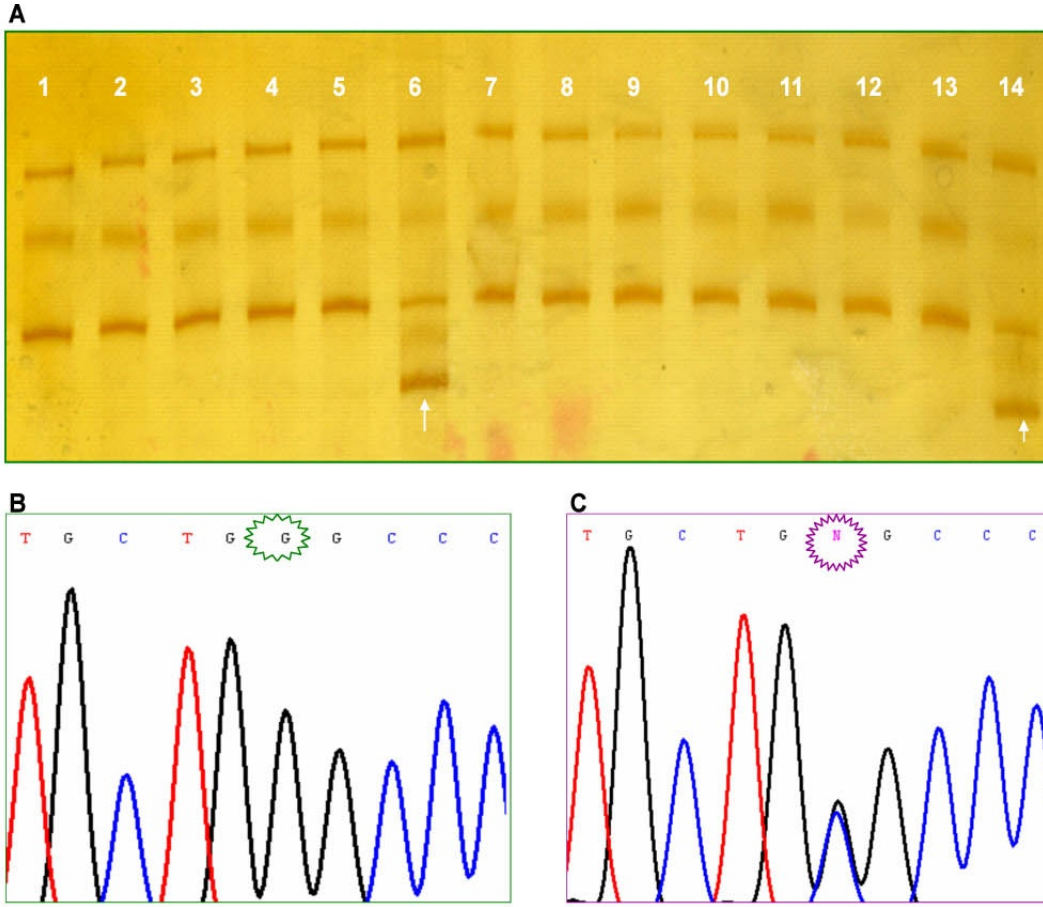
	n	%	Ortalama	Dağılım
Cinsiyet (E/K)	11/12	47.8/52.2		
Yaş (yıl)	18		8 ± 4.9	2 - 20
Tanı yaşı (ay)	23		24.5 ± 31.6	3 - 120
Aile öyküsü	0		-	-
Ailede ani ölüm öyküsü	0		-	-
EF (%)	23		34.4 ± 9.4	17 - 48
FK (%)	23		15.9 ± 5.4	8 - 27
LVEDD > (% 117)	21	95.2		
Kalp yetmezliği	13	56.5		
Kardiyomegali	20	87		
Aritmi	1	4.3		
LVH	14	60.9		
STOT Değişikliği	7	33.3		

E; erkek, K; kız, EF;ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonu kısalma, LVEDD; sol ventrikül sonu diyastolik çapı, LVH; sol ventriküler hipertrofi.

