T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ BİLİM DALI

İÇ ANADOLU TOPLUMUNDA TİP 2 DİABETLİ HASTALARIN IRS-1 VE IRS-2 GEN ÇOKYAPILILIĞININ TARANMASI

DOKTORA TEZİ

MELDA HEPDOĞRU (AKSOY)

DANIŞMANLAR

Prof.Dr. Ferhan PAYDAK

Prof.Dr. Ahmet ARSLAN

KONYA-2006

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ BİLİM DALI
PROJE NO: 2003/010

İÇ ANADOLU TOPLUMUNDA TİP 2 DİABETLİ HASTALARIN IRS-1 VE IRS-2 GEN ÇOK YAPILILIĞININ TARANMASI

DOKTORA TEZİ

MELDA HEPDOĞRU (AKSOY)

Bu tez aşağıdaki isimleri yazılı tez jürisi tarafından 12/12/2006 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No:…….)

Tez Jürisi:

Jüri başkanı (Danışman) : Prof.Dr. Ferhan PAYDAK
Üye : Prof. Dr. Ahmat ARSLAN
Üye : Prof. Dr. Hasan ACAR
Üye : Doç. Dr. Said GÖNEN
Üye : Yrd.Doç. Dr. Bülent TURHAN

1. GİRİŞ

Canlı dokularda ve hücrelerde hormon dengelerini metabolizmanın işlerliği için düzenleyen önemli hormonlardan biri insülindir (Robbins ve ark 1984). İnsülin sadece sentezi ve etkisi ile değil, etkisi altına aldığı hedef hücrelerdeki alıcı protein (reseptör) ve alıcı proteinlerin uyarımından sonraki (post reseptör) etkileri sebebiyle organizmal uyarı sistemlerinde önemli rolü olan bir hormondur. İnsülin, hücre üreme ve farklılaşması, glukoz girişinin uyarılması, lipolizisin engellenmesi, transferin reseptörü ve insülin benzeri büyüme faktörü 2 gibi çeşitli zar proteinlerinin sentezini ve leptinin salgılanması ve/veya sentezini içeren yağ dokusundaki çeşitli hücresel işlevleri teşvik eder (Anai ve ark 1998). İnsülin salgılanmasındaki yetersizlik, moleküler yapı bozuklukları, insülinin alıcı proteinlerine uygunluğu, insülin salınımı sonrası etkilerindeki değişikliklere yol açan farklı tipte glukoz tolerans bozukluğuna ve farklı şeker hastalığı tiplerine neden olur.

İnsülin eksikliğine veya insülin işlevinin yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkan şeker hastalıkları (diabetes mellitus; DM), karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Hastalık genellikle ağız kuruluğu, çok su içme (polidipsi), sık sık idrara çıkma (poliüri), bulanık görme ve kilo kaybı gibi belirtiler ile ortaya çıkar. Hastalığın kontrol edilemediği ileri yaşlarda aterosklerotik damarsal zedelenmelerin yol açtığı damarsal hasarlara bağlı diyabetik ayaklara, iyileşmeyen yara ve gangrene, kalp hastalıklarına ve yetmezliğine, glomerular ve arteri zedelenmesine bağlı renal bozukluklara, retinada arterial anevrizmaların ve proliferatif damarların kırılganlığının artmasına yol açarak körlüğe sebep olur (Yenigun 1995).

Şeker hastalığı, Tip 1 ve Tip 2 şeker hastalığı (diabetes mellitus) olarak iki gruba ayrılır. Tip 1 şeker hastalığı, pankreatik β hücrelerinin otoimmün parçalanmasına bağlı olarak mutlak insülin yetersizliği ile ortaya çıkan genç yaş şeker hastalığıdır (Yenigun 1995). Bununla beraber ileri yaşlarda da görülebilir. Tüm dünyada her yıl 50.000 yeni vakaya Tip 1 tanısı konulmaktadır. Beyaz ırkta 20 yaş altındaki çocuk ve gençlerde yıllık şeker hastası olma olasılığı (diyabet insidansı) binde 1-3 civarındadır (WHO Consultation 1999). Tip 2 şeker hastalığı ise genellikle hedef doku hücrelerinin insüline cevabında ve insülin salınmasında meydana gelen bozulma ile genellikle insülin direncinin gelişimi sonucu ortaya çıkan ileri yaş şeker hastalığıdır. Aşırı şişmanlık (obezite) ile ilintili geç

başlangıçlı ve aşırı şişmanlık ile ilişkisi olmayan geç başlangıçlı olmak üzere iki ana şekli vardır. Tip 2 şeker hastaların periferal dokuları, insüline karşı hassasiyeti azalmış ve direnç kazanmışlardır (White 2002). Ayrıca bu hastalarda pankreatik β hücreleri, salınan insülinin miktarını arttırmasına rağmen ortaya çıkan metabolik bozukluğu düzeltememektedir. Fizyolojik seviyede şişmanlık, hareketsizlik ve yaşlanma insülin direncinin yaygın nedenlerindendir (White 2002). İnsülin direnci geliştikten sonra uyarı-ileti silsilesinde bir değişiklik ve bozukluk meydana gelir. Uyarı-ileti mekanizmasında meydana gelen bozukluk, kas ve yağ dokusunda glukoz metabolizmasının düzenlenmesini de zorlaştırır.

İnsülin direncini oluşturan genetik bozukluklar için aday bölgeler insülin alıcı proteinini (reseptör), insülin alıcı protein ara ürünü (substratlarını) (IRS), insülin uyarı-ileti yolunu ve insülinle düzenlenen glukozun periferal kullanımıyla ilişkili genlerin ifadesindeki bozuklukları içermektedir (White 2002). IRS-1 ve IRS-2 molekülleri insülin işlevine aracılık ederler. IRS molekülleri insülin uyarı-ileti sisteminde büyüme, yaşama ve metabolizma gibi temel hücresel fonksiyonları sürdürmede rol oynarlar (White 2002). İnsülin işlevi ve insülin salgısı düşünüldüğünde, IRS-1 ve -2 molekülleri Tip 2 şeker hastalığının gelişimi ile ilgili aday genlerden bazıları olarak göze çarpmaktadır. Şeker hastalarında IRS-1 ve IRS-2 genlerindeki değişikliğin tespit edilmesi, bunların Türk toplumunda Tip 2 şeker hastaları içindeki oranının bulunması tip 2 şeker hastalarının tedavisinin etkinliğini arttıracağı ve bu hastaların yaşam kalitesinin arttırılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu çalışma ile Tip 2 şeker hastalarında bahsedilen genlerde hakim olan gen çokyapılılığı (polimorfizm) kontrollere göre mukayese edilerek yapılacaktır. Türk toplumundaki IRS-1 ve IRS-2 gen çokyapılılığı ile tip 2 şeker hastalığı arasında ilişkinin, var ise, toplum içindeki yüzdesi belirlenmeye çalışılacaktır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

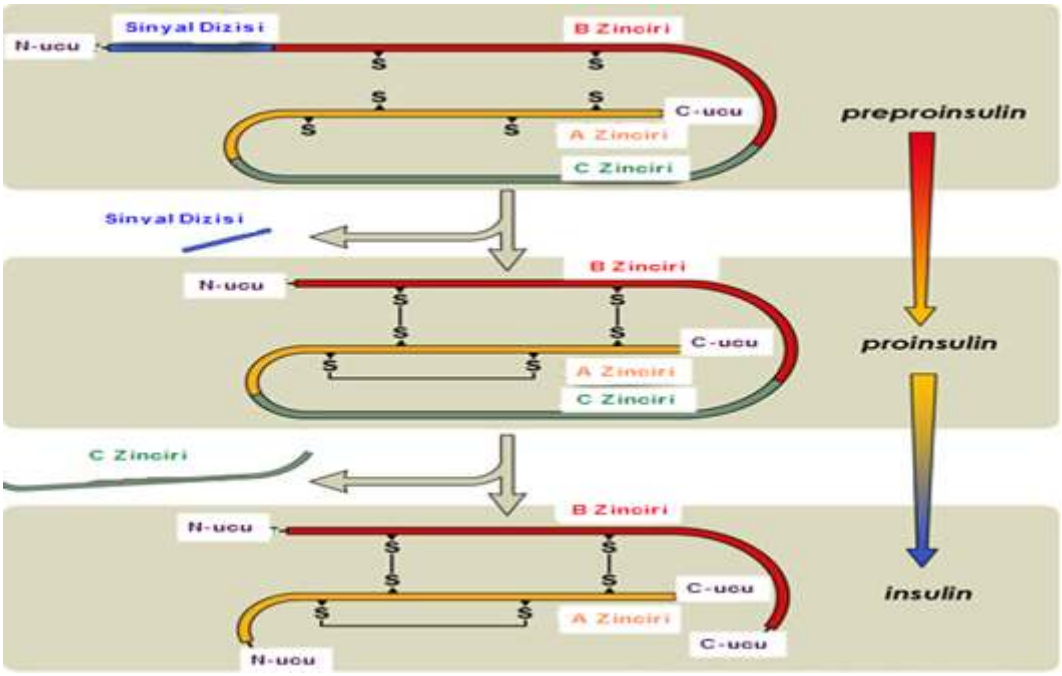
2.1. İnsülin

Banting ve Best (1922) tarafından bulunan insülin, metabolik fizyolojinin elzem bir düzenleyicisidir (Warram ve ark 1995). Klinik etkileri 1962 yılına kadar bilinen insülin, aynı yıl Steiner tarafından moleküler yapısı çözülmüş ve sentezi sağlanmıştır. Steiner ve arkadaşları (1962), radyoaktif lösin veya fenilalanini fare pankreas adacıkları veya insan adacık hücre adenom dokusu ile inkübe ederek, insülin antikorları ile reaksiyon veren iki radyoaktif protein türünü bildirmişlerdir (Steiner ve James 1962). Nısbi moleküler ağırlığı 6000 olan insülin ve moleküler ağırlığı 9000 olanına da proinsülin adı verilmiştir (Steiner ve James 1962). Daha sonraki çalışmalarda proinsülin öncülü olarak 11.500 mol ağırlıklı preproinsülin tanımlanmıştır. Proinsülin 86 aminoasitli (aa) bir polipeptid olup, 21 aa'lik A zinciri, 30 aa'lik B zinciri ve bu zinciri birbirine bağlayan 31 aa'lik bağlayıcı C-peptidden oluşmuştur (Steiner ve James 1962). Bir proinsülin molekülünün formülü NH2-B zinciri-Arg-Arg-C-peptid-Lys-Arg A zinciri-COOH'dır (Given ve ark 1980). B zincirinin serbest ucu NH2 ile A zincirinin serbest ucu ise COOH ile sonuçlanmaktadır (Given ve ark 1980).

İnsülin, tek zincirli polipeptid preprohormon (preproinsülin) olarak pankreatik adacıkların β hücrelerinde sentezlenir. 23 aminoasitlik lider dizisinin ayrılması ile preproinsülinin işlenmesi proinsülini meydana getirir (Bowen 1999). Proinsülin katlanır ve disülfid bağları ile karşılıklı bağlanır. Proinsülin salgı araçlarında endoproteazlar ile eşit sayıda C-peptid ve daha sonra disülfid köprüleri ile bağlanan A ve B polipeptid zincirlerini içeren insüline dönüştürülür (Hunter ve Garvey 1998) (Şekil 2.1). İnsülin, proinsülin ve C-peptid birbirlerinden bağımsız olarak kanda dolaşır (Bowen 1999). β hücresi uyarıldığında insülin dışa atılım (ekzositosiz) ile hücreden salınır ve adacık kılcal damarları yoluyla C-peptid ile birlikte kan dolaşımına katılır. Proinsülinden ayrılan C-peptidde dolaşıma katılır ve fizyolojik önemi vardır.

İnsülinin dolaşımdaki (biyolojik olarak) işlevsel hali, A7-B7 ve A20-B19 iki disülfit köprüsü ile birbirine bağlanan 21 aa'lik A zinciri ve 30 aa'lik B zincirinden oluşan bir monomerdir (şekil 2.2). A zinciri A7 ve A11 arasında zincir içi disülfit köprüsü içerir (Meyts 2004). Mikromolar derişikliklerde, insülin dimer durumdadır ve çinko iyonlarının

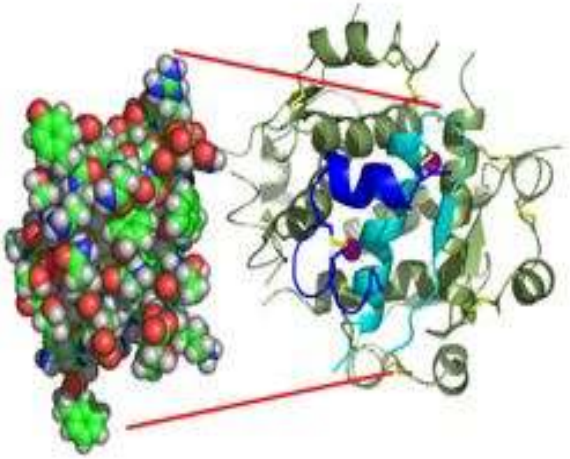
varlığında dimerler birleşerek simetrik hekzamerik yapısını alırlar (şekil 2.3). Hekzamer yapısı fiziksel ve kimyasal parçalanmadan molekülü korur (Dodson ve Whittingham 2001). Dimerleşme esnasında saklanan yüzey düz görünür. İki monomer yerel bir eksen etrafında katlanıp düzenlenerek dimer formunu alır (Dodson ve Whittingham 2002).



