

Ateroskleroz Gelişiminde Genetik Faktörlerin Rolü

Role of Genetic Factors in the Development of Atherosclerosis

Neslihan Çoban, Nihan Erginel - Ünaltuna

Genetik AD, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Toplumumuzda genel halk sağlığını etkileyen en önemli sorunlar arasında kalp damar hastalıkları gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların altında yatan temel faktör ise aterosklerozdur. Ateroskleroz, çevresel ve genetik faktörlerin etki ettiği multifaktöriyel bir hastalık olup, damar duvarının kalınlaşması ve esnekliğinin kaybolması ile karakterize edilmektedir. Ateroskleroz, dünya genelinde, en önde gelen ölüm nedenlerindedir ve birden fazla hastalığa neden olan patofizyolojik bir süreçtir. Ateroskleroz gelişiminde, plak oluşumu ve aktivasyonunda, çeşitli metabolik, enflamatuvar, enfeksiyöz veya hemodinamik faktörler yer almaktadır. Etiyolojik, patofizyolojik, klinik ve epidemiyolojik karmaşıklığına rağmen, ateroskleroz önenebilir bir durum olduğundan, oluşum mekanizmalarının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, kalp-damar hastalıkları ve bu hastalıkların tedavileri için yeni aday genlerin tanımlanması büyük önem kazanmaktadır. Bu grupta yer alabilecek hedef genler arasında bir transkripsiyon faktörü olan ROR α 'nın regüle ettiği genler de sayılabilir. ROR α 'nın, karaciğer üzerinden iltihabı yanıtı, kolesterol ve koagülasyonu etkileyebilmesi nedeniyle, ateroskleroz gelişiminde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu derlemede, ateroskleroz ile ilişkili olduğu düşünülen aday genlerin, aterosklerozun moleküler patogenezindeki rollerinin ayrıntılı olarak ele alınması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Ateroskleroz, genetik, inflamasyon, kardiyovasküler, metabolizma

ABSTRACT

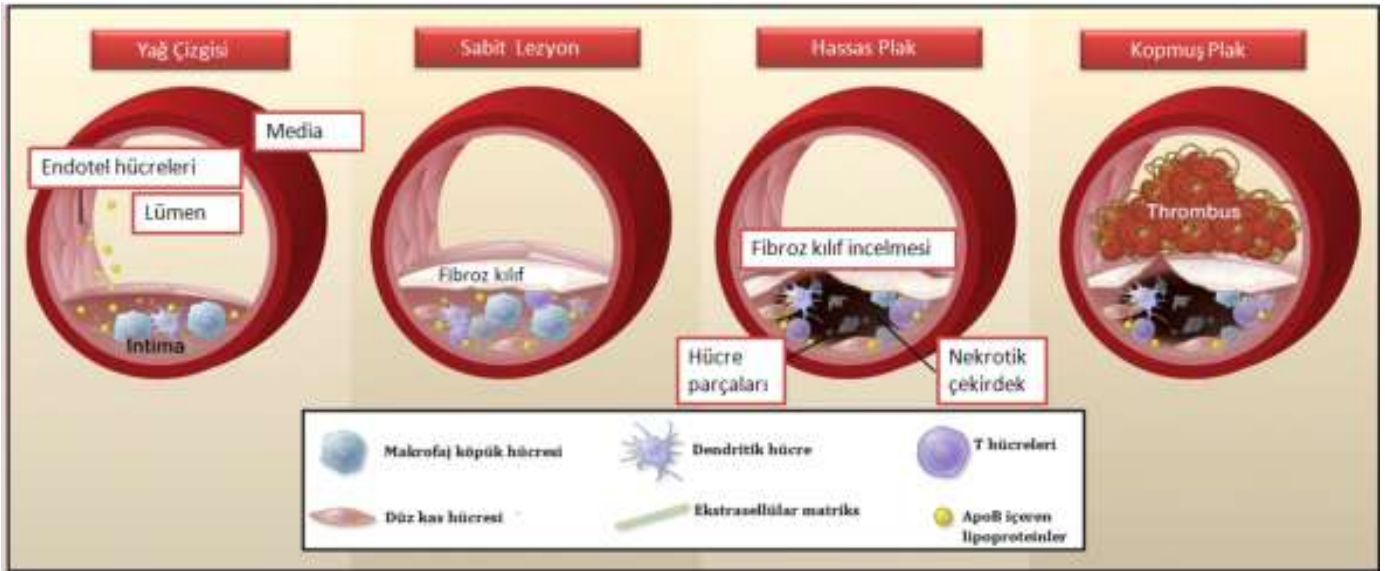
Cardiovascular diseases are one of the most important public healthy problems of our population and mostly atherosclerosis is the underlying mechanism in this disease. Atherosclerosis is a multifactorial and genetic based disease and characterized with the increase of vascular wall thickness and loss of elasticity. Atherosclerosis is one of the leading causes of death around the world and also a pathophysiological process that causes more than one disease. Several metabolic, inflammatory, infectious or hemodynamic factors are involved in the development of atherosclerosis and in the formation and activation of plaque. Although it has pathophysiological and etiologic complexity, atherosclerosis is an evitable disease. Thus, identification of the underlying developmental mechanisms is very crucial. Therefore, it is important to identify new candidate genes for these diseases and their treatment. Within such group of genes, there are ROR α target genes, as well. Because of its ability to act on cholesterol, coagulation and inflammatory response through the liver, ROR α is supposed to play crucial role in the development of atherosclerosis. In this review, our aim is to approach the involvement of the candidate genes in the molecular pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis, genetics, inflammation, cardiovascular, metabolism

GİRİŞ

Sağlık sorunlarının başında gelen kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya genelinde yılda 17 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 2030 yılına kadar kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölüm sayısının 24 milyon kişi artacağı öngörülmektedir ve bu sayı tüm ölümlerin dörtte üçünden daha fazladır (2). Bu nedenle, küresel bir sağlık sorunu olan kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıkların altında yatan temel bir faktördür. Ateroskleroz, arteriyel intimada kolesterol birikiminin neden olduğu aterosklerotik plak oluşumu ile sonuçlanan inflamatuvar bir hastalık olarak nitelendirilmektedir (3). Damarın intima tabakasındaki hasarlanma sonucunda kolesterol birikmesini takiben köpük hücre oluşumu ve düz kas hücre artışına bağlı olarak plak gelişmektedir (Şekil 1). Bu durum sonucunda damar duvarı kalınlaşmakta, arter çapı daralmakta ve damar tıkanmaktadır (4). Ateroskleroz

komplikasyonları arasında aterotromboz, akut koroner sendrom, miyokard infarktüsü (MI), anjina, ani kardiyak ölüm (5) ve inme (6) bulunmaktadır. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yüksek serum düzeyleri ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düşük serum düzeyleri başta olmak üzere hipertansiyon, sigara, diyabet ve yaşlanma ateroskleroz için tipik risk faktörleri arasında yer almaktadır (7). Multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren koroner aterosklerozun gelişiminde genetik faktörlerin önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (8-13). Ateroskleroz için risk faktörlerinin başında, inflamatuvar sürecin oluşumunda yer alan genler, kolesterol metabolizma bozukluğu ile ilişkili olan genler ve cinsiyet risk faktörüne etki ettiği bilinen genlerin ayrıntılı olarak incelenmesi ön planda tutulmalıdır. Bu yolaklarda yer alan genlerin düzenleyicisi olan transkripsiyonel faktörlerin etkilerinin ve yeni hedef genlerinin belirlenmesi, ateroskleroz patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlayarak yeni bilgiler eklenmesi açısından önem taşıyacaktır.



