

Hipertrofik Kardiyomiyopatiye Neden Olan β -Miyozin Ağır Zincir Genindeki Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln Mutasyonlarının Saptanması

Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM*, Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU*, Uz. Dr. Abdi SAĞCAN**, Prof. Dr. İstem NALBANTGİL***, Filiz ÖZERKAN***, Murat ÖZDAMAR****, Mert ÖZBAKKALOĞLU*****, Meral KOZAN*****

*Dokuz Eylül Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, **Atakalp Kalp Hastalıkları Hastanesi,

Ege Ü. Tıp Fak. Kardiyoloji ABD, *Dokuz Eylül Ü. Tıp Fak. Kardiyoloji ABD,

*****SSK Tepecik Hast. Kardiyoloji Bölümü, *****SSK Tepecik Çocuk Hastanesi, İzmir

ÖZET

Hipertrofik Kardiyomiyopati (HKM), genellikle ailesel olan primer bir kalp hastalığıdır. Genel popülasyondaki prevalansı %0.2'dir. HKM, hipertansiyon veya kapak hastalığı gibi hipertrofi yapabilecek başka nedenlerin bulunmadığı, genellikle sol ventrikülde ve interventriküler septumda yerleşen asimetric bir hipertrofiyle karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. β -miyozin ağır zinciri, troponin T, troponin I, α -tropomiyozin, esansiyel ve regülatör hafif zincirler, kardiyak miyozin bağlayıcı protein C, aktin ve titin gibi sarkomerik proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar HKM'ye neden olurlar. Hastalık kardiyak yapıda ve klinik bulgularında değişikliklerle beliren çok çeşitli klinik görünümlere sahiptir. En ağır bulgusu, ani kalp ölümüdür. Bu çalışmanın amacı, kötü prognoz ve yüksek ani kalp ölümü insidansı gösteren β -miyozin ağır zincir genindeki Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarını saptamaktır. Çalışmaya klinik ve ekokardiyografik verileriyle HKM tanısı konulmuş 18 olgu alındı (9 erkek, 9 kadın, ort. yaş:39). Hastalardan alınan kanlardan fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol çöktürme yöntemiyle DNA'lar elde edildi. Mutasyonların belirlenmesinde, PCR ve kısıtlayıcı enzim kesimi + mini horizontal agaroz elektroforez teknikleri kullandı. Çalışmada uluslararası literatürde en sık gözlenen mutasyonlar öncelikli olarak tarandı ve dünyada kabul edilen moleküler genetik yöntemler uygulandı. İncelenen 18 hastada Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarının olmadığı saptandı. Daha fazla sayıda hasta ve daha geniş imkanlarla HKM'den sorumlu olan mutasyonların belirlenerek bir ülke veri tabanı oluşturulmasıyla, prelinik tanı ve ani kalp ölümü için risk tayini yapılabileceği sonucuna ulaşıldı. Türk Kardiyol Dern Arş 2002; 30: 30-35

Anahtar kelimeler: Hipertrofik kardiyomiyopati, β -miyozin ağır zinciri, mutasyon

Alındığı tarih: 9 Temmuz 2001, revizyon 20 Kasım 2001
Yazışma adresi: Prof. Dr. Orhan Terzioğlu, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, 35340 Inciraltı-İzmir
Tlf.: (0232) 259 59 59/4602. Faks: (0232) 259 05 41
E-posta: terzioglu@hotmail.com

Hipertrofik kardiyomiyopati (HKM), en sık görülen kalıtsal kardiyovasküler hastalıklardan biridir. Klinik, morfolojik ve genetik açıdan heterojenite gösteren HKM'nin en belirgin özelliği sol ventrikül hipertrofisidir. Hipertrofi, genellikle asimetric ve interventriküler septum (İVS) yerleşimlidir. Ancak, kesin tanı için sol ventrikül hipertrofisine yol açabilecek başka bir patoloji (hipertansiyon, kapak hastalığı, koroner kalp hastalığı, aort koarktasyonu, konjenital kalp hastalığı) bulunmamalıdır (1).