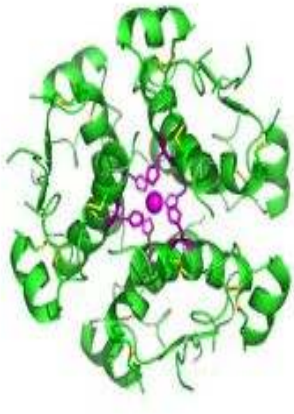
Şekil 2.1. İnsülinin işlenme aşamaları (www.betacell.org/content/briefs)

Bu düzenleme β-zinciri C ucu dizilerinin antiparalel düzenlemelerini gösterir ve 4 ana zincir-ana zincir hidrojen bağlarının yapısına izin verir. Bu yapı enerjinin iyi kullanımına ve dimer yapısının sağlam olmasına yardımcı olur (Dodson ve Whittingham 2002). İnsülin hekzamerinin üç tipi vardır. Birincisi, genişleyen B1-B8 kısmına sahip 6 monomer ile simetrik yapıda olan çift çinkolu insülindir. Çift çinkolu insülin hekzamerinde, A zinciri antiparalel C-ucu heliksi A12-A20 ile, N-ucu heliksi A1-A8 ile bağlıdır (Blundell ve ark 1972, Baker ve ark 1988). B zinciri, N ve C ucu strandları ile uzayan merkezi heliks B8-B19'a sahiptir. Bu kristallografik yapı T yapısı olarak isimlendirilir. İkincisi, 4 çinkolu insülin hekzameri kloridin yüksek konsantrasyonu ile meydana gelir (Dodson ve Whittingham 2002). Üçüncüsü, T yapısı gibi 6 monomer ile simetrik insülin hekzameridir ve R yapısı ismini alır. İki merkezi çinko iyonuna sahiptir ve B_{10} His yanzinciri ile beraber düzenlenir (Blundell ve ark 1972, Baker ve ark 1988). Basit insülin katlanması (üç heliks, üç korunmuş disülfit köprü) insülin peptid ailesinin tüm üyelerinde vardır. İnsülin monomeri iki geniş nonpolar yüzeye sahip olup, hidrofobik çekirdekten oluşur (Blundell ve ark 1972, Baker ve ark 1988). Bu nonpolar yüzeylerden biri aromatik ve düz olup,

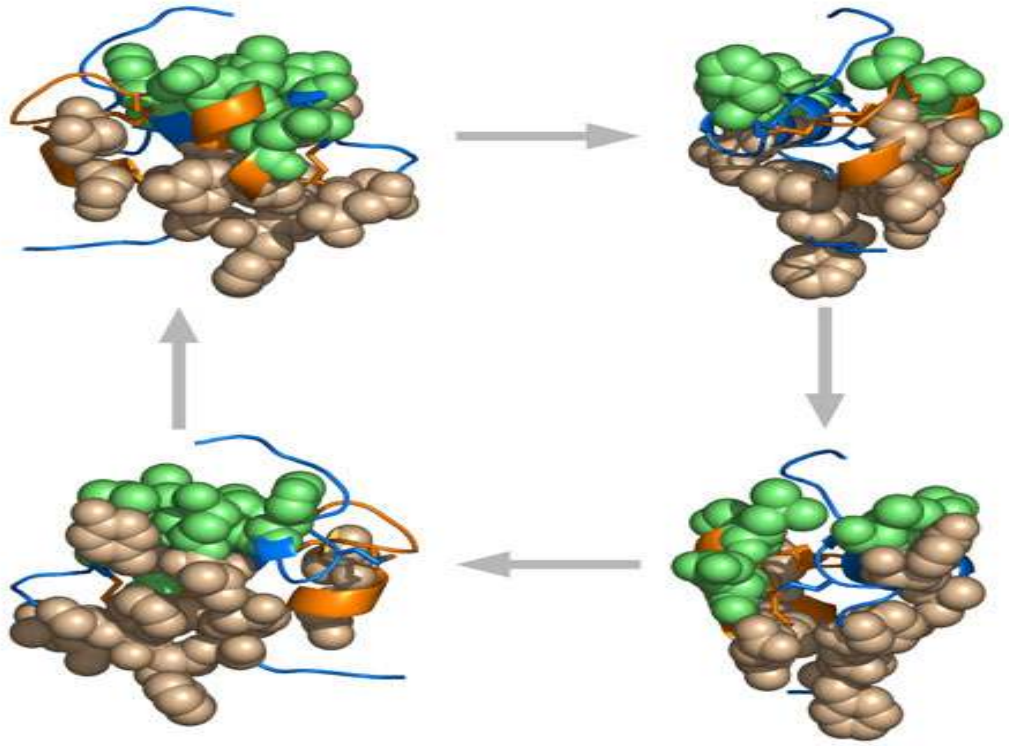
antiparalel beta tabakalı yapısıyla dimer formasyonunda gömülüdür. Diğer yüzey oldukça geniştir ve dimerler hekzamer formuyla birleşerek hidrofilik yüzeyin altına gömülmüştür. İnsülin benzer yüzeyleri, alıcı proteinine bağlanmak için kullanır (şekil 2.4). Glu-A1, Gln-A5, Tyr-A19, Asn-A21, Val-B12, Tyr-B16, Gly-B23, Phe-B24, Phe-B25, Tyr-B26 alıcı proteine bağlanmayla ilişkili yüzey dizileridir (De meys ve ark 1978). Orijinal yüzey dizilerine ilave olarak Ser-A12, Leu-A13, Glu-A17, His-B10, Glu-B13, and Leu-B17 dizi öbekleri de alıcı proteine bağlanmada önemlidir ve ana bağlanma bölgeleri olarak önerilir (Schaffer 1994). Alıcı proteinlere bağlanma bölgelerinin pozisyonları şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İnsülin Monomeri
(http://en.wikipedia.org/wiki/insülin)



Şekil 2.3. Çift çinkolu insülin hekzameri
(http://en.wikipedia.org/wiki/insülin)



Şekil 2.4. İnsülinin alıcı proteinine bağlanma bölgelerinin pozisyonları (kahverengi bölge klasik bağlanma bölgesi, yeşil renkli bölge ana bağlanma bölgesi) (www.betacell.org)

2.2. İnsülinin işlevi

Hücre seviyesinde, insülinin etkinliği oldukça farklı etkinlikleriyle ortaya çıkar. Bunlar; hücreler arası ve hücre içi madde alışverişi, protein kinazların ve fosfatazların uyarımı, hücresel büyüme ve farklılaşmayı teşvik etmesi ve transkripsiyonu tetiklediği gibi bazı durumlarda da baskılamasıdır (Baumann ve Saltiel 2001). Değişen yokuş aşağı (downstream) etkilerle ilgili farklı mekanizmalar alıcı proteine yakın veya birbirinden uzak olan uyarı ileti yollarıyla ilgilidir (Baumann ve Saltiel 2001). İnsülin işlevi, metabolik ve büyümeyi devam ettiren etkisi olmak üzere ikiye ayrılır (Kahn 1985). Metabolik işlevi, insülin uyarı-ileti yolunu içine almaktadır. İnsülin uyarı-ileti yolunun en önemli aracısı olan alıcı proteinler, hormonları bağlayan ve bu bağlanmadan sonra hormonun fizyolojik işlevinin başlamasında aracı olan bağlanma bölgeleridir (Kahn 1985). İnsülin alıcı proteinleri çift işlevli moleküllerdir. İnsülin işlevinde ilk adım, hücrenin plazma zarındaki alıcı proteine molekülüne insülinin bağlanmasıdır. Daha sonra alıcı protein ve alıcı

proteine bağlı hormonun oluşturduğu hormon bileşeni hücrede bir seri fizyolojik etkileri tetikler (Kahn 1985).

Kan glukoz seviyesinin artması ile birlikte, pankreatik adacıkların β hücrelerine ulaşan glukoz, insülin sentezini ve salınımını tetikleyerek yağ, kas ve karaciğer gibi ana hedef dokularında görevini yerine getirir. İnsülin bu dokularda, glukozun içeri girmesini sağlar ve enerji depolarından glukoz salınımını engeller (Birnbaum 1993). Çizgili ve kalp kasında glikojen ve protein sentezini teşvik eder, yağın depolanmasını kolaylaştırır. İnsülin, glikojen yıkımını (glikoliz) ve glukoneogenezi (gliserol, laktat ve amioasitler gibi kaynaklardan yeni glukoz yapımı) inhibe ederek, karaciğerden glukoz çıkışını baskılar ve glukoz düzeylerini düşürür (Zhang 2002). Hepatik glukoz çıkışını bu yolla baskılamak için, göreceli olarak düşük insülin derişiliklerine ihtiyaç duyulur (yemek araları ve gece bazal insülin salınımı gibi) (Zhang 2002). Yemeklerden sonra daha yüksek insülin düzeyleriyle, periferde GLUT-4 aracılıklı glukoz alımı uyarılır (Williams ve Pickup 2004).

Glukoz metabolizmasındaki insülinin etkileri hedef dokuya bağlı olarak değişir. İki önemli etkisi vardır. İnsülin kas, yağ ve birçok diğer dokuya glukozun girişini kolaylaştırır. Glukoz hücre içine hekzos taşıyıcıları (GLUT) ailesi ile kolaylaştırılmış difüzyonla alınır (Garvey ve Birnbaum 1993). İnsülinden sorumlu başlıca glukoz nakil izoformu GLUT 4'dür. GLUT 4 iskelet, kalp kası ve yağ dokusu gibi hedef hücrelerde çokça ifade edilir (Garvey ve Birnbaum 1993). İnsülin yokluğunda, GLUT 4 glukoz taşıyıcısı sitoplazmik veziküllerde bulunur. Bazı hücrelerde insülinin alıcı proteinine bağlanması plazma zarına birçok aracın hızlı bir şekilde kaynaşmasına ve glukoz taşıyıcıların girişine neden olur. Bu hücrelerin glukozu etkili bir şekilde alma yeteneği vardır. İnsülin seviyesi kanda azaldığında ve insülin alıcı proteinleri uzun süre işgal edilmediğinde, glukoz taşıyıcıları sitoplazma içine geri döner. Beyin ve karaciğerde glukozun girişi için insüline ihtiyaç duyulmadığından glukoz taşıyıcıları bu hücrelerde yoktur (Garvey ve Birnbaum 1993).

İnsülinin glukoz metabolizmasındaki ikinci etkisi, glukozu glikojen olarak depolamak için karaciğeri uyarmaktır. İnce bağırsaktan emilen glukozun büyük bir kısmı hepatositler tarafından hemen alınır, polimer glikojen deposu içine glikojen olarak girer.

İnsülinin büyümeyi teşvik eden etkileri insülin benzeri büyüme faktörleri (Insulin Like Growth factors; IGFs) olarak bilinen diğer hormon grubu ile ilişkilidir. IGF insülinin biyolojik etkilerini taklit etme yeteneğinde olan polipeptid hormonların bir ailesidir (Zapf ve ark 1984). IGF-I ve IGF-II iyi tanımlanmıştır. Bunlar sırası ile 70 ve 67 aminoasit dizili

polipeptidlerdir. IGF-I ve II'nin primer amino asit dizisi birbiriyle %62 benzerlik gösterir (Zapf ve ark 1984). Bu hormonların aminoasit dizilerinin yaklaşık %50'si insülinle benzerdir. IGF'lerin fizyolojik olarak özellikle IGF-I büyüme hormonu seviyesinde kontrol edildiği gözlenir (Clemmons ve ark 1984). IGF'ler hücreler üzerinde insülinin tüm biyolojik etkisini taklit etme yeteneğine sahiptir (Clemmons ve ark 1984). İnsülinin metabolik etkiler için oldukça güçlü olması, IGF'lerin ise büyümeyi ilerleten aktivitede güçlü olması ikisi arasındaki başlıca farklılıktır.

İnsüline hassas hücrelerde, alıcı proteinine insülinin bağlanması alıcı proteininin tirozin kinaz aktivasyonu, alıcı proteinlerin hızlı birikimi, hormon-alıcı protein bileşeninin içeri alınımı, iyon akışında artış, hücre içinden membran havuzuna glukoz taşıyıcıların taşınımı ile sonuçlanır. Daha sonra çok sayıdaki makromolekülün sentezindeki ve çok sayıdaki hücresel enzimlerin aktivitesindeki değişiklikler takip eder.

Kalıtımsal ve kazanılmış birçok faktör insülinin hedef dokulardaki hücre alıcı proteinlerine bağlanmasını engelleyerek veya alıcı proteindeki ileti yollarını bozarak insülinin biyolojik cevabının ileri derecede azalmasına yol açar (Reaven 1988). Azalan etkiyi karşılamak için aşırı insülin salınması olur. İnsüline cevabın ileri derecede azaldığı bu durum aşırı insülin direnci olarak adlandırılır (Reaven 1988).

İnsülin uyarı-ileti mekanizmasını ve insüline karşı hedef hücrelerde meydana gelen direnci daha iyi anlayabilmek için insülin hormonunun işlev mekanizmasını, alıcı proteininin özelliklerini, insülin alıcı proteini ara ürünleri (substrat) proteinlerinin yapısını ve insülin uyarı-ileti mekanizmasını iyice irdelenmesi gerekir.

2.3. İnsülin alıcı proteini (reseptörü)

Diğer peptid hormonları ve nörotransmitterler gibi insülin, hücrenin plazma zarı üzerindeki özgün alıcı proteinlerine bağlanır ve böylece karakteristik biyolojik etkilerine neden olan olaylar zincirini başlatır (Kahn ve ark 1981). Alıcı protein iki amaca hizmet eder. Birincisi, kandaki diğer tüm maddeler arasındaki hormonu tanır ve yüksek yatkınlık ile özgün olarak bağlanır. İkincisi, hücreler içi metabolik yolda bir değişimle sonuçlanan zarlar arası uyarısını iletir (Kahn ve ark 1981).

İnsülin alıcı proteini insülin işlevine aracılık etmek için gerekli ve yeterlidir. Yeni doğanın büyüme ve enerji metabolizmasında elzemdir, fakat fetal metabolizmada önemli değildir (Taylor 1999). İnsülin alıcı proteini, dolaşımdaki eritrositlerde 40 alıcı proteinden,

adiposit ve hepatositlerdeki 200.000 alıcı proteine kadar değişen derişiklikte olup, tüm omurgalı dokularında bulunur (Seino ve ark 1990). Alıcı protein geni insanın 19. kromozomunun kısa kolunda yerleşmiştir. Büyüklüğü 150 kilo baz (kb) uzunluğundadır ve 4.2 kb'lık cDNA ile kodlanan 22 ekzona ve 21 introna sahiptir (Seino ve ark 1990). İnsülin alıcı proteini disülfid bağlarla birbirine bağlanmış iki α- ve iki β-alt ünitesinden oluşmuş heterotetramerik (α2β2) zar glikoproteinidir (Kahn ve ark 1981). Bunlardan α-alt ünitesi 135.000 moleküler ağırlığında (MA), insülinin bağlandığı alt ünitedir. Bu alt ünite proteolitik olarak kesilir ve hücre dışı (extracellular) bölgeye sahiptir (Kasuga 1982). İnsülin alıcı proteininin β-alt ünitesi 95.000 MA'da ve 402 aminoasitli zarlar arası bir proteindir ve insüline hassas protein kinazdır (Hedo 1982). İnsülin alıcı proteininin α-alt ünitesi hücre dışında yerleşmiştir, β-alt ünitesi zarın bir ucundan diğer ucuna bağlı olarak bulunur. α-alt ünitesinde glisin merkezli bölgeler insülin bağlanmasında özgünlüğü sağlarlar (Zhang ve Roth 1991). β-alt ünitesi ise zara geçen uyarı iletimi ile ilgili alt ünitedir (alıcı proteininin uyarı-ileti sistemindeki etkili işlevsel kısmı) (Zhang ve Roth 1991).

