

Bölüm 3

TEMEL MOLEKÜLER KARDİYOLOJİ

Ayşegül Başak AKADAM TEKER¹

GİRİŞ

Watson ve Crick tarafından 1953 yılında DNA'nın çift sarmal yapısının tanımlandığı o günden bugüne devrim niteliğinde pek çok buluş gerçekleşmiştir. Özellikle 21.yüzyılın başlarında insan genomunda yer alan bütün bilginin çözümlenebilmesi için başlatılan İnsan Genom Projesi tıbbi genetik alanında bir devrim yaratmıştır. İnsan genomunda yer alan tüm genlerin dizilenmiş olması, bu genlerin hastalıklarla olan ilişkisinin anlaşılmasında bir rehber niteliğindedir. Ayrıca moleküler genetikteki ilerlemeler sayesinde de hastalıklarla ilişkili pek çok genetik potansiyel risk faktörü tanımlanabilmektedir. Elde etmiş olduğumuz bu bilgiler ve hız kesmeden devam eden çalışmalar sayesinde artık gelecekte hastalık değil hasta kavramı ile karşı karşıya kalacağımız duruma kendimizi şimdiden hazırlamalıyız. Sahip olduğumuz bu bilgi akışının hasta ve hasta yakınları tarafından da faydalı ve hızlı bir şekilde kullanılabilmesi için tüm hekim ve sağlık profesyonellerinin de genetiğin temel dinamikleri hakkında bilgi sahibi olması hastaya uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesi açısından zorunluluk arz etmektedir.

Moleküler kardiyoloji, kardiyovasküler hastalığın mekanik incelemesi, teşhisi, önlenmesi ve tedavisi için moleküler biyolojik teknikleri uygulamayı amaçlayan yeni bir disiplin olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu alandaki bilgilerimiz henüz çok az olsa da kalp hastalıklarına katılan yeni aday genlerin tanımlanması hastalığın önlenmesi, teşhisi

ve müdahale için moleküler bir temel sağlayacaktır. Bu durum yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından oldukça umut vaat edicidir. İki nesil önceki klinisyenler tarafından tedavi edilemez olarak tanımlanan hastalıklar moleküler genetik tekniklerindeki gelişmeler ve uygulama alanlarındaki genişleme sayesinde bugünün klinisyenleri tarafından artık tedavi edilmeye daha yakın durumdadır. Bu bölümde, kardiyovasküler bir araştırmacı için faydalı olan temel moleküler biyoloji teknikleri ve uygulamalarına kısa bir genel bakış sunuyoruz.

Moleküler Kardiyoloji alanında kullanılan temel teknikler

Aslında pek çok kardiyak hastalık için genetik bir temel tespit edilmiştir. Ancak otozomal dominant kalıtım paternine sahip olan hipertrofik kardiyomiyopati, genetik bir temeli olduğu tespit edilen ilk primer kardiyomiyopati olması açısından moleküler kardiyolojide bir mihenk taşı olmuştur. Yapılan ilk çalışmalarda 14.kromozomda yer alan β -miyosin ağır zincir genindeki mutasyonlar hipertrofik kardiyomiyopatinin nedeni olarak gösterilmiştir (1). O günden bugüne 10 yılda, sadece 10 gende 200'den fazla mutasyon daha bu hastalık ile ilişkilendirilmiştir (2-4). Sonrasında devam eden çalışmalarda uzun QT sendromu'nun otozomal dominant (Romano-Ward sendromu) ve resesif (Jervell ve Lange-Nielsen sendromu) formları ve Brugada sendromu gibi aritmojenik bozukluklar genetik bir temele dayandırılmıştır (5). Ayrıca, li-

¹ Doktor Öğretim Üyesi, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, aba2904@hotmail.com

bir yaklaşım sağlamıştır (67,68). Örneğin genetik manipülasyonlarla oluşturulan fonksiyon kazancı ve fonksiyon kaybı fareleri, lipid metabolizması, kardiyak ve vasküler duvara özgü genlerin fonksiyonu hakkında geniş bir bilgi edinilmesini sağlamıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak; moleküler genetikte kullanılan teknikler hızla gelişme göstermektedir ve her geçen gün kardiyoloji alanında daha geniş uygulama alanı bulmaktadır. Hiç şüphesiz ki yakın gelecekte klinik pratikte moleküler tekniklerin kullanımı karmaşık hasta profillerinin çözülmesi açısından bir altın standart haline gelecektir.