Şekil 1: Aterosklerotik lezyon oluşumu. Erken yağ çizgisi, subendoteliyal alana apoB içeren lipoproteinlerin (ApoB-LP) birikmesi sonucunda dendritik ve makrofaj hücrelerinin bu bölgeye göçü ile karakterizedir. Aterosklerotik lezyon ilerledikçe, düz kas ve T hücreleri de intimaya sızmakta ve apoB-LP birikimi artmaktadır. Hassas plaklar, apoptotik hücre birikimi ve kusurlu fagositik temizleme sonucunda oluşan lipid yüklü nekrotik çekirdek ile karakterizedir. Fibroz kılıfın incelmeye ile lezyon kararlılığı azalmakta ve yırtılmaya eğilimli aterosklerotik plaklar ile trombus ortaya çıkmaktadır (14).

1. Ateroskleroz için Temel Risk Faktörleri

Aterosklerotik ve kardiyovasküler hastalıklar için bazı risk faktörleri tanımlanmıştır. Temel risk faktörler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Ateroskleroz için klasik risk faktörleri arasında yaş, erkek cinsiyet, kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili aile öyküsü,

diyabet, hipertansiyon, sigara, LDL-K yüksek serum düzeyleri, HDL-K düşük serum düzeyleri ve obezite yer almaktadır (7). Bunlara ek olarak küçük, yoğun LDL-K, oxLDL, insülin direnci (IR), lipoprotein (a) [Lp (a)], apolipoprotein (apo) E4 izoformu, HDL-bağlı paraoksonaz-1 (PON1), hipertrigliseridemi ve trigliseridce zengin lipoproteinler (TZL) gibi risk faktörleride yer almaktadır. (7, 15-17).

Tablo 1: Kardiyovasküler Hastalıklar ve Ateroskleroz için Risk Faktörleri

Yaş	Lezyonlar erken çocukluk döneminden itibaren başlasa da (18), ileri yaş kardiyovasküler hastalıklar için risk oluşturmaktadır (19).
Cinsiyet	60 yaşın altındaki orta yaşlı erkeklerde, kadınlara göre 2-5 kat daha fazla koroner kalp hastalığı (KKH) riski varken, cinsiyet bağımlı risk yaşlanma ile azalır (20, 21).
Sigara	Sigara özellikle genç kadınlarda, MI için güçlü bir çevresel risk faktörüdür. Yapılan araştırmalarda iki yıl sigarayı bırakma sonrasında inme riskinin azaldığı, beş yıl sonunda ise sigara içmeyenler ile eşit risk taşındığı gözlenmiştir (22).
Hipertansiyon	Kardiyovasküler hastalıklar için hipertansiyon yüksek risk oluşturmaktadır (7).
Obesite ve Fiziksel İnaktivite	Obezite ve fiziksel inaktivite serum lipidleri, kan basıncı ve insülin direnci gibi diğer risk faktörlerini etkileyerek kardiyovasküler hastalık riskini arttırmaktadır (7).
Serum Kolesterol	Yüksek LDL kolesterol, düşük HDL kolesterol ve özellikle LDL / HDL oranı (yani apolipoprotein B / apolipoprotein AI oranı) (7) KKH'lar için risk faktörleridir ve statin grubu ilaçlar ile serum kolesterol düzeyleri düzenlenerek KKH riski azaltılmaktadır (23).
Tip2 Diyabet	Tip2 diyabete sahip kişilerde KKH riski 2-4 kat artmaktadır (7, 24).
Aile Öyküsü	Aile öyküsünün toplam risk profilinin %40'ını etkilediği tahmin edilmektedir (25).

Sigara ve fiziksel hareketsizlik, yaşam tarzı tercihleri iken yaş, cinsiyet ve genetik yapı biyolojik faktörlerdir. Hipertansiyon, obezite, serum kolesterol ve tip II diyabet çevresel ve biyolojik faktörlerden etkilenen risk faktörleridir (25). Beslenme alışkanlıkları ve yaşam biçimi gibi kontrol edilebilir etkenlerin yanında, bireylerin genetik altyapısının da ateroskleroz için eğilim ya da korumaya ne derece katkı yaptığı toplumdaki topluma farklılık göstermektedir (26). Dünya çapında 52 ülkeden

15000 olgu içeren INTERHEART çalışmasında, MI riskinin yaklaşık %90'ınının sigara, apolipoprotein B/apolipoprotein A-I oranı, hipertansiyon, abdominal obezite, fiziksel aktivite azlığı, yetersiz meyve ve sebze tüketimi, psikososyal faktörler ve alkol tüketimi olduğu belirlenmiştir (27). Aynı çalışma ile aile öyküsünün MI için önemli bir risk faktörü olmasından ziyade, esas olarak çalışılan diğer risk faktörlerinin yanında total risk profiline katkıda bulunarak etkili olduğu belirlenmiştir.

2. Genetik Risk Faktörleri

Tangier hastalığı (ABCA1 genindeki mutasyonun neden olduğu hastalık [8]) ya da ailevi hiperkolesterolemi (LDL reseptörü (LDLR) genindeki mutasyonun neden olduğu hastalık [9]) gibi tek gen hastalıklarında ileri aterosklerotik lezyonlar oluşmasına rağmen, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim sonucunda gelişen ateroskleroz sıklığı daha çok gözlenmektedir. Yatkınlık genleri ya da bu genlerin belirli allellerinin, popülasyondaki frekansları ile ateroskleroz gibi karmaşık bir hastalığa yakalanmada kişinin total riskine oldukça ılımlı katkıları olduğu görülmektedir (25). Bazı genler ise orta düzeyde artmış bir ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riskine neden olmaktadır. Çeşitli çalışmalarda bu genlerin çevresel risk faktörlerinden ya da diğer genetik faktörlerden bağımsız olarak bir riske neden oldukları gösterilmiştir. Meta-analiz çalışmaları sonucunda kardiyovasküler hastalıklar ile apolipoprotein E (APOE), 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), kolesterol ester transfer protein (CETP), plazminojen aktivator inhibitör-1 (PAI-1) ve fibrinojen beta-zincir genleri ilişkili bulunmuştur (10-13).