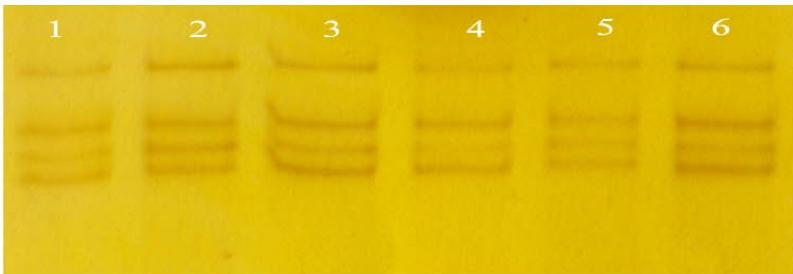
**Tablo 2 : Hipertrofik kardiyomyopati hastalarının klinik özellikleri.**

	n	%	Ortalama	Dağılım
Cinsiyet (E/K)	30/20	60/40		
Yaş (yıl)			7 ± 17	17-74
Aile öyküsü	15	30		
Ailede ani ölüm öyküsü	11	22		
EF (%)			75.4 ± 9	51-93
LVEDD (mm)			4.3 ± 0.67	
LVESD (mm)			2.4 ± 0.54	
Maksimum duvar kalınlığı (cm)			2.5 ± 0.54	
Sol atriyum boyutu (cm)			4.6 ± 0.7	2.9-6.5
QRS süresi, (msec )			121.5 ± 27.25	
QT dispersiyonu (msec)			75.4 ± 25.53	
Doğrulanmış QT dispersiyonu (msec)			82.9 ± 26.52	

E; erkek, K; kız, EF;ejeksiyon fraksiyonu, LVEDD; sol ventrikül sonu diyastolik çapı, LVESD; sol ventrikül sonu sistolik çapı



**Şekil 1: TNNT2 geni 10. ekzon PCR-SSCP analizinde % 12'lik poliakrilamid jelin gümüş boyama sonucu elde edilen görüntüsü ve dizi analizi sonuçları. A; SSCP analizinde mobilite farkına bağlı olarak oluşan bant paternlerinin görüntüsü. 6. ve 14. Örneklerde farklı bant paternleri beyaz ok ile gösterilmektedir. B; normal bant paternine sahip örneklerin dizi analizi sonucu kromatogram görüntüsü. C; farklı bant paternine sahip örneklerin dizileme analizi sonucu, kromatogram görüntüsü.**



**Şekil 2: TNNT2 geni 13. ekzon PCR-SSCP %10' lik poliakrilamid jelin gümüş boyama sonucu elde edilen görüntüsü. SSCP analizinde incelenen örneklerde aynı bant paterni gözlenmiş, farklı bir bant paterni saptanmamıştır.**

**Tablo 3: DKMP'li hastalarda rs45527945 G>C polimorfizminin genotip-fenotip ilişkisi.**

	<b>n</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>p</b>
		<b>%</b>	<b>%</b>	
<b>DKMP'li</b>	23	87	13	0.015
<b>DKMP'siz</b>	100	98	2	
<b>KY yok</b>	10	80	20	0.385
<b>KY var</b>	13	92.3	7.7	
<b>LVH yok</b>	9	88.9	11.1	0.825
<b>LVH var</b>	13	85.7	14.3	
<b>STOT değ yok</b>	14	92.9	7.1	0.186
<b>STOT değ var</b>	8	71.4	28.6	
<b>LVEDD yok</b>	1	100	0	0.676
<b>LVEDD var</b>	20	85	15	
	<b>n</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>p</b>
		<b>(Ortalama±S.D)</b>	<b>(Ortalama±S.D)</b>	
<b>EF, %</b>	23	35.3 ± 8.9	28.0 ± 12.2	0.218
<b>FK, %</b>	23	16.0 ± 5.4	14.6 ± 6.3	0.684