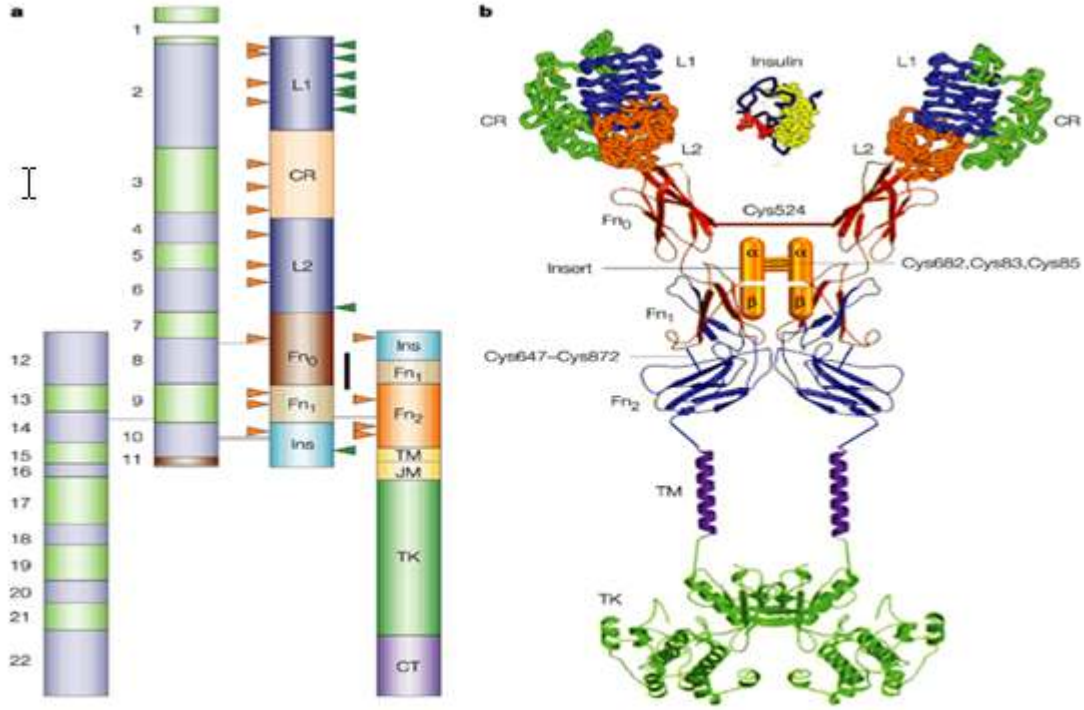
2.3.1. İnsülin alıcı proteininin yaşam döngüsü

İnsülin alıcı proteini tek zincirli öncül alıcı proteinden sentezlenir, moleküler ağırlığı 190.000'dir (Kasuga ve ark 1982). Bu öncül alıcı protein iki alt üniteden oluşmaktadır. Diğer zar proteinlerinde olduğu gibi alıcı proteinin sentezi, granüllü endoplazmik retikulumda başlar. Hücrenin golgi fazında glikosilasyona uğramasıile birlikte, alıcı protein olgun α ve β alt ünitelerine ayrılır ve alıcı protein zar üzerinde yerini alır. Bu işlemler 1.5-3 saat sürer. Bazı yollarda insülin alıcı proteininin biyosentezi insülin molekülününkine benzer olarak sentezlenir (Frattali ve ark 1992). Aynı zamanda tek zincir öncülü olarak iki disülfid bağlı zincir sentezlenir. Olgun heterotetramer, sialik asit dizisi ile şapkalanan N-bağlı karbohidrat yan zincirlerini içerir ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'nde 300-400 kDa'luk moleküler büyüklük gösterir (Seino ve ark 1990). Olgun alıcı proteinler yaklaşık 7-12 saatlik yarı ömre sahiptir. Hücre üzerindeki tüm alıcı proteinler her 7-12 saatte yıkılır ve yeni alıcı protein sentezlenir. Alt üniteler birlikte sentezlendiği gibi, her iki alt ünite beraber yıkılır (Frattali ve ark 1992). Birçok hücrede yıkım işlemi endositozis yoluyla gerçekleşir (Frattali ve ark 1992).

2.3.2. Tirozine özgün protein kinaz olarak insülin alıcı proteini

İnsülin alıcı proteini, birçok büyüme faktörünü içeren ligandlarla işlevsel hale geçen alıcı protein tirozin kinazların (RTK) ailesine aittir (Ullrich ve ark 1985). RTK ile uyarı iletimi, hücre yüzey alıcı proteininin hücreler arası kısmına özgün bir ligandın bağlanmasıyla başlatılır (Van der Geer ve ark 1994). Monomerik alıcı proteinlere ligandların (EGF; epitelial growth factor ve PDGF; platelet derived growth factor) bağlanması ile RTK işlevinde ilk adım olan alıcı protein dimerizasyonu gerçekleşir (Van der Geer ve ark 1994). İnsülin alıcı proteini ve IGF-I alıcı proteini gibi bazı RTK'larda ligand yokluğunda da dimerik yapı vardır (Van der Geer ve ark 1994).

Alıcı proteininin α alt ünitesinin üç kısımlı N uç bölgesi, iki globüler L alanı ile sisteinle zengin (Cys-rich; CR) alanın sağa dönümlü β sarmal (heliks) yapısına sahiptir (L_1-CR-L_2) (Meyts ve Whittaker 2002, Adams ve ark 2000) (Şekil 2.5). Sisteinle zengin bölge disülfid bağlı yapıları içerir. Bu alanları takiben fibronektin tip III tekrarları (Fn0ve Fn1'in bir kısmı) ve yapısı bilinmeyen büyük bir sokulma (insert) alanı yer alır. Bu yapıda L1 ve L2 bölgelerinin her biri potansiyel ligand bağlanma yüzeyli sağ el yönünde β-sarmallar şeklinde katlanmıştır (Meyts ve Whittaker 2002, Adams ve ark 2000). L1 bölgelerinin her birinin ligand bağlanmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Mynarcik ve ark 1997). α-alt ünitesinde L1 alanlarına ilave olarak L2-Fn0 sokulum alanından çıkarılan C ucu kuyruğu da insülin ile etkileşime giren bölgeler olarak rapor edilmiştir (Kurose ve ark 1994). İnsülinin B zincirinin merkezi α-sarmalı, insülin alıcı proteininin β sarmalı ile ilişki kurar (Huang ve ark 2004). Yüksek ve düşük yatkınlık ilişkileri bu sarmalın yüzeyindeki korunmuş bölgeler olan B12 ve B16 dizileriyle belirlenmiştir. Val^{B12} ve Tyr^{B16} serbest hormonun polar olmayan dimerizasyon yüzeyinde yerleşmişlerdir ve alıcı proteinin L1 alanının polar olmayan yüzeyine bağlandıkları gösterilmiştir (Huang ve ark 2004).



Şekil 2.5. İnsülin alıcı proteininin yapısal biyolojisi. a) alıcı proteininin şematik yapısı, b) Kristal yapısı (Nature rewievs drug discovery 1, 769-783, 2002)

İnsülin alıcı proteininin sitozolik alan içindeki işlevsel bölgeleri tam bağlanma alanı (Odawara ve ark 1989), ATP bağlanma bölgesi (Gly-X-Gly-X-X-Gly), katalitik bölge (Wilden ve ark 1992), zara girdiği, zarla bitişik bölge (juxtamembran bölge; β-alt ünitesinin zarın iç kısmıyla birleştiği yer) (Murakomi ve ark 1991) ve karboksil (COOH) ucunu içerir (). ATP bağlanma bölgesi ve katalitik bölge tüm RTK'ların kinaz bölgesinde yer alır (van der Geer ve ark 1994). B-alt ünitesinin hücre içi alanında birçok otofosforilasyon bölgesi vardır. İşlevsel olarak üç ana bölgenin önemli rol oynadığı bulunmuştur (Cheatham ve Kahn 1995). Bu bölgeler katalitik bölgenin işlevsel halkasında Tyr1158, Tyr1160 ve Tyr1162, zara girdiği bölgede Y960 ve karboksil uç bölgesinde yer alan Tyr1328, Tyr1334'dir. İşlevsel halkadaki dizilerin fosforilasyonu alıcı proteinin kinaz aktivitesini ilerletmede önemlidir. Karboksil ucu fosforilasyon bölgeleri alıcı proteininin mitojenik aktivitelerinde rol oynayabilir (Tavare ve Siddle 1993). COOH ucunun, SH2 proteinlerini alıcı proteinle ilişkisini sağlamaktan daha çok insülin uyarısını düzenlediği rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark 1993). Karboksil kuyruğundaki insülin alıcı proteini otofosforilasyon bölgelerinin biri YXXM dizilim tarzındadır (Levy-Toledano ve ark 1994).

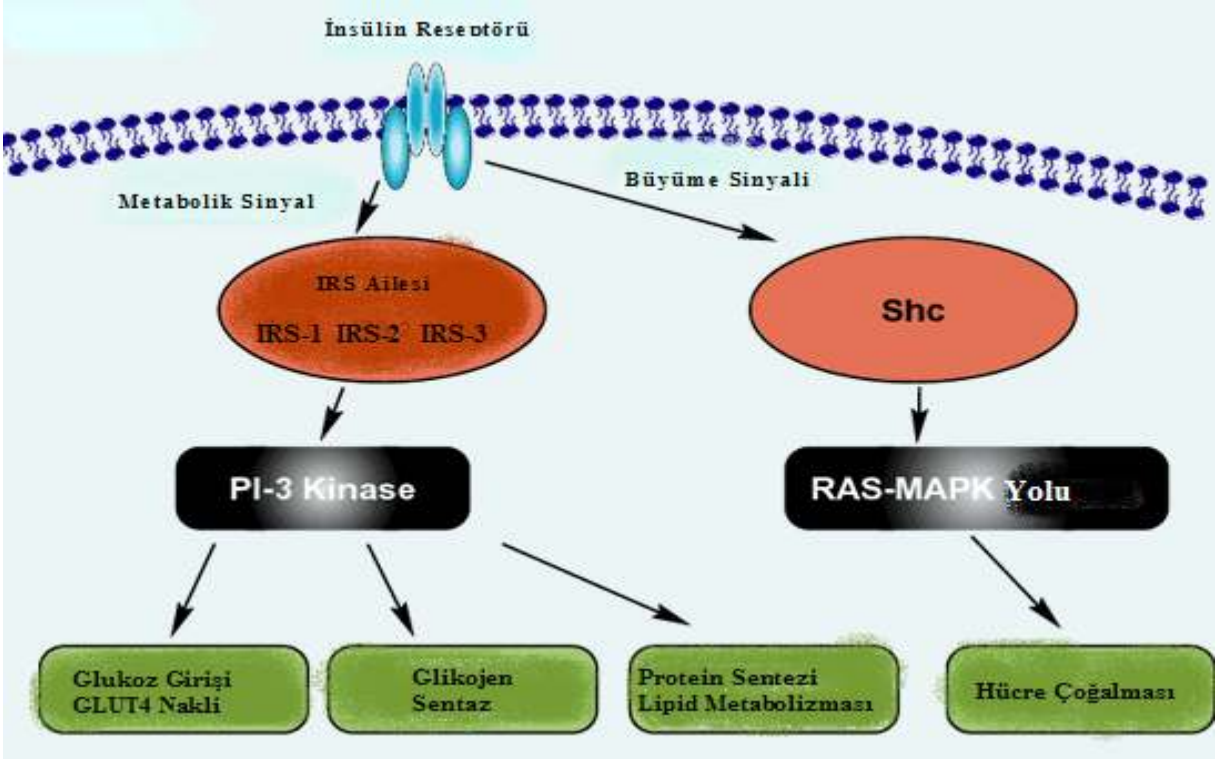
Bu fosforilasyon bölgesi PI-3 kinazın SH2 bölgeleri için bağlanma dizilimi olarak tercih edilir (Levy-Toledano ve ark 1994). Alıcı proteininin zara girdiği otofosforilasyon bölgesi; ATP, hücre içi aramaddeler ve ilişkili kinazlar ile alıcı proteini arasındaki ilişkide önemli bir rol oynar ve alıcı protein/ara ürün bileşeninin kararlılığını arttırmada bağlanma bölgesi olarak görev yapar (Tavare ve Siddle 1993) ve hücre içi maddelerin fosforilasyonu ve insülin uyarısının iletimi için gereklidir (Backer ve ark 1991). Bu bölge insülin alıcı protein geninin 16. ekzonu tarafından kodlanır ve birçok serin fosforilasyon bölgesi ve NPXY960 diziliminde bir tirozin otofosforilasyon bölgesi içerir (Fener ve ark 1993).

İnsülin, alıcı proteinin hücre dışı α-alt ünitesine bağlandığında alıcı proteinde hızlı bir yapısal değişiklik başlar. İki α- alt ünitesi bir araya gelir. Bu yapısal değişiklik hücre içindeki β-alt ünitesine ATP'nin bağlanmasını sağlar. ATP bağlanması alıcı proetinin otofosforilasyonunu aktive eder (Hubbard ve ark 1994) ve hücreler arası protein substratlarına doğru alıcı proteininin kinaz aktivitesi ile uyari iletilir. β-alt ünitesi tirozin kinaz aktivitesinin liganda bağlı uyarımı, insülin uyarı iletimi için kritiktir. İnsülin alıcı proteininde meydana gelen nokta mutasyonları ATP'nin bağlanmasını engeller (kinaz aktivitesi bozulur) ve insülin uyarısını ortadan kaldırır (Chou ve ark 1987). Alıcı proteininin kinaz işlevini ortadan kaldıran mutasyonlar sonucunda ağır insülin direnci gelişir (Odawarw ve ark 1989).

2.3.3. İnsülin alıcı proteinlerine ait ara ürünler (substratlar) (IRS)

İnsülin alıcı proteini, hücresel mitojenik ve metabolik olaylarda insülinin temel aracısıdır (Kahn ve White 1988). İnsülin alıcı proteinini hücre dışı α-alt ünitesine insülinin bağlanmasını takiben, tirozin kinaz içeren β-alt ünitesi tirozil fosforilasyonuna uğrar ve insülin cevabını tetikler (Kahn ve White 1988). Tirozin fosforilasyonu, uyarı-ileti silsilesindeki erken adımlarda enzimleri veya alıcı proteinlerin işlevini doğrudan doğruya kontrol eder (Pawson 1995). Böylece bağlanma proteinleri çevresindeki çok bileşenli uyarı-ileti ara ürünlerinin birleşmesini koordine ederek uyarı ileti silsilesi safhalarında önemli rol oynar (Pawson 1995). Alıcı proteininin işlerlik kazanması, uyarı-ileti silsilesini ilerleten hücresel ara ürünlerin tirozin fosforilasyonunu sağlar (Pawson 1995). Bu ara ürünlerden insülin alıcı proteinlerine ait ara ürün (IRS) proteinleri, insülin uyarı-ileti silsilesi esnasında birçok yokuş aşağı uyarı-ileti moleküllerini uyarmak üzere insülin alıcı proteinine özel bağlanma molekülleri olarak görev yaparlar (White 1998).