HKM, %55 ailesel (Familyal Hipertrofik Kardiyomiyopati-FHK) formda olup, otozomal dominant kalıtım gösterir. Bunun dışındaki olgular sporadik olarak belirlenmektedir (2). Hastalığın klinik görünümü, asemptomatik durumdan, şiddetli kalp yetersizliği, hatta ani kalp ölümüne kadar uzanan geniş bir spektrum çizer (3). Özellikle sporcularda olmak üzere 35 yaşın altındaki gençlerde görülen ani kalp ölümünün en sık nedenidir (4). HKM'deki başlıca patolojik bulgu, sarkomer yapısında bozulma ve miyozit hipertrofisidir (5-7).

Hastalığın farklı toplumlarda ortalama görülme sıklığı %0.2'dir (4,8). Moleküler genetik tekniklerle HKM'ye yol açtığı saptanan 9 gen, β -miyozin ağır zinciri- $[\beta$ -MAZ], troponin T, troponin I, α -tropomiyozin, regülatör ve esansiyel hafif zincirler, miyozin bağlayan protein C, aktin ve titin kalp kasının sarkomerinde bulunan farklı komponentleri kodlar (9). Bu genlerden biri olan β -MAZ genindeki mutasyonlara bağlı değişiklikler, FHK'nin %35'inden sorumludur (10).

β -MAZ genindeki değişik mutasyonlara sahip bireylerde hastalığın klinik görünümü ve şiddeti farklı ol-

maktadır. Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarına sahip bireylerde kötü prognoz, yüksek penetrans, yüksek ani kalp ölümü insidansı ve şiddetli sol ventrikül hipertrofisi gözlenir. Glu930Lys ile Arg249Gln mutasyonları ise ani kalp ölümü insidansı yönünden orta derecede bir risk taşırken, Leu908Val, Gly256Glu, Val606Met, Phe503Cys ve Arg723Cys mutasyonları benign bir prognoza sahiptirler (2,11-13).

Çalışmamızda, hastalığın moleküler temelini belirlemek üzere 18 HKM hastasında, β -MAZ genindeki Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonları incelendi.

MATERYEL ve METOD

Çalışmaya alınan hastalar anamnez, fizik muayene, EKG, iki boyutlu ve Doppler ekokardiyografik yönden incelendi. HKM tanısı; iki boyutlu ve Doppler ekokardiyografide sol ventrikül duvar kalınlığının 13 mm veya daha büyük bulunması, hipertrofi yapabilecek başka bir nedenin bulunmaması, gösterdikleri semptomlar (özellikle ailede ani ölümlerin olması) ve EKG anomalileri kriterlerine göre yapıldı (14). Çalışmanın kapsamı açıklanıp onayları alınan hastaların venöz kanları K₂EDTA'lı tüplere toplandı. Periferik kan lökositlerinden, Proteinaz K-fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak DNA elde edildi (15). β -MAZ geninde bulunan ve literatüre göre en sık gözlenen Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarının yer aldığı ekzon 13, 14 ve ekzon 19'un PCR ile amplifikasyonu için aşağıdaki primerler kullanıldı (16).

Ekzon 13 (Arg403Gln): (Fragman büyüklüğü: 267 baz çifti)

Primer Forward: 5' TTA CAG GCA TGA ACC ACA CAC C 3'

Primer Reverse: 5' GTG AAC TTG AAA ACT CTC ATC CC 3'

Ekzon 14 (Arg453Cys): (Fragman büyüklüğü : 287 baz çifti)

Primer Forward: 5' CAC TCT TCC CAA CCC TG 3'

Primer Reverse : 5' GGT CCA CAG CTG GCT CTA AG 3'