Aterogenezin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında iki ana yaklaşım ele alınmaktadır. Bunlardan ilki, genom boyu bağlantı çalışmaları ile aterogenezi regüle eden kantitatif özellik lokuslarının (quantitative trait loci-QTL) bulunmasıdır. İkinci yaklaşım ise aday gen yaklaşımı ile in vivo ve in vitro deneyler sonucunda aterogenez yollarındaki rolleri bilinen genler ile yapılan ilişkilendirme çalışmalarıdır. Ateroskleroz gelişimini bir dereceye kadar etkileyen yüzlerce gen vardır. Şimdiye kadar insan fizyolojisi ile ilişkileri tam olarak belirli olmasa da, ateroskleroz oluşumu ile ilgili çok sayıda transgenik ve knock-out hayvan modelleri geliştirilmiştir. Genom boyu bağlantı çalışmalarında ise, plazma HDL-K düzeylerini etkileyen genleri tanımlamak için deney fareleri kullanılmıştır (28). 50'den fazla inbred fare soyunda yoğun tek nukleotid polimorfizm (SNP) haritaları ve haplotip yapılarının daha iyi anlaşılması ile bu tür çalışmaların güvenilirliği artmıştır.

2.1. Aterosklerozda Genom Boyu İlişkilendirme (Genome Wide Association- GWAS)

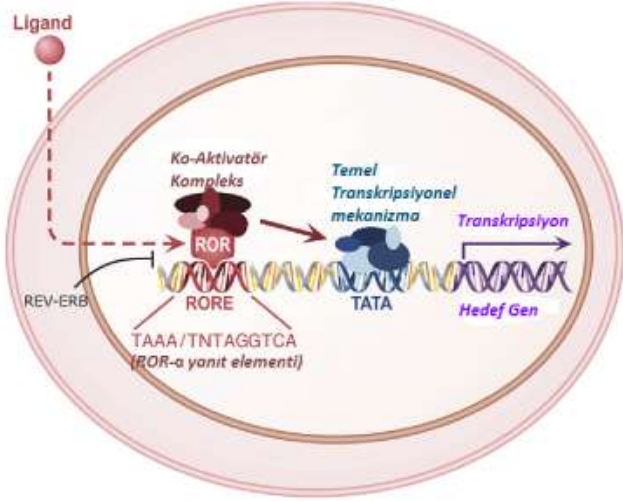
Bir genin aterosklerotik hastalıklar ile ilişkileri incelenirken, genellikle genin belirli aterosklerotik yollardaki rolü esas alınmaktadır. Bu çalışmalar göz önüne alınarak genin SNP'lerinin kardiyovasküler hastalıklar üzerine olan etkisi incelenmektedir. Ancak tek gen ilişkilendirme çalışmalarının yanında son zamanlarda yüksek veri çıktılı genotipleme araştırmaları sonucunda ateroskleroz dahil olmak üzere pek çok hastalık ile ilişkili genlerdeki SNP'lerin çalışılması mümkün olmuştur. Japon popülasyonunda büyük ölçekli vaka-kontrol çalışmasında, genom boyu 92.788 SNP'nin genotiplemesi sonucunda LTA (lymphotoxin-alpha) geninin polimorfizmleri ile MI ilişkisi tanımlanmıştır (29). Daha sonraki çalışmalarda, tüm genomda

11.055 SNP'nin taranması ile dört genin (PALLD, KOS1, TAS2R50, OR13G1) MI ile ilişkili olduğu gözlenmiştir ve iki farklı popülasyonda bu ilişkiler doğrulanmıştır (30). Shiffman ve arkadaşlarının daha sonraki çalışmalarında tüm genom üzerinde 11.647 SNP'nin taranması sonucunda VAMP8 ve HNRPUL1 genlerinin MI riski ile ilişkilerini tanımladıktan sonra farklı popülasyonlarda inceleme yaparak sonuçları doğrulamışlardır (31). Farklı gruplar tarafından araştırılan bu iki genin bulunduğu kromozom bölgesindeki (9p21.3) SNP'lerin 12 farklı popülasyonda incelemesi sonucunda MI ile anlamlı ilişki gösterdikleri belirlenmiştir (32-34).

Ayrıca, genom boyu bağlantı çalışmaları ile aterogenezi regüle eden kantitatif özellik lokusları bulunmuştur. Ateroskleroz için insanda yaklaşık 40, farede ise 30 tane kantitatif özellik lokusu tespit edilmiştir (35). Henüz ilişkili gen ya da genler keşfedilmemiş olsa da, şimdiye kadar yapılan QTL çalışmalarında da 10 farklı toplumda teyit edilen 9q21.3 lokusu ateroskleroz için en anlamlı lokus olarak belirlenmiştir (36-38).

2.2. Ateroskleroz gelişiminde önemli bir etkiye sahip olan transkripsiyon faktörü ve hedef genleri

Nükleer reseptörler, hücrelerin içindeki metabolitlerden oluşan küçük hidrofobik ligandların bağlanması ile aktif hale gelen ve hedef genleri devreye sokan intraselüler reseptör özellikli transkripsiyon faktörleridir. Fizyolojik önemleri nedeniyle, çoğu nükleer reseptörler birçok hastalık için terapötik hedefler olarak incelenmektedirler. Transkripsiyon faktörlerinin nükleer reseptör üst ailesinden olan ROR α (Retinoid related Orphan Receptor- Alpha) geni 15. kromozomda lokalizedir ve 15 ekzona sahiptir. ROR α 'nın amino ucunun uzunlukları değişik, DNA ve ligand bağlama domeinleri aynı olmak üzere dört tane izoformu vardır (39). ROR α 'nın DNA bağlama bölgesi, reseptörün DNA üzerindeki AT bakımından zengin 6 bazlık bölgeye komşu AGGTCA dizisine monomer olarak bağlanmasını sağlar. ROR yanıt elementi (ROR Response Element, RORE) olarak tanımlanan bu diziler aracılığıyla hedef genlerini tanıyan ROR α , etkileştiği düzenleyici proteinler (ko-aktivatör ve ko-represörler) ile transkripsiyonun başlamasını sağlar (39) (Şekil 2). ROR α geni, biyolojik saatin düzenlenmesi, kolesterol metabolizması, iltihabi yanıtın baskılanması, kas, kemik ve beyincik gelişimi gibi birçok biyolojik sürecin kontrolünde görev alan genlerin transkripsiyonel düzenleyicisidir (39-42). ROR α 'nın işlevi, staggerer fare soyunda gözlenen bulgulardan yola çıkılarak anlaşılmıştır. ROR α geninde doğal bir mutasyon taşıyan staggerer (Ror- α /-) fare soyunda dislipidemi, uzamış immün yanıt, osteoporoz ve ataksi gibi bulgular tanımlanmıştır (43-46). Bu bulguların yanı sıra yaygın ateroskleroz gelişimi de gözlenmektedir. Gözlenen bulguların birçoğu, ROR α 'nın bilinen hedef genleri ile açıklanabilmektedir.