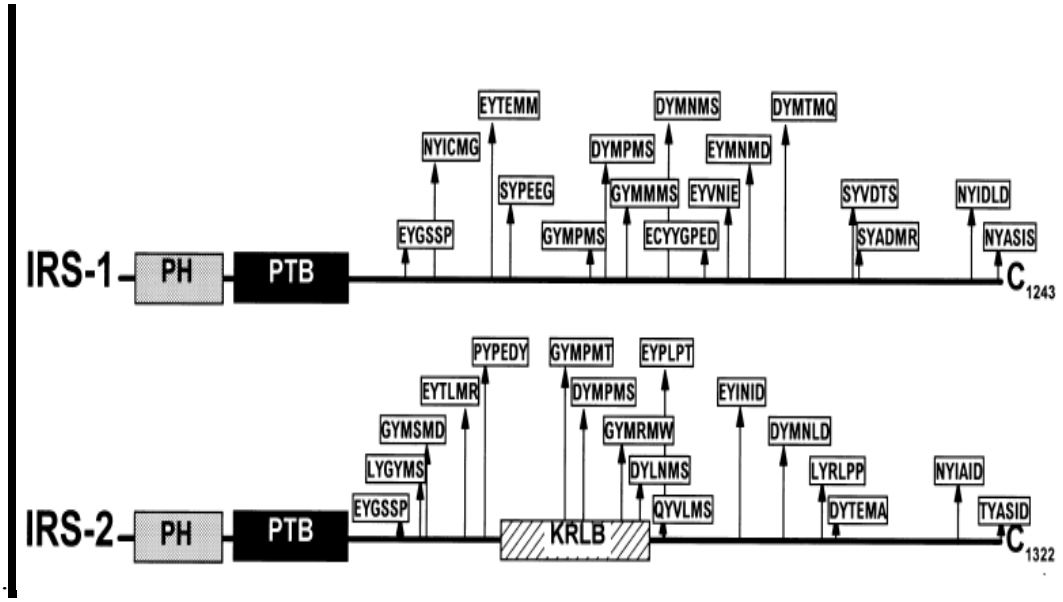
Bu bağlanma proteinleri alıcı protein uyarı-ileti silsilesinde birçok önemli özellik sağlar. İlk olarak, alıcı proteinler tarafından karşılaşılan sitokiometrik zorlamaları ortadan kaldırarak alıcı protein uyarılarını yaygınlaştırırlar. Bunu da otofosforilasyon bölgelerine SH2 proteinlerini toplayarak gerçekleştirirler (White 1998). İşlevsel hale gelen alıcı proteini, hücre içi yolunda hücre içi uyarı bileşenlerinden ayırırlar (White 1998). Bu özellik, insülin alıcı proteinine ulaşamayan membran bileşenlerinin uyarı iletimini ilerletmesinde ve bu bilesenlerin insülinle uyarilmasiyla, hucre icindeki biyolojik etkilerini gerceklestirmesinde
önemlidir (Heller-Harrison ve ark 1996). Bağlanma proteinleri, düzenlenebilen uyarı-ileti yollarının işlevsel hale gelmesinde de rol oynarlar (White 1998). Tek bir bağlanma proteini, hücresel büyüme ve metabolizmayı kontrol eden birçok komutu tamamlamak için ortak bir ara madde gibi görev yaparak çeşitli alıcı proteinlerden gelen uyarıları da tamamlar (Hotamışlıgil ve Spiegelman 1994).



Şekil 2.6. IRS proteinlerinin insülin uyarı-ileti yolundaki görevleri (www.glycoforum.gr.jp)

IRS'lerin insülin uyarı-ileti yolunda büyüme, metabolizma ve yaşama gibi temel hücresel fonksiyonları sürdürmede temel bir rolü vardır (Şekil 2.6). IRS ailesi yakın ilişkili

4 üyesi IRS-1, IRS-2, IRS-3 ve IRS-4'den ve uzak ilişkili homolog Gab-1'den oluşurlar (Sesti 2000). IRS-1, ilk belirlenmiş bağlanma proteinidir ve IRS ailesi proteinlerinin prototipini gösterir (Sun ve ark 1991). IRS proteinleri zar fosfolipidlerine bağlanan NH2 uçlu plekstrin homoloji (PH) bölgesi, insülin alıcı proteini β-alt ünitesinin zara girdiği bölgesindeki asparagin-prolin-glutamik asit-fosfotirozin (NPEY) aminoasit dizisindeki fosfotirozin ile ilişkili fosfotirozin bağlanma alanı (PTB) ve özgün SH2 bölgeli proteinli bölgelere bağlanabilen birçok potansiyel tirozin fosforilasyon motifli az korunmuş COOH uç kısmından oluşurlar (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. IRS Protein Ailesi Üyeleri. IRS-1 ve 2'nin alıcı protein etkileşim alanları ve tirozin fosforilasyon bölgeleri. PH-Plekstrin homoloji bölgesi; PTB-fosfotirozin bağlanma bölgesi; KRLB; Kinaz düzenleyici halkasal bağlanma bölgesi (White 1998).

Her bir IRS proteinin COOH uç kısmındaki tirozin fosforilasyon bölgeleri, çeşitli yokuş aşağı uyarı-ileti proteinlerini düzenleme ve toplamada aç/kapa düğmesi gibi iş görür (White 2002). IRS ailesi proteinleri prolince zengin bir kalıp dizi içerirler. Bu kalıp dizi her IRS molekülünde farklı yerlerde yer almaktadır (White 2002). Çeşitli uyarı-ileti ara metabolitlerinin SH3 bölgesine prolince zengin kalıp dizisi bağlanır. IRS-1 molekülünde PQPPPPPPPHQPL prolin kalıp dizisi COOH ucunda iki tirozin fosforilasyon yeri arasında bulunur (White 2002). IRS-2 molekülünde ise prolince zengin PLPPGSHPHLPHPLHHP kalıp dizisi PTB bölgesinden hemen sonra yer alır. Her iki IRS molekülünde prolince zengin bu kalıp dizileri farklı yerlerde olduğundan dolayı, uyarı-ileti silsilesindeki

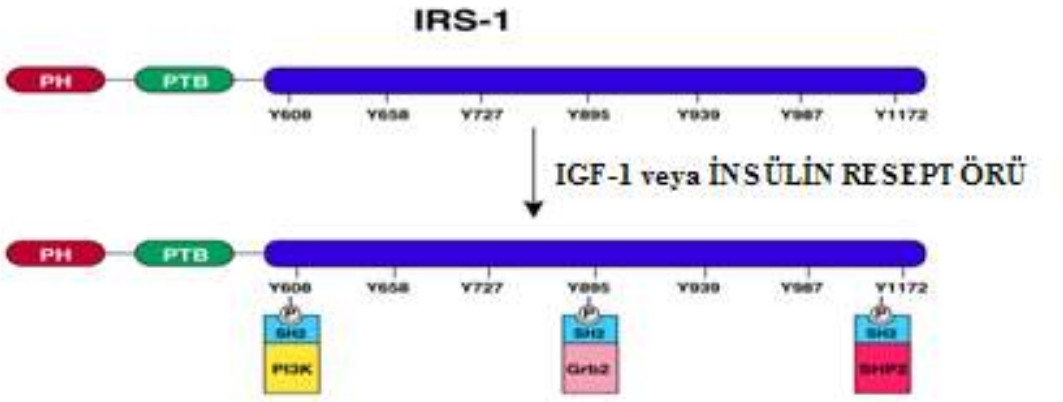
üstlendikleri görevin özgün olduğu şeklinde yorumlanmasına sebep olur (White 2002). IRS proteinlerinin PH bölgesi, zar proteinlerinin asidik peptid motiflerine bağlanarak IRS protein kompleksini insülin alıcı proteinine bağlar (Burks ve ark 1998).

IRS ara ürünleri, doku dağılımındaki farklılık (Givannone ve ark 2000), hücre içi yerleşimi (Anai ve ark 1998), SH2 alanı içeren proteinler ile ilişki (Sun ve ark 1997) ve insülin alıcı proteinine bağlanmaları ile belirlenir. Bu farklılıklar, IRS proteinlerinin farklı biyolojik uyarılara aracılık etme yeteneğindeki özgünlüklerine yardımcı olabilir. İnsanda IRS proteinlerini kodlayan genlerdeki değişikliklerin, şişmanlık ve tip 2 şeker hastalığı metabolik düzensizliklerinin ortaya çıkmasından sorumlu gen bölgeleri olduğu akla gelmektedir.

2.3.3.1. İnsülin alıcı proteinine ait ara ürün-1 (substrat-1) (IRS-1)

2.3.3.1.A. IRS-1 proteininin moleküler yapısı

IRS-1, IRS ailesi proteinlerinin ilk klonlanmış ve en iyi tanımlanmış proteinidir (Sun ve ark 1991). Moleküler ağırlığı 131.000 (Mr,131 K) olan hidrofilik bir proteindir. Fakat yüksek serin fosforilasyon içeriğinden dolayı SDS-PAGE üzerinde 165-180 kDa'a uyumlu bir pozisyonda göç eder (Sun ve ark 1991). IRS-1, glisinle zengin motif (Gly137-Val-Gly-Glu-Ala-Gly) ile başlayan potansiyel ATP bağlanma bölgesi ve 14 aa uzunluğunda elzem lizin dizisi (Ala-X-Lys156-X-Ile, X herhangi bir aa) içerir (Sun ve ark 1991). IRS-1 protein kinazının diyagnostik motifleri Asp-Phe-Gly ve Ala-Pro-Glu'yu içermez (Hanks ve ark 1990). IRS-1, 21 potansiyel tirozin fosforilasyon bölgesine sahiptir. Bu bölgeler SH2 alan proteinlerine bağlanırlar. PI 3-kinazın p85 düzenleyici alt bölgesi, Grb-2, Nck, Crk, Fyn, Csk, fosfolipaz C ve SHP-2, SH2 alanı içeren proteinlerdir (White 1997). IRS-1, 50'den fazla potansiyel serin/treonin fosforilasyon bölgelerini de içerir (White 1997). Kazein kinaz 2, protein kinaz C, protein kinaz B/Akt ve mitojeni uyaran protein (MAP) gibi çeşitli kinazlar ile tanınan dizilim tarzları serin/treonin fosforilasyon bölgelerini taşırlar (White 1997, Sun ve ark 1991).



Şekil 2.8. IRS-1 Tirozin Fosforilasyon Bölgeleri (www.pnb.sunysb.edu)

Tirozin fosforilasyon bölgelerinden altısı YMXM (Tyr-Met-Xaa-Met) tekrarlayan dizilimine, üçü YXXM (Tyr-X-X-Met) dizilimine ve bir bölge EYYE tarzında diziye sahiptir (Sun ve ark 1991). Fosforillenmiş YMXM dizilimlerinin SH2 (src homoloji 2) içeren proteinlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sun ve ark 1991). Tirozin fosforilasyon bölgelerinde YMXM ve YXXM dizilimlerinin olması, IRS-1'in SH2/SH3 alanlarını içeren uyarı iletim moleküllerine bağlanan bağlanma proteini olarak görev yaptığını göstermektedir (Sun ve ark 1991). IRS proteinleri, fosfotidilinositol (PI) 3-kinazın düzenleyici alt ünitelerindeki SH2 alanları için seçici bağlanma bölgeleri olan YXXM dizilimlerinde birçok fosforilasyon bölgesi içerirler (şekil 2.8). (Myers ve ark 1994). Sıçan IRS-1 proteininin 460, 608, 628, 939 ve 987 konumundaki YXXM/YMXM dizilimleri PI 3-kinaz ile etkileşimde önemli bölgelerdir (Sun ve ark 1993). İnsan IRS-1 YXXM dizilimleri 465, 612, 632, 662, 941 ve 989 konumlarında yerleşiktir (Sun ve ark 1993). Rat IRS-1'in Tyr-608 (insan IRS-1'inde Tyr-612), Tyr-628, Tyr-658 fosforilasyon bölgeleri PI 3-kinazın genişlemesinden sorumlu YMXM dizilimleridir. Tyr-895 GRB-2'ye bağlanır. Karboksil ucu otofosforilasyon bölgeleri; Tyr-1172 ve Tyr-1222 SHP2 ve Fyn'e bağlanır (Myers ve ark 1994, Sun ve ark 1996). SHP2, SH2 alanı içeren bir tirozin fosfatazdır (Myers ve ark 1994). Fyn, SH2 ve SH3 alanı içeren tirozin kinazların Src ailesinin bir üyesidir (Sun ve ark 1996). İnsan IRS-1'in 612 ve 632 konumundaki YXXM dizilim çiftlerinin, PI 3-kinaza bağlanma, işlevsel hale getirme ve adipoz hücrelerinden GLUT 4'ün taşınımına aracılık etmesinde yeterli olduğu bulunmuştur (Esposito ve ark 2001). YMXM dizilimlerinin insülin alıcı proteini kinazının ara ürün özgünlüğünün belirlemesinde önemli olduğu gösterilmiştir (Shoelson ve ark 1992). Y+1 ve Y+3 pozisyonlarındaki metionin dizileri etkin kinaz tanımı için önemlidir (Shoelson ve ark

1992). İnsan IRS-1'nin ikincil yapısı oldukça düşük seviyede α-heliks (%4.9) ve proteinin büyük kısmı β-tabakasından (%51) oluşmuştur (Araki ve ark 1993). YMXM ve YXXM dizilimlerinin hepsi β-tabaka bölgelerinde yerleşmiştir (Araki ve ark 1993). IRS-1 ve IRS-2 proteinleri membran fosfolipidlerine bağlanan NH2 uçlu plekstrin homoloji (PH) bölgesi, insülin alıcı proteini β-alt ünitesinin zara giren bölgesindeki asparagin-prolin-glutamik asit-fosfotirozin (NPEY) aminoasit dizisindeki fosfotirozin ile ilişkili fosfotirozin bağlanma alanı (PTB) ve spesifik SH2 alanlı proteinli alanlara bağlanabilen birçok potansiyel tirozin fosforilasyon dizilimli az korunmuş COOH uç kısmından oluşurlar (Şekil 2.9, 2.10)

2.3.3.1.B. IRS-1 geni

İnsan IRS-1 geni kromozom 2'nin q36-37 bölgesine yerleşmiştir (Stoffel ve ark 1993) ve 1242 aa'lik bir proteini kodlar. Bu protein sıçan IRS-1'inkiyle %88 benzerlik gösterir (Araki ve ark 1993). Bu da proteinin karşı tür ve dokularda yüksek oranda korunduğuna işaret eder. İnsan IRS-1 cDNA'sı sıçan karaciğer IRS-1'i ile yüksek derecede benzerliğe sahiptir. İnsan IRS-1 cDNA'sı 1021.ci bazda Kozak konsensus translasyon başlama bölgesi ile başlayan (Kozak 1989), 4746.cı bazda TAG ile sonlanan 3726 baz çiftlik (bç) açık okuma bölgesine sahiptir (Araki ve ark 1993). İnsan IRS-1 cDNA'sının 5'-kodlanmayan bölgesi sıçan IRS-1 cDNA'sınınkinden 432 bç daha uzundur (Araki ve ark 1993) ve her iki türün cDNA'sı üst üste çakıştırıldığında nükleotid seviyesinde %73 benzerliğe sahiptir. 5'-kodlanmayan bölgede, 4 potansiyel Sp1 transkipsiyon bağlanma bölgesi ve IRS-1 gen ifadesini düzenleyen TC (TCCC tekrar dizisi) ile zengin bölge vardır (Camilloni ve ark 1986). İnsan insülin alıcı protein geninin (hIR) özendirici (promoter) bölgesinde de TC ile zengin bölgeler ve potansiyel Sp1-bağlanma bölgeleri vardır (Araki ve ark 1987). Bu bilgilere göre, IRS-1 ve insülin alıcı proteininin ifadesinin düzenlenmesinin benzer mekanizmalarla düzenlendiği anlaşılmaktadır (Araki ve ark 1993). IRS-1'in NH2 ucu, iki korunmuş GXGXXG dizilimlerini içeren ATP bağlanma bölgelerini içerir. Karboksil uç bölgesi ise uyuşum dizisinde üçüncü glisine sahip değildir (Araki ve ark 1993). IRS-1 geni iki ekzona sahiptir. Bu gen; 5'ucu-kodlanmayan bölge, bir kodlama bölgesi ve 24 baz çiftlik 3'ucu-kodlanmayan (TAG stop kodonu içerir) bölgeyi içerir (Araki ve ark 1993). IRS-1 geni glukagon geni, kollajen IV ve VI genleri, alkalin fosfataz genleri, paired-box homeotik geni ve rhabdomyosarcoma-1 genlerine komşudur (Genome data base 1992).