Ekzon 19 (Arg719Trp,Arg719Gln): (Fragman büyüklüğü: 200 baz çifti)

Primer Forward : 5' CTC ACA GAC TCC TCC TAC TTC CTT C 3'

Primer Reverse : 5' GCC TGG CTC CCC CTG TTC TAT GAG C 3'

PCR reaksiyonunda, toplam hacim 25 μ l olacak şekilde; 10mM Tris HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.2 μ M herbir primerden, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 1 μ l kalıp DNA kullanıldı. PCR sıcaklık profili; ilk denatürasyon 95°C'de 5 dk., sonra 30 çevrim olacak şekilde, 95°C'de 45 sn denatürasyon, 65°C'de 45 sn annealing ve 72°C'de 45 sn uzama'dan oluşmaktaydı.

PCR ürünü saptanmış örneklerde; Arg403Gln mutasyonu için Dde I (17), Arg453Cys mutasyonu için Nla III (18), Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonları için de Msp I (3) kısıtlayıcı enzimleri (RE) kullanılarak, kısıtlayıcı enzim kesimi parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) yapıldı. RE kesim yöntemi uygulanan PCR ürünleri, 0.5 X TBE tampon içerisinde 0.5 μ g/ml etidium bromid içeren %2'lik agarozda 10 V/cm olacak şekilde marker DNA ile birlikte 30 dk. yürütülmenin ardından Eagle Eye II cihazında değerlendirildi.

BULGULAR

İki hastanın aile öyküsünde ani kalp ölümü kuşkuğu mevcuttu. Hastalarda en sık gözlenen semptomlar, çarpıntı ve efor dispnesiydi. Sadece 1 hastada atriyal fibrilasyon mevcuttu. Hastaların tamamında, ekokardiyografik olarak sol ventrikül hipertrofisi mevcutken, ancak %61'inde anormal EKG bulguları saptandı. Ortalama İVS kalınlığı 21.6 mm (16 mm-25 mm) olarak bulundu. Hastaların %40'ında sistolik öne hareket (SAM), %35'de LV çıkış yolu obstrüksiyonu gözlemlendi. Tüm veriler Tablo 1'de görülmektedir.

PCR reaksiyonları sonrasında Arg403Gln mutasyonunu içine alan β -MHC'nin 13. ekzonunda 267 baz çiftlik, Arg453Cys mutasyonunu içine alan 14.ekzonunda 287 baz çiftlik, Arg719Trp ve Arg719Gln

Tablo 1. Hastaların klinik özellikleri

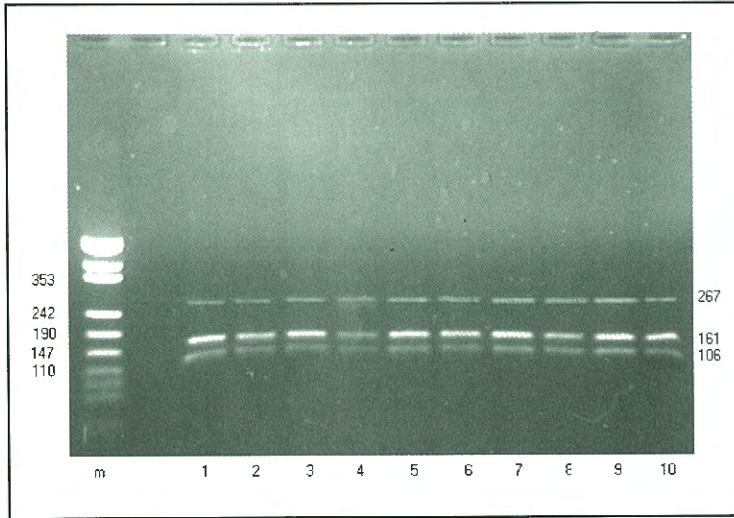
Özellikler	Sayı (Toplam: 18)
Erkek / Kadın	9 / 9
Yaş (ort)	39
Semptomlar	15 (%83)
Dispne	4 (%22)
Göğüs Ağrısı	3 (%16)
Çarpıntı	5 (%28)
Senkop	1 (%5)
Siyanoz	1 (%5)
Semptomu Olmayan	4 (%22)
Atriyal Fibrilasyon	1 (%5)
Oskültasyon Bulguları (+)	9 (%50)
Anormal EKG	11 (%61)
Aile Öyküsü	2 (%11)
SAM (+)	7 (%40)
LV Obstrüksiyonu	6 (%35)
İVS kalınlığı (Ort./mm)	21.6 mm