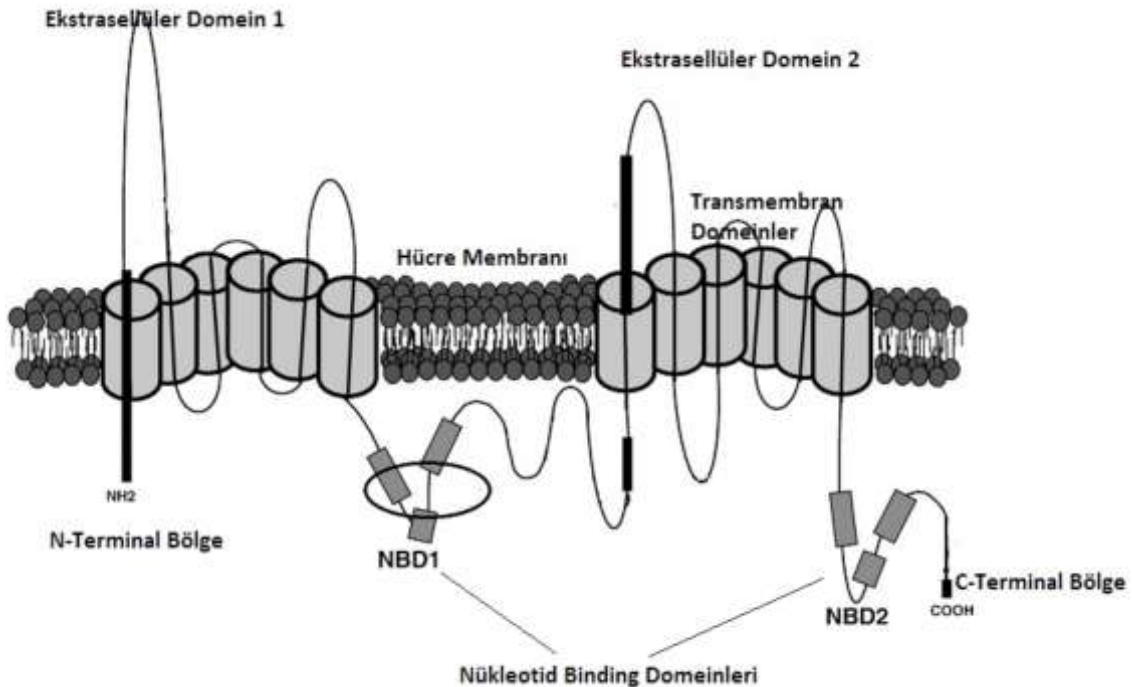
Şekil 2: ROR α transkripsiyon faktörünün hedef geni düzenleme mekanizması. ROR α , 6A/T bakımından zengin bir bölgenin ilerisinde bulunan GGTC motifinden oluşan ROR yanıt elementine (RORE) bir monomer olarak bağlanır. REV-ERB'ler RORE'ye bağlanmak için ROR α ile yarışır. ROR α 'nın ko-aktivatörleri ile etkileşimi sonucunda hedef gen transkripsiyonu pozitif yönde etkilenirken, ko-represörleri ile etkileşimi hedef gen transkripsiyonunu negatif yönde etkilemektedir. ROR α 'nın birçok fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve çeşitli patolojik durumlarda önemli bir rolü olabilir (39).

Aterosklerotik plak oluşumunda kilit rol oynadığı bilinen endotel ve monosit hücre tiplerinde ROR α transkripsiyon faktörünün hedef genleri üzerinden oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (47). Genetik aterosklerotik risk

faktörlerinin başında, inflamatuvar sürecin oluşumunda önemli rolü olan genler, kolesterol metabolizma bozukluğu ile ilişkili genler ve cinsiyet risk faktörüne etki ettiği bilinen genler gelmektedir. Endotel ile monosit hücrelerinde anlatımı doğrudan ROR α transkripsiyon faktörüne bağlı olan hedef genler aterosklerozun moleküler mekanizmasının anlaşılması ve tedavisi açısından önem taşımaktadır. Bu genlerden bazılarının, ateroskleroz patogenezindeki rolleri, derlemenin bu bölümünden sonra detaylı olarak ele alınmıştır.

2.2.1. ABCA1 Geni (ATP binding cassette transporter A1)

ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcısı (ABC) süper ailesinin bir üyesi olan ABCA1 geni 9q31 bölgesinde lokalize, 50 ekzona sahip olan 70 kb uzunluğunda oldukça büyük bir genidir. 2261 amino asitlik bir integral membran proteini kodlamaktadır. İnsan ve fare ABCA1 proteininin %94 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. En fazla ekspresyonun plasenta, karaciğer, akciğer, adrenal bezler ve bütün fetal dokularda olduğu, en düşük ekspresyonun ise böbrek, pankreas, meme bezleri ve kemik iliğinde olduğu gösterilmiştir. Hücre membranının bir yanından diğer yanına uzanan bir protein olan ABCA1 (Şekil 3), etkin bir şekilde kolesterol akışı için kritik rol oynamaktadır. Kolesterol ester depolarından salgılanan kolesterol, plazma membranında birikmektedir. Bunun sonucunda kolesterol düzeyleri yükseldikçe, ABCA1'e bağlanan ATP'nin fazla kolesterolü membranın dışına atmak üzere hidrolize olduğu belirtilmektedir (48). Böylece dolaşıma geçen kolesterol, lipidden fakir ApoA-I tarafından alınır. Bu işlem periferik dokulardaki (arter duvarındaki makrofajlardan) fazla kolesterolün karaciğere taşınmasını ve orada eliminasyonunu kapsamaktadır.



Şekil 3: ABCA1 protein yapısının şematik gösterimi. Transmembran bölgeleri, ekstrasellüler ilmekleri, nükleotid binding domeinleri gösterilmektedir.

Makrofajlarda yüksek düzeyde eksprese edilen ABCA1'in rolü, resesif kalıtmalı nadir bir hastalık olan Tangier hastalarında (TD), ABCA1 gen mutasyonlarının keşfedilmesinden sonra belirlenmiştir. Bu hastalık hücrel kolesterol ve fosfolipidlerin, lipidden fakir ApoA-I tarafından alınmasındaki eksiklik ile karakterize edilmektedir. ApoA-I, disk biçimindeki pre-beta HDL'yi oluşturmak üzere kolesterol ve fosfolipid alamadığı için böbrek tarafından hızla katabolize edilmektedir (48). Bu hastalığın en dikkat çekici özelliği plazma HDL-K'ün neredeyse tamamen yokluğu ile kolesterol ve lipid akışının azalması sonucunda dolaşımda ileri derecede artmış kolesterol düzeylerinin gözlenmesidir (49). Tangier hastalarında, LDL-kolesterol düzeyi de azalmaktadır (normalin %40'ı mevcut). Ayrıca bu hastalarda, KKH ve erken ölüm riskide artmaktadır (48). Tangier hastalarında ABCA1 geninde pek çok mutasyon tanımlanmıştır (50).