2.3.3.1.C. IRS-1 proteininin işlevi

Farelerde yapılan gen bölgesinin çıkarılması çalışmalarında, IRS-1'in çıkarılmasının ılımlı insülin direnci ile şiddetli büyüme geriliğine neden olduğu bulunmuştur (Tamemoto ve ark 1994, Araki ve ark 1994). Buna göre IRS-1'in insülin ve IGF işlevlerinde önemli rolü olduğu önerilmektedir.

IRS-1'i olmayan knockout farelerin öncül adipositleri ile yapılan çalışmada, insüline cevaben GLUT4 taşıyıcısının plazma zarına naklinde ve glukoz taşınmasında azalma gösterdiği rapor edildi (Tamemoto 1994). İnsan adipositlerinde, insüline cevaben PI3-kinazın aktivasyonu ve bağlanması için IRS-1'in ana bağlanma proteini olduğu bildirilmiştir (Rondinone ve ark 1997). İnsan öncül adipositlerinin olgun adipositlere farklılaşmasında IRS-1 protein ifadesinin on kat arttığı, IRS-2 ifadesinin ise iki kat arttığı rapor edilmiştir (Pederson 2000). İnsan adiposit fenotipinin gelişmesi ile insülinle uyarılan glukoz nakil kapasitesi ve GLUT4 ifadesinin artması bu değişikliklere neden olmuştur (Pederson 2000). IRS-1'i olmayan knockout farelerden alınıp in vitro koşullarda üretilen fibroblastlarda, IGF-1'e karşı oluşan cevapta azalma görülmüştür (Bruning ve ark 1997), aynı hayvanlardan alınıp in vitroda üretilen kahverengi adipositlerdeki IRS-1'in yokluğu, insüline cevaben lipid sentezinde bir azalma göstermiştir ve adiposit farklılaşmasının bozulmasıyla sonuçlanmıştır (Valverde ve ark 1999). Yapılan son çalışmalarda, pankreatik β hücrelerinde insülin salınımının düzenlenmesinde IRS-1'in önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir. BTC6-F7 ve RIN 1046-38 insulinoma hücre hatlarında yapılan çalışmada, IRS-1'in aşırı ifadesinin glibenklamid ilacı ve glukoza cevaben insülin salınımında artış görülmüştür (Porzio ve ark 1999). IRS-1'i olmayan knockout farelerdeki adacıklar, insülin içeriği ve insülin salınımında bozukluk göstermiştir (Kulkarni ve ark 1999). Bu bilgiler, IRS-1'in kas ve adipoz doku gibi periferal dokularda insülinin metabolik ve mitojenik etkilerine aracılık ettiğini ve β hücre fonksiyonunda IRS-1'in önemli rolü olduğunu göstermektedir (Giovannone ve ark 2000). IRS-1, insülin uyarımına karşı mitogenesiz, protein sentezi ve glukoz nakli gibi birçok hücresel cevaba aracılık etmektedir (White 1998).

```
          1          11          21          31          41
51
   1 MASPPESDGF SDVRKVGYLR KPKSMHKRFF VLRAASEAGG
PARLEYYENE KKWRHKSSAP  60

  61 KRSIPLESCF  NINKRADSKN KHLVALYTRD EHFAIAADSE
AEQDSWYQAL LQLHNRAKGH  120

 121 HDGAAALGAG GGGGSCSGSS GLGEAGEDLS YGDVPPGPAF
KEVWQVILKP  KGLGQTKNLI  180

 181 GIYRLCLTSK  TISFVKLNSE  AAAVVLQLMN IRRCGHSENF
FFIEVGRSAV  TGPGEFWMQV 240

 241 DDSVVAQNMH ETILEAMRAM SDEFRPRSKS  QSSSNCSNPI
SVPLRRHHLN  NPPPSQVGLT  300

 301 RRSRTESITA  TSPASMVGGK PGSFRVRASS  DGEGTMSRPA
SVDGSPVSPS TNRTHAHRHR 360

 361 GSARLHPPLN  HSRSIPMPAS  RCSPSATSPV  SLSSSSTSGH
GSTSDCLFPR  RSSASVSGSP  420

 421 SDGGFISSDE  YGSSPCDFRS  SFRSVTPDSL  GHTPPARGEE
ELSNYICMGG  KGPSTLTAPN  480

 481 GHYILSRGGN  GHRCTPGTGL  GTSPALAGDE  AASAADLDNR
FRKRTHSAGT  SPTITHQKTP  540

 541 SQSSVASIEE YTEMMPAYPP  GGGSGGRLPG  HRHSAFVPTR
SYPEEGLEMH PLERRGGHHR  600

 601 PDSSTLHTDD GYMPMSPGVA PVPSGRKGSG DYMPMSPKSV
SAPQQIINPI  RRHPQRVDPN  660

 661 GYMMMSPSGG CSPDIGGGPS  SSSSSSNAVP  SGTSYGKLWT
NGVGGHHSHV LPHPKPPVES  720

 721 SGGKLLPCTG DYMNMSPVGD SNTSSPSDCY  YGPEDPQHKP
VLSYYSLPRS  FKHTQRPGEP  780

 781 EEGARHQHLR LSTSSGRLLY  AATADDSSSS  TSSDSLGGGY
CGARLEPSLP HPHHQVLQPH  840

 841 LPRKVDTAAQ TNSRLARPTR LSLGDPKAST LPRAREQQQQ
QQPLLHPPEP  KSPGEYVNIE  900
```

901 FGSDQSGYLS GPVAFHSSPS VRCPSQLQPA PREEETGTEE
YMKMDLGPGR RAAWQESTGV 960

961 EMGRLGPAPP GAASICRPTR AVPSSRGDYM TMQMSCPRQS
YVDTSPAAPV SYADMRTGIA 1020

1021 AEEVSLPRAT MAAASSSSAA SASPTGPQGA AELAAHSSLL
GGPQGPGGMS AFTRVNLSPN 1080

1081 RNQSAKVIRA DPQGCRRRHS SETFSSTPSA TRVGNTVPFG
AGAAVGGGGG SSSSSEDVKR 1140

1141 HSSASFENVW LRPGELGGAP KEPAKLCGAA GGLENGLNYI
DLDLVKDFKQ CPQECTPEPQ 1200

1201PPPPPPPHQPLGSGESSSTRRSSEDLSAYASISFQKQPEDRQ

Şekil 2.9. IRS-1 ekzonun kodlanan bölgesinin aminoasit dizisi (kırmızı renkli diziler PH bölgesini, mavi renkli diziler PTB bölgesini göstermektedir) (http://www.expasy.org).

2.3.3.2. İnsülin alıcı proteinine ait ara ürün-2 (substrat-2) (IRS-2)

2.3.3.2.A IRS-2 proteininin moleküler yapısı

IRS-2, farelerde IRS-1 geninin hedeflenmiş parçalanması ile belirlenen ilk alternatif insülin alıcı protein ara ürünüdür (Araki ve ark 1994). IRS-1'den bağımsız uyarı iletimi için aday protein 4PS'dir. 4PS, tirozin kinazla ilgili interlökin 4 (IL-4) alıcı proteininin başlıca ara ürünü olarak bilinen 180 kDa'luk bir proteindir (Wang ve ark 1992). Myeloid öncül (progenitör) hücrelerde 4PS, IL-4 ve insüline uyarımı ile birlikte hızlı bir şekilde fosforillenir. P85'e bağlanır ve PI3-kinazı işlevsel hale getirir (Wang ve ark 1993). IRS-1 ve 4PS arasındaki bu fonksiyonel benzerlik 4PS'nin klonlanması ile teyit edilmiştir. Klonlama sonucu 4PS'nin korunmuş birçok tirozin fosforilasyon bölgesine sahip IRS-1 benzeri molekül olduğu ortaya çıkmıştır (Sun ve ark 1995). Bu nedenle 4PS, IRS-2 olarak tekrar düzenlendi. 4PS/IRS-2'nin, hayvanların normal hedef dokularındaki insülin uyarı iletiminin erken adımlarında rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Patti ve ark 1995). IRS-2 cDNA'sının klonlanması, IRS-1 ile yapısal ve işlevsel birçok özelliği paylaştığını ortaya çıkardı (Sun ve ark 1995). IRS-2, IRS-1'den yaklaşık 100 dizi daha uzundur. IRS-1 ve -2 arasındaki aa dizi benzerliği %43 olmasına rağmen, PH ve PTB bölgeleri sırasıyla %65 ve %75 benzerlik göstermektedir (şekil 2.9, 2.11). IRS-1 ve -2'nin COOH uç bölgeleri %35 benzerlik gösteren zayıf korunmuş alanlardır (Sun ve ark 1995). İnsan IRS-2'si 22

potansiyel tirozin fosforilasyon bölgesi içerir, sadece 13ü IRS-1'de korunmuştur (Sun ve ark 1995). Maya iki melez (two-hybrid) analiz yöntemi, IRS-2 proteini üzerinde işlevsel hale gelmiş insülin alıcı proteini ile etkileşim sağlayabilen yeni bir bölgenin olduğunu ortaya koymuştur (Sawka-Verhelle ve ark 1996). Bu bölge IRS-2 proteinin 591 ve 786 dizileri arasında yer almakta ve işlevsel hale gelmiş insülin alıcı proteini β-alt ünitesinin kinaz düzenleyici halka bağlanma bölgesine özgün olarak bağlanmaktadır (Sawka-Verhelle ve ark 1996). Bu nedenle bu bölgeye KRLB (kinase regulatory loop binding domain: kinaz düzenleyici halkasal bağlanma bölgesi) adı verilmiştir. İşlevi için bağlayıcı halkanın içinde üç tirozin fosforilasyon yerine ihtiyaç duyar. Üç tirozin fosforilasyon yeri (Tyr-1146, Tyr-1150, Tyr-1151), KRLB bölgesinin bağlanma niteliğini sağlayan yerlerdir (Sawka-Verhelle ve ark 1996). PTB bölgesi, insülin alıcı proteini ile etkileşimde karar verici işlevini gerçekleştirirken, 591-786 aa bölgesi IRS-2'nin insülin alıcı proteinine bağlanmasında ana bağlayıcı olarak görev yapar (Sawka-Verhelle ve ark 1996). Bu bölge IRS-1'de olmadığından IRS-2'ye ait uyarı-ileti özgünlüğüne yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Sawka-Verhelle ve ark 1996). Ayrıca IRS-1 ve IRS-2'nin farklı doku dağılımı, hücre içi yerleşimi, işlevsel/işlevsizleştirme kinetiğinin farklı seyri ve yokuş aşağı etkileyicileri ile oluşan etkileşimin özgünlüğünden dolayı, IRS-1 ve IRS-2 kendilerine özgü uyarı-ileti yollarını düzenleyebilirler (Giovannone ve ark 2000). Mesela, IRS-1 ve -2'nin hücre içi yerleşimi farklıdır. IRS-1 hücre içi zar bölümünde sitozolden iki kat daha fazla yoğundur. IRS-2 ise sitozolde hücre içi zar bölümünden iki kat daha yoğundur (Inoue ve ark 1998). IRS-2'nin IRS-1'den daha hızlı defosforile olduğu ve geçici olarak PI 3-kinazı aktive ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Inoue ve ark 1998). İşlevsellik kinetiğindeki farklılıklar IRS-1 ve IRS-2 ile iletilen insülin uyarı-ileti yolundaki ayrılığı izah edebilir (Inoue ve ark 1998). IRS-1 ve IRS-2, SH2 bölgesi içeren çeşitli yokuş aşağı uyarı-ileti elementleri ile etkileşim kapasitelerinde farklılıklar gösterirler (White 1997). IRS-1'in PI 3-kinaz, Grb-2, SHPTP-2 ve fosfolipaz Cγ'ya bağlandığı, benzer şekilde IRS-2'nin PI 3-kinaz, Grb-2 ve fosfolipaz Cγ'ya bağlandığı fakat SHPTP-2'ye bağlanmadığı gösterilmiştir (Sun ve ark 1997, White 1997).

IRS-1'deki sekiz tirozin fosforilasyon diziliminin altısı (649, 671, 911, 969, 1242 ve 1303 pozisyonlarındaki dizilimler) IRS-2'de de korunmuştur. P85'in SH2 bölgeleri IRS-2'deki Y608MPM ve Y969MNL dizilimlerine bağlanır (Sun ve ark 1993). IRS-2'deki diğer sekiz YXXM dizilimi tirozin fosforilasyonundan sonra PI 3-kinazın düzenleyici alt ünitesi p85 bağlanır. Grb-2'nin SH2 bölgesi Y911INI dizilimine ve SH-PTP2 Y1241IAI,

Y1303ASI dizilimlerine bağlanır. Bu dizilimler IRS-2'de on dizi daha uzundur. Bu nedenle SH-PTP2'nin kontrolünü değiştirebilirler. Diğer potansiyel tirozin fosforilasyon dizilimleri IRS-1 ve IRS-2'de farklı olduğundan uyarı-ileti sisteminde ayrı roller oynayabilirler (Sun ve ark 1995).