SAM: Sistolik öne hareket. LV: Sol ventrikül, İVS: İnterventriküller septum.

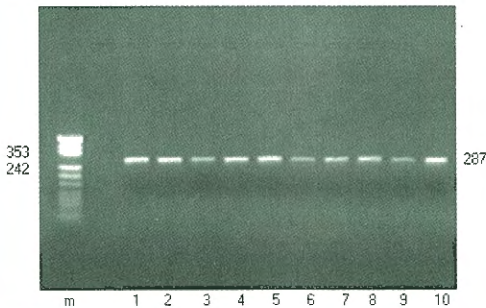
mutasyonlarını içine alan 200 baz çiftlik amplifikasyon ürünleri elde edildi.

KISITLAYICI ENZİM KESİMİ PARÇA UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ

Arg403Gln mutasyonu için incelenen 13. ekzonun 267 baz çiftlik amplifikasyon ürünlerini Dde I ile muameleye tabi tuttuğumuzda, vakaların hepsinde 161 ve 106 baz çifti büyüklüğünde iki bant elde edildi (Şekil 1). Bu bölgede mutasyon varlığında $G^2 \rightarrow A$ baz değişimi sonucu CGG baz dizisinin CAG baz dizisine dönüşüp yeni bir Dde I kesim bölgesi oluşması nedeniyle, Dde I kesimi uyguladığımızda 129, 106 ve 32 baz çifti büyüklüğünde 3 bant meydana geldiğinden, incelenen vakalarda Arg403Gln mutasyonunun olmadığı sonucuna varıldı.



Şekil 1. Ekzon 13'ün 267 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürününün Dde I enzimi ile kesimi sonucu. (m:marker, lane 1: normal birey standart DNA'sı, lane 2-10: normal olduğu saptanan bireyler. Dde I kesimi normal bireyde: 161 ve 106, mutasyon taşıyanda 129,106 ve 32 bantlarını vermektedir.)



Şekil 2. Ekzon 14'ün 287 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürününün Nla III enzimi ile kesimi sonucu. (m:marker, lane 1: normal birey standart DNA'sı, lane 2-10: normal olduğu saptanan bireyler.Nla III kesimi ile normal bireyde kesim olmamakta, mutasyon taşıyanda 153 ve 134 bantlarını vermektedir.)

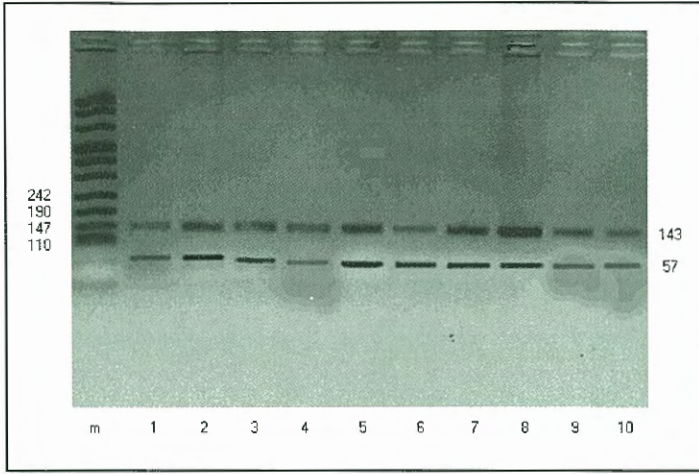
Arg453Cys mutasyonu için incelenen 14. ekzonun 287 baz çifti büyüklüğündeki amplifikasyon ürünleri, Nla III ile incelendiğinde hiçbir kesim ürünü saptanmadığı ve 287 baz çifti büyüklüğündeki tek bir bandın kesilmediği gözlemlendi (Şekil 2). Bu bölgede mutasyon varlığında, $C^1 \rightarrow T$ baz değişimi sonucu CGC baz dizisinin TGC baz dizisine dönüşüp yeni bir Nla III kesim bölgesi oluşması nedeniyle bu enzimle yapılan incelemede 153 ve 134 baz çifti büyüklüğünde 2 bant meydana geleceğinden, vakaların hiçbirinde Arg435Cys mutasyonu olmadığı bulundu.

Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonları için incelenen 19. ekzonun 200 baz çiftlik amplifikasyon ürünlerini Msp I ile muameleye tabi tuttuğumuzda vakaların hepsinde 143 ve 57 baz çifti büyüklüğünde 2 bant elde edildi (Şekil 3). Bu bölgede mutasyon varlığında; Arg719Trp mutasyonu için, $C^1 \rightarrow T$ baz değişimi sonucu CGG baz dizisinin TGG baz dizisine; Arg719Gln mutasyonu için ise, $G^2 \rightarrow A$ baz değişimi sonucu CGG baz dizisinin CAG baz dizisine dönüşüp var olan Msp I kesim bölgesinin kaybolması nedeniyle, Msp I kesimi uygulandığında kesim olmaksızın 200 baz çifti büyüklüğündeki tek bant elde edilecektir. Çalışılan hastaların hepsinde de 2 bant gözlemlendiğinden, hiçbir vakada mutasyon olmadığı saptandı. Mutasyonun bulunması halinde, DNA dizi analizi yapılarak hangi amino asit değişimine yol açtığı belirlenecekti. Mutasyon olmaması nedeniyle DNA dizi analizi yapılmamıştır.

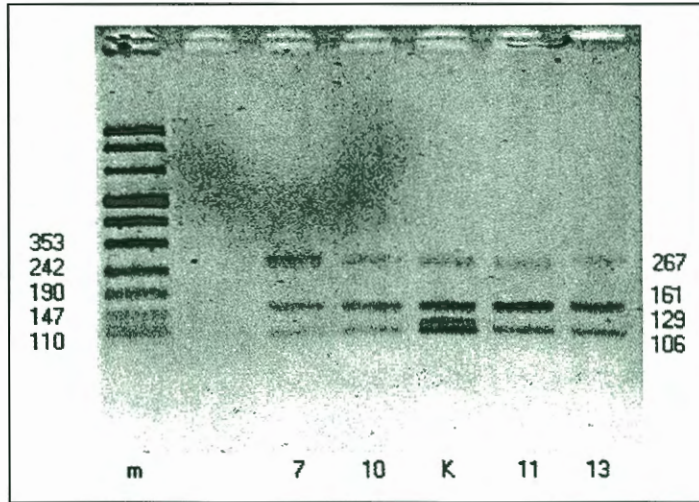
İncelenen hastalar ile Dr. K. Schwartz ve Dr. R.J. Trent'den sağlanan mutasyon taşıyan örnekleri karşılaştırarak yaptığımız kontrol deneylerinde, kullanılan primer ve kısıtlayıcı enzimlerin çalıştığı kanıtlanmış oldu (Şekil 4, 5, 6).