İnsan ABCA1 genindeki mutasyonlar, klasik Tangier hastalığı gibi Ailesel HDL eksiklik sendromuna (FHA)'da neden olmaktadır (51). ABCA1 genindeki heterozigot mutasyonlar, ailesel HDL eksikliği sendromu ile karakterize edilir. ABCA1 heterozigot mutasyonlarını taşıyan kişiler, plazma HDL-K'ün yaklaşık %50 sine sahip olmakla birlikte bu hastalarda LDL düzeyi normaldir (52). Etkilenmiş aile üyeleri, etkilenmemiş aile üyeleri ile karşılaştırıldığında, koroner arter hastalığı gelişme ve erken ölüm riski üç kattan daha fazla artmaktadır (53).

Yapılan deney hayvanı çalışmalarında ise, ABCA1 genindeki mutasyon ya da delesyonların kolesterol transferinde bozukluk oluşturarak ateroskleroz gelişimini arttırdığı kanıtlanmıştır. ABCA1-/- fareler ile yapılan çalışmalarda serum kolesterol düzeylerinde belirgin bir azalma olmasına rağmen, aterosklerotik lezyon gelişiminde artış olduğu bildirilmiştir (54-56). Ayrıca, ABCA1-/-/LDL-R-/- ve ABCA1-/-/ApoE-/- farelerde, yüksek oranda ateroskleroz gelişimi ve ters kolesterol transfer fonksiyon bozukluğu belirlenmiştir. ABCA1-/-/ApoE-/- farelerinde karaciğerde, pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve TNF- α 'ın büyük oranda uyarıldığı ve bu hayvanlarda serum IL-6 düzeylerinin artması sonucunda inflamatuvar değişiklik olduğu gözlenmiştir (57). Pro-inflamatuvar sitokin olan IL-6, endotelial disfonksiyon, düz kas hücrelerini uyarması ile bu hücrelerin çoğalması ve yer değiştirmesi gibi sonuçlara neden olmaktadır (58). Doğal ROR α mutasyonu taşıyan ve ateroskleroz geliştiren staggerer farelerin karaciğerlerinde ters yönde kolesterol transportunun ve ABCA1 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (59).

ABCA1 geninde çok sayıda polimorfizm belirlenmiştir. Bunlardan yaklaşık 10 tanesi dikkate değer bir şekilde genel popülasyonda ateroskleroz riski ve lipid düzeylerindeki değişiklik

ile ilişkilendirilmiştir (60).

2.2.2. Aromataz (CYP19A1 P450arom) Geni

15q21.2 kromozomal bölgede bulunan CYP19A1 geni, östrojen biyosentezinde önemli bir enzim olan aromatazı kodlamaktadır. Aromataz enzimi C19 steroidleri östrojenlere (C18) çevirmektedir (androstenedionu östrona-E1, testostereone östradiole-E2 dönüştürür). CYP19A1 geni yaklaşık 120 kb büyüklüğünde olup, 10 ekzondan oluşmaktadır (61). Translasyon başlangıç noktası ekzon 2, bitiş noktası ise ekzon 10'dur ve bu bölgenin tamamı yaklaşık 30 kb kadardır. Translasyona uğramayan ilk ekzonunda bulunduğu bölgeyi içeren 5' ucu ise yaklaşık 90 kb uzunluğundadır (123). İnsan aromataz geni dokuya spesifik promotörlerin kontrolü altında transkripsiyona uğramaktadır. Gendeki mutasyonlara bağlı olarak aktif olan promotörler ve alternatif kesim sonucunda gen ürününde ya da miktarında değişiklik meydana gelmektedir.

Erkeklerin koroner arter hastalığına kadınlara oranla 2 ila 5 kat fazla yakalanma nedeni olarak eksojen ve endojen östrojen üretiminden yoksun olmaları ileri sürülmektedir (62). Testosteronun KKH ile pozitif korelasyon gösteren total kolesterol ve LDL-K düzeyinin yükselmesi (62) ve aterom plak genişliğinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (63). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda ise, aterosklerozun ilerlemesinde östrojenin koruyucu faktör olarak rol aldığı gösterilmiştir (64). Östrojenin bu etkisi, artmış HDL-K ve azalmış LDL-K düzeyleriyle olan ilişkisi ile açıklanırken (65), diğer yandan da östrojenin LDL-K'e karşı antioksidan etkisinin olduğu da bilinmektedir (66). Ayrıca, östrojenin aterosklerozdaki koruyucu rolü, kardiovasküler dokulardaki biyolojik etkisi ile açıklanabilir. Bu etki, aort duvarındaki elastin ve kollajenin birikimini baskılaması ile ilişkilendirilmektedir (67). Harada ve arkadaşlarının insan düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada, aromataz ekspresyonunun artması ile testostereondan östrojen üretiminin de arttığını göstermişlerdir (68). İnsan endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, aromataz aracılığı ile testostereondan östrojen üretimi sonucunda VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) mRNA ekspresyonunun ve protein üretiminin azaldığı gösterilmiştir (69). Aynı çalışmada, aromataz inhibitörü eklendiğinde testostereon bu etkisinin ortadan kalktığı, östrojenin ise aromataz inhibitörünün varlığından etkilenmeden VCAM-1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (69). Buna karşın, otopsi vakalarından alınan aort dokusunda yapılan çalışmada, aromataz ekspresyonunun erkeklere oranla kadın vakalarda daha fazla olduğu belirlenmiştir (70). Özellikle tipVa lezyonlarda aromataz ekspresyonunun diğer lezyon tipleri ile yapılan karşılaştırma sonucunda fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile aort dokusunda, gonad tipteki promotörlerin (I.3 ve PII) kullanımının fibroblast tip promotöre

(I.4) göre anlamlı derecede yüksek olduğu da gösterilmiştir.

Aterosklerozda etkili bir transkripsiyon faktör olduğu düşünülen ROR α 'nın, meme kanseri hücrelerinde promotor I.4'ü yeni bir yanıt elementi ile aktive ederek aromatazın mRNA ekspresyonu ve lokal östrojen üretimini arttırdığı belirlenmiştir (71). ROR-Alfa geni bir steroid /tiroid hormon reseptör ailesinden (ligand-bağımlı transkripsiyon faktör) geldiğinden dolayı aromataz transkripsiyonunu düzenlemesi mümkündür. Sitokrom P450 enzim aktivitesinin transkripsiyonel aktivasyon ile uyarıldığı aynı çalışmada kanıtlanmıştır. Meme kanseri hücrelerinde de kullanılan endotelial promotor olan PI.7 ile arteriyel promotor I.4'ün ateroskleroz için önemli promotor tipleri olabileceği ve ROR α 'nın bu promotorları aktive edebileceği muhtemeldir. ROR α 'nın doğal ligandları arasında bulunan melatoninin, meme kanserinde östrojenin başlıca lokal kaynağı olan meme adipoz fibroblastlarında aromataz ekspresyonunu ve aktivitesini baskıladığı Knowler ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Melatoninin fizyolojik konsantrasyonunun (1nM) aromataz ekspresyonunu PI.4, PI.3 ve PII üzerinden baskıladığı aynı çalışma ile gösterilmiştir (72).