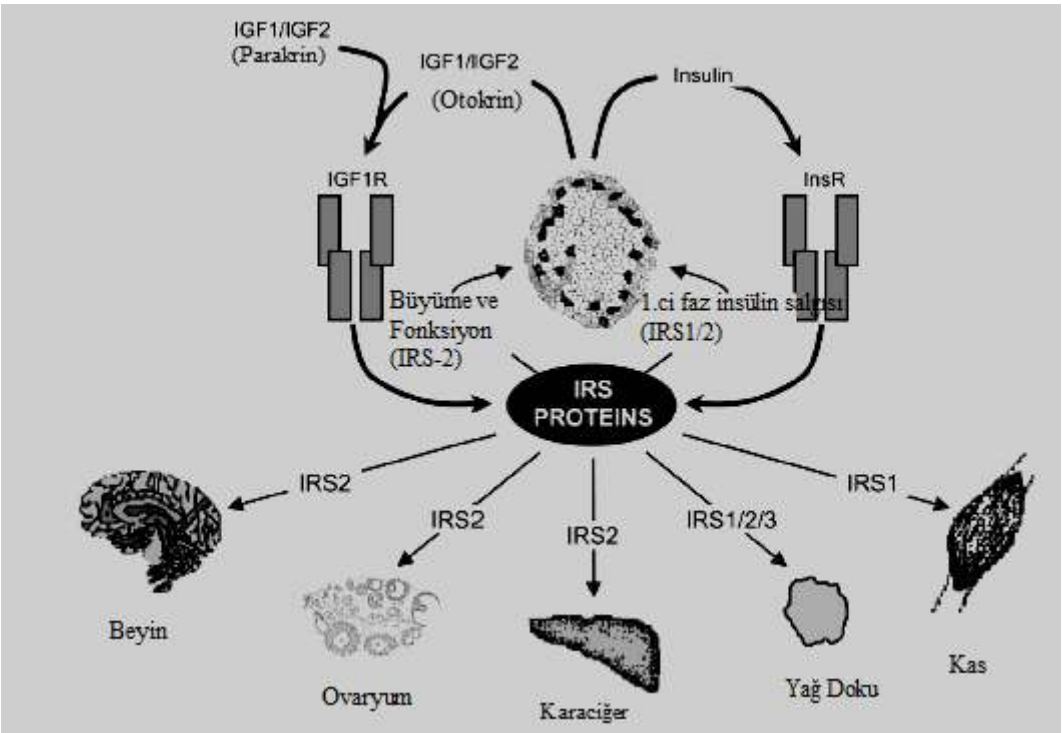
2.3.3.2.B. IRS-2 geni

İnsan IRS-2 geni kromozom 13'ün q34.bölgesine yerleşmiştir. İnsan IRS-2 geni 4.2 kb'lık intron ile ayrılan iki ekzona sahiptir (Vaben ve ark 1999). Ekzon 1 (4.5 kb), 5'kodlanmayan bölge ve iki nükleotidi kayıp açık okuma bölgesi içerirken, ekzon 2 (2.4 kb) açık okuma bölgesinin kaybolan iki nükleotidi, stop kodon ve tek ekzondaki 3' kodlanmayan bölgeden oluşur (Vaben ve ark 1999). İnsan IRS-2'sinin 5' kodlanmayan düzenleyici gen bölgesinin TATA kutucuğu -2190- -2184 nükleotid aralığında yerleşmiştir (Iwamoto ve ark 2002). TATA kutusunun uyuşum dizileri bu gende diğer genlere göre 5' ucunun +1 bölgesinin çok daha uzağında yer almıştır. İnsan IRS-2 geninin özendirici bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanabileceği Sp1, AP2 ve CCAAT kutucuğu vardır (Şekil 2.12) (Vaben ve ark 1999). Özendirici bölge içinde TATA kutucuğu bulunmamaktadır (Slansky ve Farnharm 1996). İnsan insülin alıcı proteini ve fare IRS-1 genlerinin 5'kodlanmayan bölgeleri de CCAAT kutucuğuna sahipken TATA kutucuğundan yoksundurlar (Slansky ve Farnharm 1996). Bu genler bu nedenle hamarat (housekeeping) genler olarak işlevlerini sürdürürler (Slansky ve Farnharm 1996).

2.3.3.2.C. IRS-2 proteininin işlevi

In vivo ve in vitro denemelerde, IRS-1 ve IRS-2'nin uyarı-ileti işlevlerinin farklı olduğu bildirilmiştir (Withers ve ark 1998). Farelerde IRS-2 geninin hedeflenmiş parçalanması, doğumda ılımlı periferal insülin direnci ve β hücresi kütlesinde azalma meydana getirmiştir (Withers ve ark 1998). Bunun sonucunda açlık hiperglisemisinin ilerlediği görülmüştür (Withers ve ark 1998). IRS-1 knockout fare veya hücrelerle yapılan çalışmalarda, IRS-2'nin karaciğer ve pankreatik β hücrelerinde iskelet kası, kahverengi adipositler ve fibroblastlardan daha etkili IRS-1 eksikliğini giderebileceği rapor edilmiştir (Araki ve ark 1994, Bruning ve ark 1997). İnsülin alıcı proteini, IRS-1 ve IRS-2'nin heterozigot null mutasyonlu fare çalışmalarında, IRS-1'in iskelet kası ve yağ dokuda IRS-2 'nin karaciğerde başlıca rol oynadığı bulunmuştur (şekil 2.10) (Kido ve ark 2000). Bu

bulguların hepsi birden IRS-1 ve IRS-2'nin glukoz üretimi, girişi ve insülinin oluşumundan sorumlu olan karaciğer, iskelet kası ve pankreatik β hücreleri gibi dokularda görevlerinin işlevsel olarak değiştirilemeyeceğini göstermektedir (Giovannone ve ark 2000). IRS-2'nin hepatik insülin işlevini ve pankreatik β hücre gelişmesi ve büyümesini kontrol etmede başlıca rol oynadığı görülmüştür (Giovannone ve ark 2000). Aksine iskelet kası ve yağ dokuda, IRS-1 uyarı-ileti silsilesindeki bozuklukları IRS-2 tam olarak giderme yeteğinde olmayabilir (Giovannone ve ark 2000). Böylece IRS-1 ve IRS-2'nin ayrı ifadesinin, kendilerine özgü uyarı potansiyeline yardımcı olabileceği ve canlılık için önemli olabileceği ortaya çıkmaktadır. IRS-1 ve IRS-2'nin bulunduğu doku tipine, büyüme faktörüne ve iki IRS proteininin farklılaşan yapısından dolayı onlara yönlenen elementlere göre uyarı-ileti sistemi değişir (Sun ve ark 1997). Hücre farklılaşmasının normal seviyesine rağmen, insülinle uyarılan Glut4 taşınımı ve glukoz naklinin IRS-2'si olmayan hücrelerde önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Fasshauer ve ark 2000). Uyarı ileti çalışmalarında, IRS-2 ile ilgili PI 3-kinaz havuzunda ve Akt'nin zara geçişinde azalma gösterilmiştir (Fasshauer ve ark 2000). Bu da adipositlerde IRS-2'nin insülinle uyarılan Glut4 taşınımı ve glukoz naklinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Fasshauer ve ark 2000).



Şekil 2.10. IRS-1 ve IRS-2'nin uyarı ileti yollarında etkili olduğu organlar. IRS-1; iskelet kası ve yağ dokuda, IRS-2; karaciğer, ovaryum ve beyindeki uyarı ileti yollarında etkilidir (White 2002).

```
      1               11              21              31              41
51
```
1 MASPPRHGPP GPASGDGPNL NNNNNNNNHS VRKCGYLRKQ KHGHKRFFVL RGPGAGGDEA 60

61 TAGGGSAPQP PRLEYYESEK KWRSKAGAPK RVIALDCCLN INKRADAKHK YLIALYTKDE 120

121 YFAVAAENEQ EQEGWYRALT DLVSEGRAAA GDAPPAAAPA ASCSASLPGA LGGSAGAAGA 180

181 EDSYGLVAPA TAAYREVWQV NLKPKGLGQS KNLTGVYRLC LSARTIGFVK LNCEQPSVTL 240

241 QLMNIRRCGH SDSFFFIEVG RSAVTGPGEL WMQADDSVVA QNIHETILEA MKALKELFEF 300

301 RPRSKSQSSG SSATHPISVP GARRHHHLVN LPPSQTGLVR RSRTDSLAAT PPAAKCSSCR 360

361 VRTASEGDGG AAAGAAAAGA RPVSVAGSPL SPGPVRAPLS RSHTLSGGCG GRGSKVALLP 420

421 AGGALQHSRS MSMPVAHSPP AATSPGSLSS SSGHGSGSYP PPPGPHPPLP HPLHHGPGQR 480

481 PSSGSASASG SPSDPGFMSL DEYGSSPGDL RAFCSHRSNT PESIAETPPA RDGGGGGEFY 540

541 GYMTMDRPLS HCGRSYRRVS GDAAQDLDRG LRKRTYSLTT PARQRPVPQP SSASLDEYTL 600

601 MRATFSGSAG RLCPSCPASS PKVAYHPYPE DYGDIEIGSH RSSSSNLGAD DGYMPMTPGA 660

661 ALAGSGSGSC RSDDYMPMSP ASVSAPKQIL QPRAAAAAAA AVPSAGPAGP APTSAAGRTF 720

721 PASGGGYKAS SPAESSPEDS GYMRMWCGSK LSMEHADGKL LPNGDYLNVS PSDAVTTGTP 780

781 PDFFSAALHP GGEPLRGVPG CCYSSLPRSY KAPYTCGGDS DQYVLMSSPV GRILEEERLE 840

841 PQATPGPSQA ASAFGAGPTQ PPHPVVPSPV RPSGGRPEGF LGQRGRAVRP TRLSLEGLPS 900

901 LPSMHEYPLP PEPKSPGEYI NIDFGEPGAR LSPPAPPLLA SAASSSSLLS ASSPASSLGS 960

961 GTPGTSSDSR QRSPLSDYMN LDFSSPKSPK PGAPSGHPVG SLDGLLSPEA SSPYPPLPPR 1020

1021 PSASPSSSLQ PPPPPPAPGE LYRLPPASAV ATAQGPGAAS SLSSDTGDNG DYTEMAFGVA 1080

1081 ATPPQPIAAP PKPEAARVAS PTSGVKRLSL MEQVSGVEAF LQASQPPDPH RGAKVIRADP 1140

1141 QGGRRRHSSE TFSSTTTVTP VSPSFAHNPK RHNSASVENV SLRKSSEGGV GVGPGGGDEP 1200

1201 PTSPRQLQPA PPLAPQGRPW TPGQPGGLVG CPGSGGSPMR RETSAGFQNG LNYIAIDVRE 1260

1261 EPGLPPQPQP PPPPLPQPGD KSSWGRTRSL GGLISAVGVG STGGGCGGPG PGALPPANTY 1320

1321 ASIDFLSHHL KEATIVKE

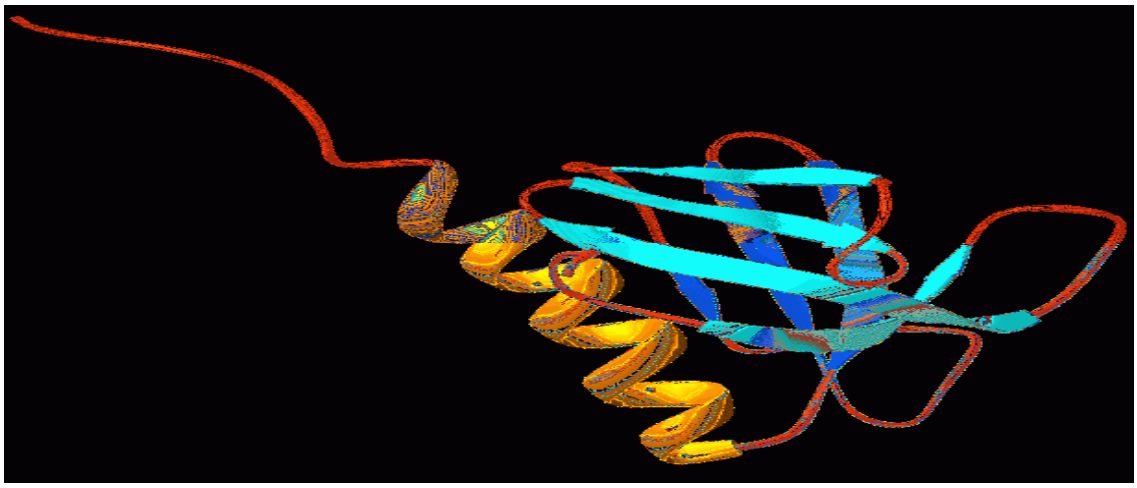
Şekil 2.11. IRS-2 ekzonun kodlanan bölgesinin aminonasit dizisi (kırmızı renkteki diziler PH bölgesini, mavi renkli diziler PTB bölgesini göstermektedir) (http://www.expasy.org).



Şekil 2.12. IRS-2 özendirici (promotor) bölgesinin nükleotid dizisi. DNA'nın her iki dizisindeki transkripsiyon faktörleri SP1 (GGGCGG) ve AP2 (CCSCRGGC) kutuların içinde sırasıyla gösterilmiştir. CAAT kutusunun altı çizilmiştir (Vassen ve ark 1999).