TARTIŞMA

HKM tanısında en hassas ve spesifik klinik tanı metodu ekokardiyografidir. Ekokardiyografik olarak tanı, hipertrofi yapabilecek başka bir nedenin olmadığı bir durumda kardiyak hipertrofinin saptanmasıyla konur. Ancak hipertrofi genellikle puberteye kadar



Şekil 3. Ekzon 19'un 200 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürününün Msp I enzimi ile kesimi sonucu. (m:marker, lane 1: normal birey standart DNA'sı, lane 2-10: normal olduğu saptanan bireyler. Msp I kesimi ile normal bireyde 143 ve 57 bantları oluşmakta, mutasyon taşıyanda ise kesim bölgesi kaybolduğundan kesim olmamaktadır.)



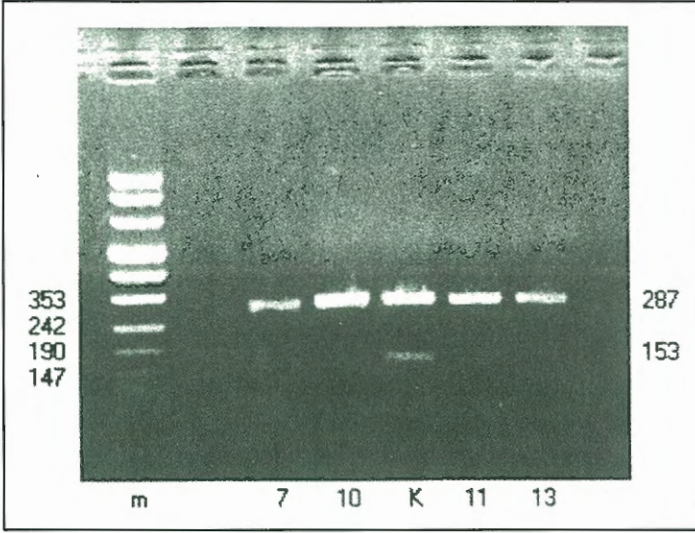
Şekil 4. Arg403Gln mutasyonu (ekzon 13) için kontrol deneyi. (m:marker; lane 7,10,11 ve 13: normal olduğu saptanan bireyler; K: mutasyon taşıyan standart heterozigot birey. Burada normal bireyde olan 161bp büyüklüğündeki bantın yıkım ürünü olan 129 ve 32 bantları oluşmakta ancak 32 görülmektedir, heterozigot olması dolayısıyla diğer kromozomdaki 161 de görülmektedir.)

meydana gelmez. Penetransın düşük olduğu durumlarda hipertrofinin gözlenmesi, dolayısıyla tanı konulması orta yaşlara kadar mümkün olmaz. Genetik düzeyde mutasyonun saptanması, hastalığın tanısını kesinleştirir. Düşük penetranslı mutasyon taşıyan ailelerde, birçok birey genotipik olarak etkilenmesine rağmen ekokardiyografide saptanabilen bir hastalık göstermeyeceklerdir (19). HKM'den sorumlu olan mutasyonların belirlenmesi asemptomatik hastalardaki mutasyonları saptamak için rutin tarama yapmaya ve prelinik tanıya imkan sağlayacaktır. HKM

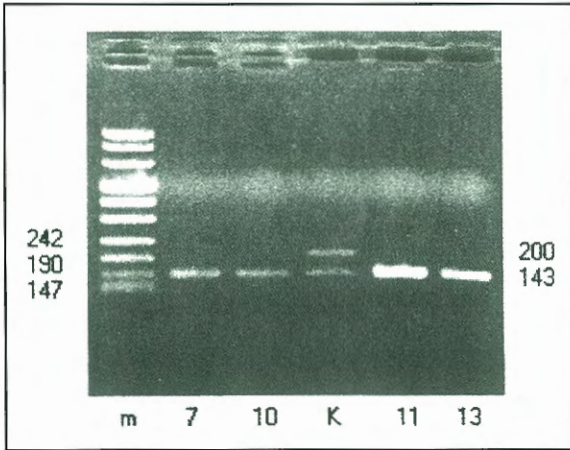
hastalarında ani kalp ölümü için bir genetik marker'ın belirlenmesinin önemi büyüktür. HKM hastalarında gözlenen klinik bulguların bir çoğu, ani kalp ölümü gibi ciddi komplikasyonların tanısında yardımcı olmaz. Ani kalp ölümü riski; sol ventrikül hipertrofisi şiddeti ve dağılımından bağımsızdır. Genetik bulgularla, HKM'deki farklı mutasyonların bu riskle korele olduğu ve klinik belirtiler ortaya çıkmadan hastalık beklentisi belirlenir (20).