CYP19A1 geninin knock-out fare modellerinde (ArKO) östrojen yetersizliği ve CYP19A1 geninin kodladığı aromataz enziminin yetersizliği gözlenmiştir (73). Bu farelerin fenotipi karnın içi yağ birikimi ve yaş ile ilerleyen obezite ile karakterizedir. Obezitenin ise insulin direnci sonucunda kanda lipid düzeyi ve hiperinsülineminin artışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Aromataz enzimi yağ dokusunda bulunmakta olup adipoz doku, perifer aromatazasyonun yapıldığı temel yerdir. Adipoz dokuda yaşla ve obezite ile birlikte östrojen üretimi de artmaktadır, bu artıştan sorumlu olan aromataz geninin bu dokudaki aktif promotörü PI.4'tür (74).

Östrojen biyosentezinde önemli rol alan CYP19A1 genindeki varyantlar, kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olan hipertansiyon, obezite ve kan basınç düzeyleri ile bağlantılarından dolayı ateroskleroz riskini etkilemektedirler. Şimdiye kadar CYP19A1 genindeki çok az sayıda genetik varyant ile kardiyovasküler hastalık ilişkilendirme çalışması yapılmıştır (75-77). 3'UTR de bulunan rs10046 polimorfizminin hipertansiyon ve kan basınç düzeyleri ile olan anlamlı ilişkileri sınırlı sayıda çalışmada gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir ilişkilendirme çalışmasında rs10046 polimorfizminin, sadece obez olmayan kadınlarda sistolik kan basıncının azalması ile bağlantılı iken (76), başka bir çalışmada ise erkek ve kadında esansiyel hipertansiyon ile anlamlı ilişki saptanmıştır (75).

2.2.3. MIF (Makrofaj Migrasyon İnhibitor Faktör) Geni Makrofaj Migrasyon İnhibitor Faktör (MIF) 22q11.23

kromozom bölgesinde lokalize olan oldukça küçük bir genidir. 189 bp ve 95 bp uzunluğundaki iki intronla ayrılmış, 173, 205, 203 bp uzunluğundaki 3 ekzondan oluşan genin toplam uzunluğu yaklaşık 1.7 kb'dır. İnsanda her dokuda eksprese olan MIF geni, çok sayıda hücre tipinde de eksprese olmaktadır. Aterogenezde önemli rolleri olan lenfosit, monosit, makrofaj, endotel ve fibroblast hücrelerinde de önemli ölçüde MIF ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir (78). MIF proinflamatuvar, hormonal ve enzimatik aktivitelere sahip bir protein olup, inflamasyon öncesi süreçlerde ve inflamasyon alanında makrofajların aktivitesi ile immünitinin düzenlenmesinde önemli görevleri vardır.

Aterosklerotik lezyon gelişiminde, dolaşımda bulunan immun hücrelerin damar duvarına göçü ve bu bölgedeki inflamasyonun gelişiminde önemli kanıtlar bulunmuştur (79). Aterosklerozun farklı aşamalarında, lökositlerin damar duvarına göçü fonksiyonel türdeki kemokinler ile kontrol edilmektedir (80). MIF kemokinler ile aynı fonksiyonel özelliğe sahip olduğundan kemokin benzeri fonksiyonel sitokin olarak adlandırılmakta ve bu fonksiyonundan dolayı aterosklerotik vasküler hastalıklarda kritik rol oynamaktadır. MIF/- fareler ilk kez 1999 yılında MIF geninin üç ekzonunun delesyonu ile üretilmiştir (81). MIF/- farelerde çok sayıda akut ve kronik inflamatuvar hastalıklara yatkınlık gözlenmiş olup bunların arasında aterogenezde bulunmaktadır (82).

MIF'in aterosklerotik ekspresyonu hiperkolesterolemili tavşanlarda gösterilmiş olup abdominal aorttaki geniş lezyonlar ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Vasküler endotel hücrelerinde erken yağ çizgisi ve ilerlemiş lezyonlar, lezyon içermeyen endotel hücreleri ile karşılaştırıldığında MIF gen ekspresyonunun ve protein üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın, düz kas hücrelerinde sadece subendotelial makrofaj birikimi ile oluşan erken lezyonda MIF ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (83). Makrofajlar lipopolisakkarid (LPS), TNF- α , İnterferon- γ ile aktive edildiğinde, MIF'in yüksek miktarda salgılandığı gösterilmiştir (84). Bu durum makrofaj türevli MIF'in aterogenezdeki rolünü açıklayabilir. Erken yağ çizgi lezyonunda monositlerin endotel hücrelerine yapışması, subendotelial hücrelerde çok güçlü MIF ekspresyonunun olması ve ilerlemiş plaktaki makrofaj ile köpük hücrelerinde ekspresyonun azalması yapılan araştırmalar sonucunda gösterilmiştir. Bu sonuçlar MIF'in monosit göçünü tetikleyerek erken lezyon gelişimine katıldığı hipotezini desteklemektedir. Farklı bir çalışmadan elde edilen veriler sonucunda ise, MIF'in proaterojenik etkisinin makrofaj ve T-hücre göçünü arttırmasından dolayı olabileceği belirtilmiştir (83).

Kalp transplantasyonu yapılan hastalardan ya da otopsi vakalarından alınan dokular kullanılarak yapılan çalışmalarda,

tavşan modelindeki sonuçlar doğrulanmıştır. Normal histolojiye ya da tipI lezyona sahip arterlerde makrofaj infiltrasyonu olmadan, sadece endotel ve düz kas hücrelerinde düşük miktarda MIF ekspresyonu olduğu, tipII (yağ çizgisi) lezyon varlığında aynı hücre tiplerinde ekspresyonun anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Hiperkolesterolemik tavşanlardaki bulgulara karşın, insan arterlerindeki ilerlemiş lezyonlarda MIF ekspresyonunun hücrelerin sayısında arttığı belirlenmiştir (85).