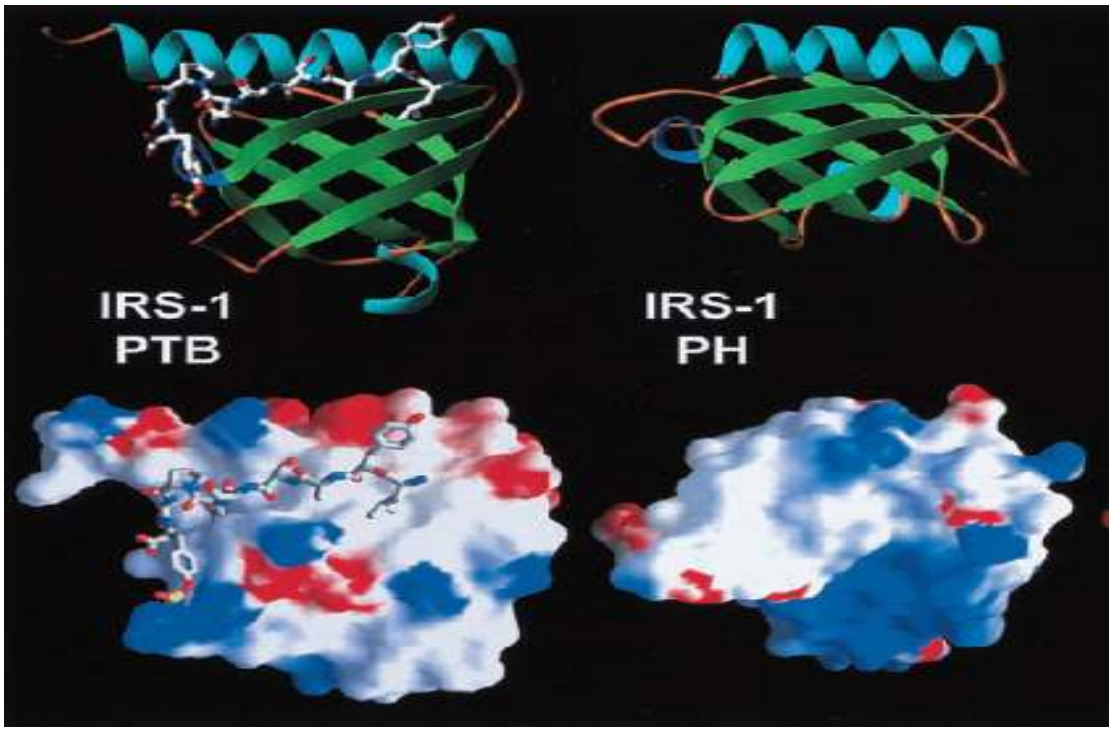
2.3.4.3. Plekstirin homoloji bölgesi (PH):

Plekstrin, plateletlerdeki protein kinaz C'nin başlıca substratıdır (Yoon ve ark 1994). Protein kinaz C iki plekstrin homoloji bölgesi içerir. Bu alan ilk olarak plekstrinde belirlendiğinden dolayı proteinle benzer isme sahiptir (Yoon ve ark 1994). PH bölgeleri 100 aa dizisinden oluşur ve hücre içi uyarı-ileti sistemi ile ilgili olan birçok proteinde bulunur. Heterotrimerik G proteinlerinin beta/gama alt ünitesi, fosfotidil inositol-4,5-bisfosfat (PIP2,lipid), fosforillenmiş serin/treonin dizileri ve zarla bağlandıkları gösterilmiştir. Proteinlerin uyarı-ileti ve hücre iskeleti sınıflarında yeni PH bölgeleri bulunmuştur (Gibson ve ark 1994). Akt/Rac ailesi gibi Ser/thr protein kinazlar (Bellacosa ve ark 1991), beta-adrenerjik alıcı proteini kinazları (Touhara ve ark 1994), PKC'nin mu izoformu ve tripazonomal NrkA ailesi (Johannes ve ark 1994), Btk/Itk/Tec alt ailesine ait tirozin protein kinazlar (Johannes ve ark 1994), IRS-1 (Yenush ve ark 1996) ve dinamin, kinesin benzeri protein unc-104, spektrin beta zinciri, sintrofin (Adams ve ark1993) gibi hücre iskeleti proteinlerinde PH alanı vardır. Plekstrinin N uç bölgesi 113 aa dizisi uzunluğundadır. Karboksil ucu α-heliksindeki tek bir triptofan dizisi tüm PH bölgelerinde bulunur (Gibson ve ark 1994). Molekülün temel yapısı karboksil ucunda uzun bir α-heliks ile 7 stranddan ibaret antiparalel β tabakasından oluşur (şekil 2.13) (Musacchio A ve ark 1993). Bölgenin amino ve karboksil ucu, bir yüzünde birbirine oldukça yakındır. Bu özellik SH2 ve SH3 gibi diğer hücre içi protein alanlarında yaygındır (Gibson ve ark 1994). PH bölgeleri pozitif yüklü bağlanma cebi içerir. Bu bölgelerin fosfolipidleri bağladığı rapor edilmiştir (Lemmon ve ark 1995). Fosfotidil inositol difosfat ve fosfatidil inositol trifosfat ile PH bölgelerinin etkileşimi, onların işlevini anlamada ortak bir fikir sağlamasına rağmen, PH bölgelerinin hepsi bu fosfolipidlere bağlanmaz (Rameh ve ark 1997).



Şekil 2.13. PH bölgesinin şematik yapısı (açık ve koyu mavi yapılar 7 strandlı antiparalel β tabakası, α heliks yapısı sarı renkte) (Yoon ve ark 1994).

IRS proteinlerinin üyeleri PH bölgesini takiben NH2 ucunda PTB bölgesini içerir. PH ve PTB bölgelerinin yapıları oldukça benzerdir (şekil 2.14). IRS-1, 7. ve 20. aa dizileri arasında PH bölgesini içerir. Bu bölge IRS-1'in sıçan, fare ve insanda yüksek oranda korunmuş bölgesidir (Sun ve ark 1991). PH bölgesi insülin, IGF-1 ve IL-4 alıcı proteinlerinde ortak motifi ile IRS-1'in etkileşimine aracılık eder (Sun ve ark 1991).



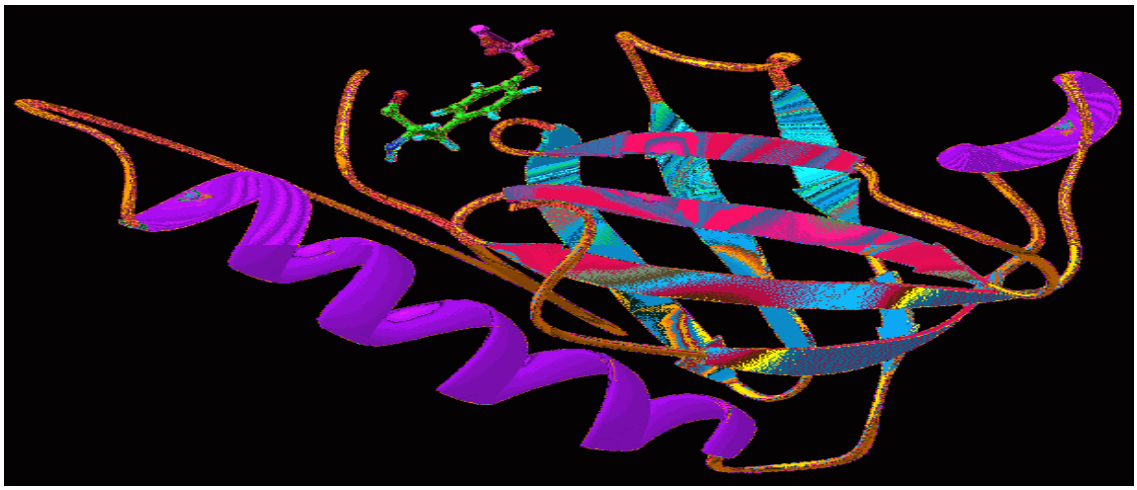
Şekil 2.14. IRS-1 PTB ve PH bölgelerinin ribbon ve yüzey potansiyel diyagramları (De-Paganon ve ark 1999).

Bu alıcı proteinlerin her biri uyarı iletiminde ihtiyaç duyulan LxxxxNPxYxSxSD dizilimini içerir (White ve ark 1988). IRS proteinlerindeki PH bölgeleri için ligandlar belirlenmemiştir (Eck ve ark 1996). PH bölgesi, insülin uyarımı esnasında IRS-1'in etkili tirozin fosforilasyonu için elzemdir, PH bölgesinin çıkarıldığı çalışmada insülinle uyarılan IRS-1'in tirozin fosforilasyonunu önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Yenush ve ark 1996). PH bölgelerinin plazma zarını hedefleme ve insülin alıcı proteini tarafından ligandla uyarılan tirozin fosforilasyonu için önemli olduğu gösterilmiştir (Razzini ve ark 2000). IRS-1'in PH ve PTB bölgeleri plazma zarını hedefleyen potansiyel bölgelerdir (Jacobs ve ark 2001). PH bölgeleri, zarlar ile uyarı-ileti proteinlerinin ilişkisini ilerletir (Pawson 1995). PH bölgesinin NH2 ucu, zar ve insülin alıcı proteinlerini hedefleyerek IRS proteinleri ile etkileşime girmesini sağlar (White ve ark 1998). IRS-1 ve IRS-2 PH bölgesi arasında %69 benzerlik vardır ve 109 aa içerir (şekil 2.9, 2.11) (Sun ve ark 1995).

2.3.4.4. Fosfotirozin bağlanma bölgesi (PTB):

Fosfotirozin bağlanma veya fosfotirozin etkileşim bölgesi (PID) ilk olarak Shc proteininde belirlenmiştir (Blaikie ve ark 1994). Shc, tirozinle fosforillenmiş büyüme faktör alıcı proteinlerine bağlanabilen bir alandır (Blaikie ve ark 1994). Shc PTB bölgesi bulunduğundan beri, birçok proteinin PTB bölgeleri içerdiği belirlenmiştir. Bu proteinler başlıca iki gruba ayrılırlar. PTB bölgesi içeren ilk grup, Shc PTB bölgesi ile dizi benzerliğine sahiptirler. İkinci grup, IRS proteinleri gibi proteinleri içerir. Bu gruptakilerin Shc PTB bölgesi ile dizi benzerliği sınırlıdır fakat bağlanma karakteristikleri benzerdir (Gustafson ve ark 1995). Shc PTB bölgesi, büyüme faktörü alıcı proteinlerinin NPXpY motifine (N-asparajin, P-prolin, X-herhangi bir aa, pY-fosfotirozin) bağlanır ve pY-5'de hidrofobik diziye sahiptir (Trub ve ark 1995). IRS-1 PTB bölgesi uzun bir α-heliks ile şapkalanan 7 katmanlı β-yapraklı yapısına sahiptir (şekil 2.15) (Eck ve ark 1996). Bu katlanma, uyarı ileten proteinlerin çoğunda bulunan bir protein yapısı olan PH bölgelerinde de bulunmuştur. IRS-1 PTB bölgesi 112 aa dizisi uzunluğundadır. β yaprağın bir yüzü antiparalel β-tabakasında düzenlenen β1-β4 ile şekillenir (Eck ve ark 1996). β1 ve β2 strandları uzun ve kavisli bir yapıya sahiplerdir ve β5-β7 yüzünün şekillenmesi için çevrelerinde dolanırlar. β1 ve β2 dizileri ile ilişkili polipeptid segmentleri, β yaprağın üst kısmında kısmen şapka görevi yapan α-heliksin bir-buçukluk dönüşünde şekillenirler (Eck ve ark 1996). Diğer β strandları ve β7 ve C–ucu heliksi arasındaki etkileşim oldukça

kısadır. A 310 helikal döngüsü β4 veβ5 dizileri ile ilişki kurar. Bu ilişki fosforillenmiş NPXpY peptidlerinin tanınması için önemli olabilir (Eck ve ark 1996).



Şekil 2.15. PTB bölgesinin şematik yapısı (Pembe ve mavi renkte olan β tabakası, mor renkli α-heliks ile şapkalanmıştır) (www-nmr.cabm.rutgers.edu).

İnsülin alıcı fosfopeptidi, PTB bölgesinin yüzeyindeki L-şeklindeki yarığı doldurur. β5 dizisi; C-uç heliksi, β4 ve β5 strandları ile ilişki kuran 310 dönüşü ile tanıma bölgesi şekil alır (Eck ve ark 1996). Ac-LYASSNPApY-NH2 peptidinin 9-dizisi IRS-1 PTB bölgesi ile ilişki kurar. Peptidin amino ucu dizileri (pY-8 – pY-3) β strand formundadırlar. NPApY peptidinin C-ucu dizileri tip 1 β dönüşlüdür. Fosfotirozin iki arjinin dizisi (Arg-212 ve Arg-227) ile primer olarak düzenlenir. pY-3'deki arjininin hem peptid içi hem de molekül içi hidrojen bağlarının yan zincir formlarına bağlanması için elzem olduğu bildirilmiştir (Eck ve ark 1996). pY-8'deki lösinin insülin alıcı proteinine yüksek yatkınlık ile bağlanmaktadır (Gustafson ve ark 1995). IRS-1 ve Shc PTB bölgeleri ile tanınan bölgeler ortak uyuşum dizilimi NPXpY'ye sahiplerdir. pY-3, pY-2 ve pY-1 pozisyonlarının dizisi ve benzerliği bağlanma için önemlidir (Eck ve ark 1996).

IRS PTB bölgesi değişebilen 40 dizi bölgesi ile IRS PH bölgesinden ayrılır (Sun ve ark 1995). PTB bölgesi IRS-1 ve IRS-2 arasındaki %75 benzerliği (şekil 2.9, şekil 2.11) ile 160 aa'lik bir bölge içerir (Sun ve ark 1995).

2.4. İnsülin uyarı ileti yolu

İnsülin, kan glukoz seviyesi kararlılığını (homeostasis) kazandıktan sonra devam ettirebilmek için kan glukoz seviyesinin üzerindeki glukozun organ ve dokularda glikojen veya lipid olarak depolanmaya yönlendiren bir peptid hormonudur (Lewin 2004). Lipid dengesini düzenleme, yağ ve karaciğerde lipogenesisi uyarma ve yağ ve kasta lipolisisi inhibe etmede de önemli rol oynar.

Uyarı-ileti yolunun protein-protein etkileşimindeki genel mekanizması, proteinin bir bölgesinin ikinci proteindeki daha kısa dizilim tarzını tanımasıdır (Lewin 2004). Hedef dizilim tarzının dikkat çeken özelliği onun içerdiği aminoasit dizilim sıralamalarıdır (Lewin 2004). Fosfo-tirozin dizileri böyle dizilimlerin bileşenleridir. Hedef dizilimlerin diğer yaygın özelliği polipeptid zincirinde karakteristik döngülere neden olan prolin aminoasit içeriğidir (Lewin 2004).

Birçok zarlar arası uyarımın uyarı ileti mekanizması ile bütünleşmesi; sinir sisteminin gelişmesi, bağışıklık sistemi hücreleri arasında ilişki, farklılaşmaya uğrayan hücrelerin gelişmesi ve metabolik kontrol devam ederken önemlidir (Hunter 1997). Tirozin fosforilasyonu, uyarı-ileti silsilesinin erken evrelerinde alıcı protein ve enzimlerin işlevini kontrol ederek ve işlevsel hale gele alıcı protein ve bağlanma proteinleri çevresindeki çok bileşenli uyarı-ileti bileşenlerinin birbirleriyle ilişkilendirlmesini ayarlayarak bu işlemlerin birçoğunda anahtar rol oynar (Pawson 1995). İnsülin uyarı-ileti silsilesi esnasında, IRS proteinleri birçok yokuş aşağı uyarı-ileti moleküllerini işlevsel hale geitrmek için insülin alıcı proteinlerine bağlanan özel bağlanma proteinleri olarak fonksiyonlarını sürdürürler (White 1998).

Tirozin kinaz alıcı proteinine insülinin bağlanması ve alıcı proteini aktive etmesiyle, insülinin biyolojik işlevleri başlar. Monomerik alıcı proteinlere ligand bağlanması alıcı protein dimerizasyonuyla sonuçlanır. Tirozin kinaz alıcı proteinlerinin işlevinde ilk adım için dimerizasyon gereklidir (Van der ve ark 1994, Heldin 1995). İnsülin alıcı proteini ve IGF-1 alıcı proteini gibi bazı tirozin kinaz alıcı proteinleri ligand yokluğunda da dimerik formda bulunurlar. Alıcı proteininin α-altünitesinin özgün bölgelerine insülin bağlandığında, alıcı proteinde hızlı bir yapısal değişiklikle tirozin kinaz alanı işlevsel hale gelir (Gustafson ve Rutter 1990).