Marian ve arkadaşlarının tesbit ettiği Arg403Gln mutasyonu taşıyan iki ailede 20 hasta bireyden 11 tanesi bu mutasyona sahip olup; 9 tanesinde ani kalp ölümü gözlenmiştir. Aynı çalışmada, ani kalp ölümü ortalama yaşı 33 olarak belirlenmiştir (21). Watkins ve arkadaşları da, Arg403Gln mutasyonlu iki ailede, etkilenmiş 44 kişiden 21'inde mutasyonu pozitif buldular. Bunların 9'u ortalama 33 ± 15 yaşında ani kalp ölümü nedeniyle yaşamlarını yitirmiştir (22). Ani kalp ölümünün sık rastlandığı diğer β -MHC mutasyonu da Arg719Gln mutasyonudur. Altmış bir kişilik 4 ailede yapılan bir çalışmada, bu mutasyon yüksek ani kalp ölümü insidansı ile ilişkili bulunmuştur. Olguların 35 tanesi bu mutasyonu taşıyorken, bunların 22 tanesi ortalama 38 yaşında ani kalp ölümü nedeniyle yaşamlarını yitirmişlerdir (12). Başka bir malign mutasyon olan Arg453Cys mutasyonu 13 etkilenmiş bireye sahip bir ailenin 9 ferinde gözlenmiştir. Bunların da 6 tanesi ortalama 30 ± 12 yaşında ani kalp ölümü nedeniyle kaybedilmişlerdir (22).

Biz bu çalışmada HKM hastalarında, β -MHC genindeki 4 malign mutasyonu DNA teknolojisi kullanarak araştırmayı ve sonuçta da, ülkemizde sadece Arg403Gln mutasyonunun (23) çalışıldığı göz önüne alınarak, bu mutasyonların dağılımı hakkında bilimsel veri elde edilmesi ve klinik açıdan normal olarak görünen ancak ani ölüm riski taşıyan bireylere korunma olanağı sağlamayı amaçladık. İncelediğimiz hastalarda, β -MAZ geninde araştırılan 4 malign mutasyonun bulunmadığını saptadık. HKM'de bulunan genetik heterojenite ve bu heterojenitenin hastalık genlerindeki çeşitlilikten de öte, sadece o ai-



Şekil 5. Arg453Cys mutasyonu (ekzon 14) için kontrol deneyi. (m:marker; lane 7,10,11 ve 13: normal olduğu saptanan bireyler; K: mutasyon taşıyan standart heterozigot birey, burada mutasyon varlığında oluşan 153 ve 134 bantları agarozda üst üste gelmekte ve tek bant gibi görünmektedir, heterozigot olduğundan diğer kromozomdaki normal 287'lik bantta izlenmektedir.)



Şekil 6. Arg719Gln ve Arg719Trp mutasyonları (ekzon 19) için kontrol deneyi. (m:marker; lane 7,10,11 ve 13: normal olduğu saptanan bireyler; K: mutasyon taşıyan standart heterozigot birey.)

leye özgü çok farklı mutasyonların varlığı nedeniyle, elde edilen bu sonucun olası bir durum olduğu ortadadır. Hastalara daha ileri inceleme yöntemleri kullanılarak, HKM'ye neden olduğu belirlenmiş bütün gen bölgelerinin araştırılmasıyla yeni mutasyonlar saptanabilir.