Hiperlipidemik LDL-R-/- fare çalışmaları ile doğal olarak oluşturulan ateroskleroz sonucunda aortlarda tipik aterosklerotik plakları gelişmektedir. MIF+/+/LDL-R-/- fareleri ile karşılaştırıldığında, MIF-/-/LDL-R-/- olan farelerdeki lezyon alanında ve damarın intimal kalınlığında önemli derecede küçülme olduğu gözlenmiştir (82). Aynı zamanda, MIF-/-/LDL-R-/- farelerinde lezyon ilerlemesinin inhibe olduğu gözlenmekle birlikte bu sonucun neointimal hücrelerin büyüme oranındaki azalma ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada MIF-/- farelerde serum total kolesterol ve LDL-K düzeylerinin de azaldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ApoE-/- farelerde oluşan aterosklerotik plaklarda en fazla endotel ve köpük hücrelerinde olmak üzere bol miktarda MIF ekspresyonu gözlenmiştir (86). MIF inhibe edildiğinde ise dikkat çekici bir şekilde intimal makrofaj hacminin azaldığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada, ApoE-/- farelerine MIF antikoru verildiğinde ise aort duvarındaki ICAM-1, TNF- α , CD40 ligand, matris metalloproteaz-2 ve interlökin-12'nin lokal ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle MIF'in aterogenezin inflamatuvar bileşeninde etkili olduğu ve plak hassasiyeti ile

trombotik arteriyel tıkanmada dikkat çekici şekilde önemli olabileceği öngörülmektedir.

Endotel ve makrofaj hücrelerinin in vitro çalışmalarında, okside olmuş LDL'nin MIF ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. oxLDL uygulandıktan 24 saat sonra insan endotel hücrelerinde MIF ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (85). Bununla birlikte, oxLDL makrofajlarda MIF salgılanmasını tetiklemektedir. Bu sonuçlar, insanda ateroskleroz ilerlemesinde (plak gelişiminin başlamasına, ilerlemiş lezyonun büyümesine ve regülasyonuna katılmasına kadar) MIF'in çok önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

İnsan MIF geninin promotör bölgesinde iki önemli SNP bulunmaktadır. Bunlar, -173G/C (rs755622) ve -794 bölgesinde bulunan 5-8 CATT tekrarlarıdır (rs5844572) (87-88). İn vivo ve in vitro koşullarda yapılan çalışmalarda -173C allelinin MIF ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (89). Büyük çaptaki vaka-kontrol çalışmalarında, MIF genotipinin dolaşımdaki MIF düzeyi, MI insidansı ve ani kardiyak ölümlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (90). MIF serum düzeyi KKH ile korelasyon göstermezken, -173C allelini içeren haplotipler KKH için artmış risk ile ilişkili bulunmuştur (90). -173G/C değişiminin KKH ile mekanistik bağlantısı ile birlikte çeşitli inflamatuvar hastalıklara eğilimi arttırdığı da gösterilmiştir ve bu nedenle vasküler inflamasyon ile aterogenezde rol alabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Kardiyovasküler hastalıklar, dünya genelinde en önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almakta ve bu hastalıkların büyük bir oranından da ateroskleroz sorumlu tutulmaktadır. Aterosklerozun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Ateroskleroz başlangıcında ve ilerlemesinde önemli olan metabolizma yollarında yer alan genlerin aterosklerotik doku ve hücrelerdeki etkilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve bu genlerin transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi, bu konuda daha ileri araştırmaların yapılması açısından önemli bir adım niteliği taşıyacaktır.

KAYNAKLAR:

- 1) World Health Organization. Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Switzerland: WHO Press; 2009.
- 2) Cardiovascular diseases [Internet]; c2011 [cited 2011 August/1]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>.
- 3) Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:937-954.
- 4) Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006 Jul;6(7):508-19.
- 5) Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:C13-8,
- 6) Badimon L, Vilahur G. Platelets, arterial thrombosis and cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 24 Suppl 2007; 1:30-39,
- 7) Fruchart JC, Nierman MC, Stroes E, Kastelein J, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*; 2004;109:15-19.
- 8) Brooks-Wilson, A., et al., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, 1999; 22(4): p. 336-45.
- 9) Leppert, M.F., et al., A DNA probe for the LDL receptor gene is tightly linked to hypercholesterolemia in a pedigree with early coronary disease. *Am J Hum Genet*; 1986. 39(3): p. 300-6.
- 10) Sing, C.F. and J. Davignon, Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet*; 1985. 37(2): p. 268-85.
- 11) Klerk, M., et al., MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*, 2002; 288(16): p. 2023-31.
- 12) Boekholdt, S.M., et al., Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation*, 2005; 111(3): p. 278-87.
- 13) Boekholdt, S.M., et al., Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation*, 2001;104(25): p.3063-8.
- 14) Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55.
- 15) Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-1457.
- 16) Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III2-7.
- 17) Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk of coronary heart disease. *Ann Int Med* 2004;141:137-147.
- 18) Sary, H.C., Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*, 1987; 64(2-3): p. 91-108.
- 19) Sniderman, A.D. and C.D. Furberg, Age as a modifiable risk factor for cardiovascular disease. *Lancet*, 2008;371(9623): p. 1547-9.
- 20) Jousilahti, P., et al., Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*, 1999;.99(9): p. 1165-72.
- 21) Kannel, W.B., et al., Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med*, 1976; 85(4): p. 447-52.
- 22) Wolf, P.A., et al., Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. *JAMA*, 1988; 259(7): p. 1025-9.
- 23) Micha?ek A. Results of ARMYDA-ACS trial show good outcome of 80 mg atorvastatin pretreatment in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention. *Kardiol Pol* 2007;65:851-2.
- 24) Haffner, S.M., et al., Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1998; 339(4): p. 229-34.

- 25) Lusis, A.J., R. Mar, and P. Pajukanta, Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004; 5: p. 189-218.
- 26) Yusuf, S., et al., Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation*, 2001;104(23): p. 2855-64.
- 27) Yusuf, S., et al., Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 2004; 364(9438): p. 937-52.
- 28) Pletcher MT, McClurg P, Batalov S, Su AI, Barnes SW, Lagler E, Korstanje R, Wang X, Nusskern D, Bogue MA, et al. Use of a dense single nucleotide polymorphism map for in silico mapping in the mouse. *PLoS Biol* 2004;2:e393.
- 29) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002;32:650-654.
- 30) Shiffman D, Ellis SG, Rowland CM, Malloy MJ, Luke MM, Iakoubova OA, Pullinger CR, Cassano J, Aouizerat BE, Fenwick RG, et al. Identification of four gene variants associated with myocardial infarction. *Am J Hum Genet* 2005;77:596-605.
- 31) Shiffman D, Rowland CM, Louie JZ, Luke MM, Bare LA, Bolonick JI, Young BA, Catanese JJ, Stiggins CF, Pullinger CR, et al. Gene variants of VAMP8 and HNRPUL1 are associated with early-onset myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1613-1618.
- 32) Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491-1493.
- 33) McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488-1491.
- 34) Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-678.
- 35) Chen, Y., et al., Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell Metab*, 2007;6(3): p. 164-79.
- 36) Helgadóttir, A., et al., A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*, 2007; 316(5830): p. 1491-3.
- 37) McPherson, R., et al., A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*, 2007; 316(5830): p. 1488-91.
- 38) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 2007; 447(7145): p. 661-78.
- 39) Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2009;7:e003. Epub 2009 Apr 3.
- 40) Jetten AM, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;69:205-47.
- 41) Lau P, Nixon SJ, Parton RG, Muscat GE. RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36828-40.
- 42) Jaradat M, Stapleton C, Tilley SL, Dixon D, Erikson CJ, McCaskill JG, Kang HS, Angers M, Liao G, Collins J, Grissom S, Jetten AM. Modulatory role for retinoid-related orphan receptor alpha in allergen-induced lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1299-1309.
- 43) Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES. Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 1996;379:736-739.
- 44) Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, Daniel H, Crepel F, Mariani J, Sotelo C, Becker-Andre M. Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3960-3965.
- 45) Jarvis CI, Staels B, Brugg B, Lemaigre-Dubreuil Y, Tedgui A, Mariani J. Age-related phenotypes in the staggerer mouse expand the RORalpha nuclear receptor's role beyond the cerebellum. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:1-5.
- 46) Trenkner E.; Hoffmann, M. K. Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation "staggerer". *J Neurosci*. 1986;6:1733-7.
- 47) Çoban N. (2012). Aterosklerozda Rol Alabilecek Yeni Bir