Anahtar Kelimeler: PCR, Sanger dizileme, Moleküler kardiyoloji

KAYNAKÇA

- Jarcho JA, McKenna WJ, Pare JAP, et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 1989;321:1372.
- Li D, Tapscott T, Gonzalez O, et al. Desmin mutations responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999;100:461-464.
- Seidman CE, Seidman JG. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;104:557-567.
- Tyska MJ, Hayes E, Giewat M, et al. Single molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the Mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*.2000;86:737-744.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;80:805-811.
- Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*.2005;57:733-53. Doi:10.1016/j.addr.2004.12.007.
- Chu Y, Weintraub N.L., Heista D.D. Gene Therapy and Cardiovascular Diseases (In Runge M.S., Patterson C.(Eds.). *Principles of Molecular Cardiology*.(1stpp.57-69). Totowa:Humana Press.
- Morishita R. Recent Progress in Gene Therapy for Cardiovascular Disease *Circ J* 2002; 66: 1077 -1086.
- Seppo Ylä-Herttuala,1,2 and Andrew H. Baker. Cardiovascular Gene Therapy:Past, Present, and Future. *Molecular Therapy*. 2017;5:1095-1106.
- Morishita R, Aoki M, Ogihara T. Does gene therapy become pharmacotherapy? *Exp Physiol*. 2005;90(3):307-313.
- Şanlıoğlu, S.(2016).Gen Tedavisi.Munis Dünder(Ed.) *Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları içinde* (s. 497 - 522). Kayseri: Mgrup matbaacılık.
- Ferrara K, Pollard R, Borden M. Ultrasound microbubble contrast agents: Fundamentals and application to gene and drug delivery. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:415-447.
- Fujii H, Sun Z, Li S-H et al. Ultrasound-targeted gene delivery induces angiogenesis after a myocardial infarction in mice. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009;2:869-879.
- Fujii H, Li S-H, Wu J et al. Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair.*Eur Heart J* 2011;32:2075-2084.
- Gill S-L, O'Neill H, McCoy RJ et al.Enhanced delivery of microRNA mimics to cardiomyocytes using ultrasound responsive microbubbles reverses hypertrophy in an in-vitro model. *Technol Health Care Off J Eur Soc Eng Med* 2014;22:37-51.
- Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL et al. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood*, 2001; 97:107-113. Doi: 10.1182/blood.V97.1.107.
- D Lechardeur , K-J Sohn , M Haardt et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: A potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*, 1999;6:482-497.
- Turner I, Belema-Bedada F, Martindale J et al. Molecular Cardiology in Translation: Gene, Cell and Chemical-Based Experimental Therapeutics for the Failing Heart]. of *Cardiovasc. Trans. Res*. 2008;1:317-327. DOI 10.1007/s12265-008-9065-6.
- Rincon MY, VandenDriessche T, Chuah MK.Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular Research* 2015;108: 4-20.doi:10.1093/cvr/cvv205.
- Sun Z. Overview of recent advances in molecular cardiology. *Can J Cardiol* 2006;22(3):235-240.
- Julie A. Wolfram J. Donahue K. Gene Therapy to Treat Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000119 doi: 10.1161/JAHA.113.000119.
- Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation* 1999;99:201-205.
- Sakoda T, Kasahara N, Hamamori Y et al. A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1993;31:2037-2047.
- Ylä-Herttuala, S. , Alitalo, K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*. 2003;9: 694-701.
- Ylä-Herttuala S., Baker A. H.,Cardiovascular Gene Therapy:Past, Present, and Future. *Molecular Therapy* Vol. 25 No 5 May 2017.1095-1106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.027>.
- Jesse K. Biehl, B.Set al. Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs*. 2009; 24(2): 98-105.doi: 10.1097/JCN.0b013e318197a6a5.
- Dowell, J. D., Rubart, M., Pasumarthi, K. B. Et al. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc.Res*.2003;58;36-350.
- Brody Wehman, Osama T. Siddiqui, Rachana Mishra et al. Stem Cell Therapy For Congenital Heart Disease