Sonuç olarak, ağır klinik bulgu veren HKM'ye yol açan β -MAZ genindeki Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarının incelenmesi uluslararası kriterlere uygun olarak gerçekleştirildi. Bir sonraki aşamada, katılım genişletilerek ül-

ke düzeyinde veri tabanı oluşturulması ve ileri yaşlarda HKM'ye bağlı ani ölümleri önleme düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Projeye finansman desteği sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı ve çalışmanın yürütülmesi sırasında her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamıza izin veren Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD'na şükranlarımızı sunarız.

KAYNAKLAR

1. Richardson P, McKenna WJ, Bristow M et al: 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: 841-2
2. Marian AJ and Roberts R: Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92: 1336-47
3. Abchee A and Marian AJ: Prognostic significance of β -myosin heavy chain mutations is reflective of the hypertrophic expressivity in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med* 1997; 45: 191-6
4. Maron BJ: Hypertrophic Cardiyomyopathy. *Lancet* 1997; 350: 127-33
5. Redwood CS, Moolman-Smook JC, Watkins H: Properties of mutant contractile proteins that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* 1999; 44: 20-36
6. Varnava AM, Elliott PM, McKenna WJ, Davies MJ: Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis and small vessel disease. *Heart* 2000; 84: 476-82
7. Kuribayashi T and Roberts WC: Myocardial disarray at junction of ventricular septum and left and right ventricular free walls in HCM. *Am J Cardiol* 1992; 70: 1333-40
8. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. *Circulation* 1995; 92: 785-9
9. Seidman JG and Seidman C: The Genetic Basis for Cardiomyopathy: from Mutation Identification to Mechanistic Paradigms. *Cell* 2001; 104: 557-67
10. Yu B, French JA, Carrier L et al: Molecular pathology of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac myBP-C gene. *J Med Genet* 1998; 35(3): 205-10
11. Marian AJ, Mares A, Kelly DP et al: Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy; variability in

phenotypic expression of β -myosin heavy chain mutations. E Heart J 1995; 16: 368-76

12. Anan R, Greve G, Thierfelder L et al: Prognostic implications of novel β -cardiac myosin heavy chain gene mutation that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1994; 93: 280-5

13. Marian AJ and Roberts R: Molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy Ann Rev Med 1995; 46: 213-22

14. Mc Kenna WJ, Spirito P, Desnos M, Dubourg O, Komajda M: Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. Heart 1997; 77: 130-2

15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Vol.3. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. P: 9.14 -9.23

16. Jaenicke T, Diederich KW, Haas W, Schleich J, Lichter P, Vosberg HP: The complete sequence of the human heavy chain gene and a comparative analysis of its product. Genomics 1990; 8: 194-206

17. Epstein ND, Cohn GM, Cyran F, Fananapazir L: Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the β -myosin heavy chain gene. Circulation 1992; 86: 345-52

18. Ko YL, Chen JJ, Tang TK et al: Malignant familial hypertrophic cardiomyopathy in a family with a 453Arg \rightarrow Cys mutation in the β -myosin heavy chain gene: coexistence of sudden death and end-stage heart failure. Hum Genet 1996;97:585-90

19. Marian AJ, Yu QT, Mares A, Hill R, Roberts R, Perryman MB: Detection of a new mutation in the β -myosin heavy chain gene in a individual with HCM. J Clin Invest 1992; 90: 2156-65

20. Watkins H: Genotype: Phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy European Heart Journal 1998; 19: 10-12

21. Marian AJ: Sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside with an emphasis on genetic markers. Clin Cardiol 1995; 18: 189-98

22. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS et al: Characteristic and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med 1992; 326: 1108-114

23. Küçükateş E, Ersanlı M, Gültekin N ve ark: The Arg403Gln missense point mutation of β -myosin heavy chain in hypertrophic cardiomyopathy families in a diverse Turkish population and its relation with sudden cardiac death. E Heart J 1997; 18: Abstract Suppl I 229