Aday Genin Fonksiyonel Analizi ve Bu Genin Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

48) Owen JS, Mulcahy JV. ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atheroscl Suppl.* 2002;3:13-22.

49) Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:321-30.

50) Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W ve arkadaşları. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22:347-51.

51) Angela Brooks-Wilson, Michel Marcil, Susanne M. Clee, Lin-Hua Zhang, Kirsten Roomp, Marjel van Dam ve arkadaşları. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics.* 1999;22:336 -345

52) Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest.* 2000;106:1205-7.

53) Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marcil M, Roomp K, Zwarts KY ve arkadaşları. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest.* 2000;106:1263-70.

54) van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, Orso E, Rothe G, et al. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:6298–6303.

55) Out R, Hoekstra M, Habets K, Meurs I, de Waard V, et al. Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:258–264.

56) Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, et al. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:630–637.

57) Lammers B, Zhao Y, Hoekstra M, Hildebrand RB, Ye D, Meurs I, Van Berkel TJ, Van Eck M. Augmented atherogenesis in LDL receptor deficient mice lacking both macrophage ABCA1 and ApoE. *PLoS One.* 2011;6(10):e26095.

58) Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1464–1469.

59) Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, Wang SC, Lechtken A,

Muscat GE. The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):18411-21. Epub 2008 Apr 25.

60) Pajukanta P. Do DNA sequence variants in ABCA1 contribute to HDL cholesterol levels in the general population? *J Clin Invest.* 2004;114:1244-7.

61) Sebastian S, Bulun SE. A Highly Complex Organization of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 2006; 86: 4600-4602.

62) Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:477-515.

63) Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1999 Apr 16;84(7):813-9.

64) Stamler J, Pick R, Katz LN. Prevention of coronary atherosclerosis by estrogen-androgen administration in the cholesterol-fed chick. *Circ Res.* 1953;1:94 –98.

65) Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Geiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1993;328: 1069–1075.

66) Rifichi VA, Khachadurian AK. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17- β estradiol. *Metabolism.* 1992;41:1110 –1114.

67) Fischer GM, Swain ML. Effect of sex hormone on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and noncastrated male rats. *Am J Physiol.* 1977;232:H617–H621.

68) Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H, Takagi Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res.* 1999 Jun 11;84(11):1285-91.

69) ukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G, Nathan L. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):4055-60.

70) Murakami H, Harada N, Sasano H. Aromatase in atherosclerotic lesions of human aorta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Dec;79(1-5):67-74.

71) Odawara H, Iwasaki T, Horiguchi J, Rokutanda N, Hirooka K, Miyazaki W, Koibuchi Y, Shimokawa N, Iino Y, Takeyoshi

- I, Koibuchi N. Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha in breast cancer cells: identification of a novel ROR response element. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26;284(26):17711-9.
- 72) Knowler KC, To SQ, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Simpson ER, Clyne CD. Melatonin suppresses aromatase expression and activity in breast cancer associated fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(2):765-71. Epub 2012 Jan 12.
- 73) Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6965–6970.
- 74) Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. Transcriptional regulation of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997 Apr;61(3-6):203-10.
- 75) Shimodaira M, Nakayama T, Sato N, Saito K, Morita A, Sato I, Takahashi T, Soma M, Izumi Y. Association study of aromatase gene (CYP19A1) in essential hypertension. *Int J Med Sci*. 2008 Feb 7;5(1):29-35.
- 76) Ramirez-Lorca R, Grilo A, Martinez-Larrad MT, Manzano L, Serrano-Hernando FJ, Moron FJ, Perez-Gonzalez V, Gonzalez-Sanchez JL, Fresneda J, Fernandez-Parrilla R, Moñux G, Molero E, Sanchez E, Martinez-Calatrava MJ, Saban-Ruiz J, Ruiz A, Saez ME, Serrano-Rios M. Sex and body mass index specific regulation of blood pressure by CYP19A1 gene variants. *Hypertension*. 2007 Nov;50(5):884-90.
- 77) Ziv-Gal A, Gallicchio L, Miller SR, Zacur HA, Flaws JA. A genetic polymorphism in the CYP19A1 gene and the risk of hypertension among midlife women. *Maturitas*. 2012 Jan;71(1):70-5. Epub 2011 Nov 21.
- 78) Aeberli D, Leech M, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Aug;45(8):937-43. Epub 2006 May 16.
- 79) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006;86:515–581
- 80) Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1997–2008.
- 81) Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999 Jan 18;189(2):341-6.
- 82) Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, Fu H et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2004 Jun 29;109(25):3149-53. Epub 2004 Jun 14.
- 83) Lin SG, Yu XY, Chen YX, Huang XR, Metz C, Bucala R, Lau CP, Lan HY. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res* 2000;87:1202–1208.
- 84) Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *Exp Med* 1994;179:1895–1902.
- 85) Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, Kleemann R, Bernhagen J, Ihling C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1561–1566.
- 86) Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, Zernecke A, Bucala R, Leng L, et al. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis* 2006;184:28–38.
- 87) Zhong XB, Leng L, Beitin A, Chen R, McDonald C, Hsiao B et al. Simultaneous detection of microsatellite repeats and SNPs in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene by thin-film biosensor chips and application to rural field studies. *Nucleic Acids Res*. 2005 Aug 2;33(13):e121
- 88) Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M. Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1;169(9):1014-8.
- 89) De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, Lunt M, Thomson W, Ravelli A, Donn R, Martini A; British Paediatric Rheumatology Study Group. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1398-407.
- 90) Herder C, Illig T, Baumert J, Muller M, Klopp N, Khuseynova N, Meisinger C, Martin S, Thorand B, Koenig W (2008) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. *Atherosclerosis*.