- se: Toward Translation Cardiol Young. 2015;25; 58–66. doi: 10.1017/S1047951115000840.
29. Stamm C, Westphal B, Kleiner HD. Et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361:45-46
 30. Assmus B., Schächinger V., Teupe C Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-3017. DOI: 10.1161/01.CIR.0000043246.74879.CD)
 31. Wehman B., Siddiqui O.T. , Mishra R. et al. Stem Cell Therapy For Congenital Heart Disease: Toward Translation Cardiol Young. 2015; 25; 58–66. doi: 10.1017/S1047951115000840.
 32. Karantalis V, Balkan W, Schulman IH. Et al. JM. Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:256–270.
 33. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. 2011;109:923–940.
 34. Telukuntla KS, Suncion VY, Schulman IH et al. The advancing field of cell-based therapy: Insights and lessons from clinical trials. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000338.
 35. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ. et al. Effect of transcatheter delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: The focus-cctn trial. *JAMA*. 2012;307:1717–1726.
 36. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J. Et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The boost randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141–148.
 37. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A. et al. Investigators R-A. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210–1221.
 38. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A. et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: Final 1-year results of the repair-ami trial. *European heart journal*. 2006;27:2775–2783.
 39. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ. et al. Cardiovascular Cell Therapy Research N. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: The time randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2380–2389.
 40. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG. et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: The latetime randomized trial. *JAMA*. 2011;306:2110–2119.
 41. Sürder D, Manka R, Lo Cicero V. et al. Intracoronary injection of bone marrow derived mononuclear cells, early or late after acute myocardial infarction: Effects on global left ventricular function four months results of the swiss-ami trial. *Circulation*. 2013;127:1968–1979.
 42. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine* 2001;7:430-436.
 43. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS USA* 2001;98:10344-10349.
 44. Stamm C, Westphal B, Kleiner HD. et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003, 361:45-46.
 45. Can Yerebakan, Murat Uğurlucan, Alexander Kaminski ve ark. Ototok kök hücre tedavisi ve cerrahi miyokardiyal revaskülarizasyon - Rostock Üniversitesi tecrübesi. *Anadolu Kardiyo Derg* 2009; 9: 457-464.
 46. Durmaz AA , Karaca E , Demkow U et al. Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond. *Bio-Med Research International*. 2015; 461524. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/461524>.
 47. Stephenson F. H. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edit). Oxford: Academic Press.
 48. Hoy M A.(2013) *Insect Molecular Genetics* (third edit). Oxford: Academic Press.
 49. F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec; 74(12): 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
 50. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*. 2010; 32(6):524-36.
 51. Mullikin JC, McMurry AA. DNA sequencing. Sequencing the genome, fast. *Science*. 1999; 283(5409):1867-9.
 52. Karger E., Harris J.M., Gesteland R.F. Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:4955–4962. doi: 10.1093/nar/19.18.4955.
 53. Yıkıcıer M.C., Ekmekçi C.G., Yararbaş K., Sayar C. (2016). Tıbbi genetikte moleküler tanı yöntemleri. *Munis Dündar (Ed.) Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları içinde* (s. 431-450). Kayseri: Mgrup matbaacılık.
 54. Kamps R , Brandão R. D. , Van den Bosch B. J et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 308. doi: 10.3390/ijms18020308.
 55. Goodwin S. , McPherson J.D. , McCombie. Coming of age: ten years of next-generation sequencing Technologies. *W. R. Nature Reviews Genetics* 2016;17:333-351. DOI:10.1038/nrg.2016.49.
 56. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing *Nature Biotechnology*. 2008;26:1135–1145.
 57. Ricardo. SP, Németh A.H. Next-generation sequencing in childhood disorders *Arch Dis Child* 2014;99:284–291. doi:10.1136/archdischild-2012-302881.
 58. Wilson K. D. , Shen P , Fung E. et al. A Rapid, High-Quality, Cost-Effective, Comprehensive and Expandable Targeted Next-Generation Sequencing Assay for Inherited Heart Diseases *Circ Res*. 2015 ; 117(7): 603–611. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306723.
 59. Fox CS, Hall JL, Arnett DK, et al. Future translational applications from the contemporary genomics era: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131:1715–1736.
 60. Norton N, Li D, Hershtal RE. Next-generation sequencing to identify genetic causes of cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*. 2012;27:214–220.

61. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet.* 2013;14:295–300.
62. Teekakirikul P, Kelly MA, Rehm HL et al. Inherited cardiomyopathies: molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era. *J Mol Diagn.* 2013;15:158–170.
63. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation.* 2011;123:1021–1037.
64. Churko JM, Mantalas GL, Snyder MP. Et al. Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2013;112:1613–1623.
65. Bağış H. Transgenik Rodent Üretimi *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 1 | *Journal of Clinical and Analytical* 2012;80-85.
66. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Nat Acad Sci. USA* 77, 7380-7384.
67. Takahara S, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S. New Noonan syndrome model mice with RIT1 mutation exhibit cardiac hypertrophy and susceptibility to β -adrenergic stimulation-induced cardiac fibrosis. *EBioMedicine.* 2019;42:43-53. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.014.
68. Champeil S.M., Rosen J.M., Hennighausen L.G. et al. Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:8685–8697.