S.D; standart sapma, KY; kalp yetmezliği, LVH; sol ventriküler hipertrofi, LVEDD; sol ventrikül sonu diyastolik çapı, EF;ejeksiyon fraksiyonu, FK; fraksiyonu kısıalma



## KAYNAKLAR

- 1- Alikasifoglu M, Tokgözoglu L, Acil T, Atalar E, Ali Oto M, Sirri Kes S, Tuncbilek E. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism in Turkish patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003;5:161-3.
- 2-Arola A, Jokinen E, Ruuskanen O, Saraste M, Pesonen E, Kuusela AL ve ark.. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathies in children and adolescents. A nationwide study in Finland *Am J Epidemiol* 1997;146:385-393
- 3-Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 201-11.
- 4-Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study of Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*.1989; 80:564-572.
- 5- Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2008;29:270-276.
- 6- Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanism of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 2002;82:945-980.
- 7- Greber-Platzer S, Marx M, Fleischmann C, Suppan C, Dobner M, Wimmer M. Beta-myosin heavy chain gene mutations and hypertrophic cardiomyopathy in austrian children. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:141-148.
- 8- Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA, Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:186-194.
- 9- Hall DG, Morley GE, Vaidya D, Ard M, Kimball TR, Witt SA ve ark. Early onset heart failure in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Res*. 2000;48:36-42.
- 10- Hanson EL, Jakobs PM, Keegan H, Coates K, Bousman S, Diemel NH ve ark.. Cardiac troponin T lysine 210 deletion in a family with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2002 ;8:28-32.,
- 11- Hershberger RE, Cowan J, Morales A, Siegfried JD. Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009; 2: 253-261.
- 12-Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B ve ark. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;343:1688 -96.
- 13-Kärkkäinen S, Heliö T, Jääskeläinen P, Miettinen R, Tuomainen P, Ylitalo K, Kaartinen M, Reissell E, Toivonen L, Nieminen MS, Kuusisto J, Laakso M, Peuhkurinen K. Two novel mutations in the beta-myosin heavy chain gene associated with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2004;6:861-8
- 14- Küçükkarabacı B, Birdane A, Güneş HV, Ata N, Degirmenci İ, Başaran A, Bilgin T. Association between angiotensin converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism frequency and plasma ACE concentration in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 65-6
- 15- Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzalez O, Tapscott T, Karibe A, Durand JB ve ark.. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001;104:2188 -93.
- 16-Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, Bahl A, Redwood C, Watkins H, Burke M, Elliott PM, McKenna WJ. Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2033-40.
- 17- Osterziel KJ, Perrot A. Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes. *Eur Heart J*. 2005;26:751-4.
- 18- Ozhan H, Zungur M, Yazıcı M, Akdemir R, Gündüz H, Erbilgen E, Albayrak S, Mutlu H, Uyan C, Kara İhsan, Kaya G. Angiotensin-Converting Enzyme, Angiotensin II Receptor, Apolipoprotein E and Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Dilated Cardiomyopathy. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2004;32:295-301.
- 19- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842
- 20- Rodríguez-García MI, Monserrat L, Ortiz M, Fernández X, Cazón L, Núñez L, Barriales-Villa R, Maneiro E, Veira E, Castro-Beiras A, Hermida-Prieto M. Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *BMC Med Genet* 2010;11:67.
- 21- Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, Walker C, Fishman M, Stainier DY. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* 2002;31: 106-110.
- 22- Sussman MA, Welch S, Cambon N, Klevitsky R, Hewett TE, Price R, ve ark. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to dilated cardiomyopathy in juvenile mice. *J Clin Invest* 1998;101:51-61
- 23- Tester DJ, Ackerman MJ: Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation* 2011;123: 1021-1037.
- 24- Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J* 2005;26:794-803.
- 25- Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ. et al. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1995;11:434-7.