Ligand bağlanması ve alıcı protein dimerizasyonunda, dimerin bir yarısının kinaz alanı alıcı protein dimerinin diğer yarısı üzerindeki tirozin dizilerini fosforiller (Nystrom

ve Quon 1999). Bu iki taraflı transfosforilasyon, alıcı protein otofosforilasyonu olarak bilinir ve alıcı proteininin katalitik işlevinde artış meydana gelir. Tirozin kinaz alıcı proteininin işlevsel hale gelmesi, uyarı-ileti yolunu ilerleten hücresel substratların tirozin fosforilasyonuna neden olur (Nystrom ve Quon 1999). Alıcı protein otofosforilasyonu, alıcı protein üzerindeki fosfotirozin dizilimleri ve yokuş aşağı molekülleri üzerindeki src homoloji-2 (SH2) bölgeleri arasındaki etkileşimler yoluyla diğer uyarı-ileti moleküllerinin alıcı proteinle bağlantı kurmasını sağlar (Nystrom ve Quon 1999).

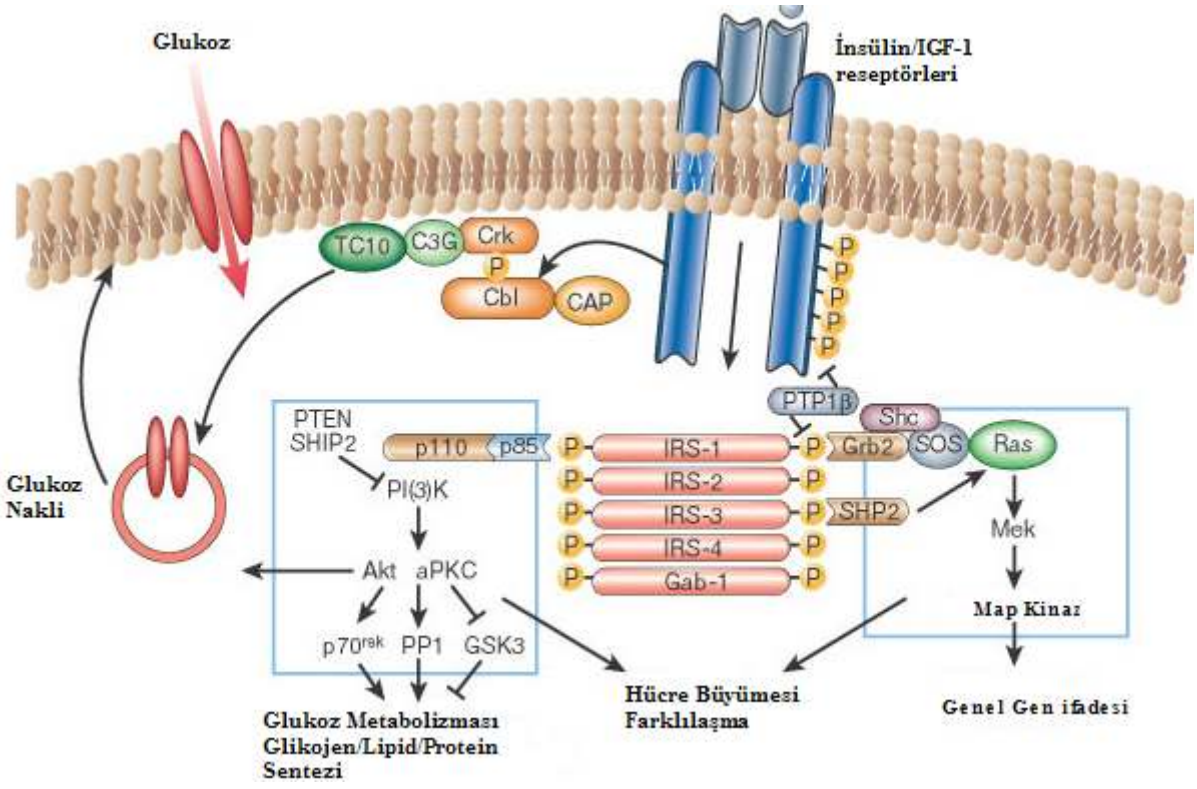
Uyarı-iletimiyle ilgili olan çeşitli sitoplazmik proteinlerde bulunan iki dizilim tarzı bölgeleri uyarı-ileti yolunda yokuş aşağı ve yokuş yukarısındaki bileşenlere proteinlerin bağlanmasında kullanılır. Bu alanlara SH2 ve SH3 ismi verilir (Lewin 2004). C-Src sitosolik tirozin kinazlarda orijinal olarak tanımlandıkları için bu isimler kullanılır. Bazı proteinler, fosfoproteinlere bağlanma yatkınlığını arttıran ve farklı fosfoproteinlere bağlanmayı kolaylaştıran birçok SH2 alanına sahiptir. Bir alıcı protein çeşitli hedef proteinlerinin işlevsel hale gelmesini kolaylaştıran farklı SH2 alanı bağlama bölgelerini içerir (Lewin 2004). SH3 alanları prolinle zengin dizilere yüksek yatkınlık ile bağlanırlar (Van der Geer ve ark 1994).

SH2 bölgesi diğer proteinlerin hedef bölgesi ile etkileşime giren yaklaşık 100 aminoasitlik bir bölgedir (Lewin 2004). Diğer proteinlerin bu hedef bölgesine SH2-bağlanma bölgesi ismi verilir (Lewin 2004). Tirozin kinaz alıcı proteini işlevsel hale geldiğinde sitosolik kuyruğundaki bir bölge otofosforilasyona uğrar. Fosforilasyon SH2-bağlanma bölgesine geçer. Böylece SH2 alanıyla uyumlu bir protein sadece alıcı protein fosforillendiğinde alıcı proteine bağlanır.

Fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K), büyüme faktörü alıcı proteinine bağlanan protein 2 (GRB-2), SH2 içeren fosfataz-2 (SHP-2), GTPazı işlevsel hale getiren protein (GAP), fosfolipaz C-γ (PLC-γ) gibi birçok molekül SH2 alanı içerir (Nystrom ve Quon 1999). Bu moleküller tirozin kinaz alıcı proteini uyarı-ileti yoluyla alakalı ara ürünlerdir. Alıcı proteinlerin fosfotirozin dizisinin karboksil ucundaki üç aminoasit dizisi ile belirlenen dizilimleri belirli SH2 alanları ile etkileşimde özgünlük sağlar (Songyang ve ark 1993, Songyang ve ark 1994).

IRS'ler, Shc ve GAB-1 insülin alıcı proteini ve yokuşaşağı SH2 alanı içeren uyarı-ileti molekülleri arasında bağlantı sağlar (Myers ve White 1996). IRS ailesi üyelerinin NH2 ucu PH ve PTB bölgesi insülin alıcı proteini ile etkileşimlere aracılık etmede

önemlidir (Myers ve White 1996, Sun ve ark 1995, Lavan ve ark 1997). PTB bölgesi, insülin alıcı proteini β-altünitesinin zara giren bölgesindeki NPEY motifinin fosforillenmiş tirozin 960 kısmına bağlanır (Myers ve White 1996, Sawka-Verhelle ve ark 1997). IRS proteinlerinin COOH-uç kısmı insülin alıcı proteini ile fosforilasyona uğrayan birçok tirozin içeren motifleri içerirler ve SH2 alanı içeren proteinler için bağlanma bölgeleri olarak görev yaparlar (White 1998). Örneğin, PI3K'nın p85 düzenleyici altünitesindeki SH2 alanlarına bağlandığı bilinen birçok YXXM motifi tüm IRS ailesi üyelerinde vardır (White 1998). IRS-1 p85'in SH2 alanı ile etkileşime girdiği en azından dört bölgeye sahiptir: Y608MPM> Y939MNM>Y987MTM ve Y460ICM (Sun ve ark 1993). Tirozinle fosforillenmiş IRS-1 PI-3 kinazı aktive eder (Myers ve ark 1992).



Şekil 2.16. İnsülin uyarı-ileti yolunun temel bileşenleri. İnsülin ile insülin alıcı proteininin işlevsel hale gelmesi alıcı proteininin otofosforilasyonunu uyarır ve yokuşaşağı bulunan IRS proteinleri gibi proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu proteinler kendi kendilerine fosforillenirler ve SH2 bölgesi içeren proteinler için daha fazla bağlanma bölgesi sağlarlar. Bu olaylar PI 3-kinaz, CAP/Cbl/Tc10 ve ERK yollarının işlevsel hale gelmesine neden olur ve insülinin farklı etkileriyle sonuçlanan uyarıların iletimine izin verir (Saltiel ve Kahn 2001).

2.4.1. SH2 adaptör proteinleri

SH2 adaptör proteinleri diğer SH2 bölgeleri ile tirozinle fosforillenmiş proteinleri tanır ve bağlanır (Virkamaki ve ark 1999). Bu proteinler enzimatik aktiviteye sahip değillerdir fakat protein protein etkileşimleri ile ligand uyarısını iletirler. PI 3-kinazın düzenleyici alt ünitesi adaptör proteinlerin en iyi bilinen örneğidir (Virkamaki ve ark 1999). Bununla birlikte potansiyel olarak birçok önemli adaptör protein de belirlenmiştir (Virkamaki ve ark 1999). Bunların birçoğu onkogenlerin hücresel homoloğu olarak belirlenmiştir ve üç harfli kısa ad ile (Crk ve Nck gibi) isimlendirilirler (Virkamaki ve ark 1999).

2.4.1.1. PI 3-kinaz

PI 3-kinaz IRS-1 ile ilişki kuran ilk SH2 proteini olarak bulunmuştur (Sun ve ark 1991). Hücresel zarlarda bulunan fosfatidilinositollerin fosforilasyonundan sorumlu110 kDa'luk katalitik altünite (p110) ve insülin alıcı proteini substratlarına bağlanmadan sorumlu 85 kDa'luk düzenleyici altünitelerinden (p85α) oluşur (Sun ve ark 1991). Düzenleyici altünitesi iki SH2 alanı içerir. Düzenleyici altünitenin en azından sekiz farklı izoformları vardır (Sun ve ark 1991). Altı tanesi p85α geninin alternatif kaynaşma yolu ile oluşmuştur. P85β (Otsu ve ark 1991)ve $p55^{PIK}$ (Pons ve ark 1995) ayrı genlerden ifade edilmişlerdir. Bu düzenleyici altünitelerin her biri insüline cevaben IRS proteinleri ile birleşir ve IRS proteinlerinden PI 3-kinaz aktivasyonuna uyarıyı iletir (şekil 2.16). Her bir düzenleyici altünitesi IRS proteinlerine özgü yatkınlık ile bağlı özgün bir işleve ve PI 3-kinaz işlevini düzenleme yeteneğine sahiptir (Virkamaki ve ark 1999).

PI 3-kinaz; glukoz girişi, genel ve büyümeye özgü protein sentezi ve glikojen sentezi gibi insülinle düzenlenen birçok metabolik işlemde önemli bir rol oynar (White 1998). IRS-1'in fosforillenmiş YMXM motifine p85'in SH2 alanının bağlanması ilişkili katalitik alanı aktive eder (Backer ve ark 1992). IRS-1 ve IRS-2 dokuz YMXM motifi içerir (White 1998). Bu motifler PI 3- kinaz için ideal bağlanma bölgeleridir (White 1998).

Baskın negatif mutantlar kullanılarak, PI 3-kinaz işlevinin baskılanması insülinle uyarılan glukoz girişini bozduğu ve plazma zarına GLUT4 taşınımını engellediği bildirilmiştir (Hara ve ark 1994). Antilipolisiz, yağ asidi sentezininuyarılması, asetil CoA-karboksilaz, glikojen sentaz, Akt fosforilasyonu, glikojen sentaz kinaz 3β inaktivasyonu, protein sentezi ve DNA sentezinin uyarımı gibi insülinin diğer hücresel etkileri de PI 3-

kinaz baskılanması ile engellenir (Inoue ve ark 1998). Diğer büyüme faktörlerine zıt olarak insülin alıcı proteini PI 3-kinaza doğrudan doğruya bağlanmaz, IRS proteinleri gibi bağlanma proteinlerini kullanır (Inoue ve ark 1998). Bunun sonucunda diğer büyüme faktörlerinden farklı olarak PI 3-kinaz işlevsel hale gelir. İn vivo insülin uyarısı, PI 3-kinaz ürünlerini diğer hormonlardan daha fazla oluşturur (Clark ve ark 1998).

2.4.1.2. Grb2

Grb2 en iyi bilinen SH2 adaptör proteinlerinden birisidir. SH3-SH2-SH3 alan yapısına sahiptir ve 27 kDA'dur (Lowenstein ve ark 1992). Grb2, plazma zarına bağlı Ras'a bağlanmak için guanin nukleotid değişim faktörü olan Sos ile etkileşime girer (Furman ve ark 1986). Grb2'nin IRS proteinlerine bağlanması ile GTPaz işlevsel hale gelerek Sosu Ras'a bağlar (şekil 2.16) (Skolnik ve ark 1993). Bu olay MAPK silsilesi olarak bilinen serin/treonin kinaz silsilesinin sonraki aktivasyonuna neden olur (Skolnik ve ark 1993). Bu silsile plazma zarından nukleusa uyarıyı iletir ve mitogenesiz için önemli bir uyarı-ileti yoludur (Skolnik ve ark 1993). Büyüme faktörü alıcı proteinlerinin uyarı-ileti yollarının çoğunda, Grb2 fosforillenerek Shc substratının SH2 bölgesine ve alıcı proteininin tirozin dizisine bağlanır. İnsülin uyarımını takiben Grb2 hem IRS proteinlerine hem de Shc'ye bağlanır. Yolların hangisinin Grb2'nin aktivitesi için daha önemli olduğu açık değildir (Skolnik ve ark 1993). Grb2/Sos kompleksinin insüline cevaben plazma zarına sıkı bir şekilde bağlanmadığı bilinmektedir. Diğer büyüme faktörlerine bağlı uyarı-ileti yolları ile karşılaştırıldığında, Grb2'nin insülinin mitojenik etkilerine nispeten zayıf olarak yardımcı olduğunu düşündürmektedir (Virkamaki ve ark 1999).

2.4.1.3. Crk ve Nck

IRS proteinleri diğer adaptör proteinler gibi görevlerinin ne olduğu yeni çözülen proto-onkogenlere de bağlanır. Crk, bir onkogen ürünü v-Crk olarak belirlenmiştir (Mayer ve ark 1988). v-Crk'nin hücresel homoloğu Crk-I (SH2-SH3 alanı yapısında) ve Crk-II (SH2-SH3-SH3) olarak bilinir (Mayer ve ark 1988). Bu hücresel homologlar tek bir genden alternatif kaynaşma ile oluşmuşlardır (Mayer ve ark 1988). Crk'nın p130cas ve paxillin gibi tirozinle fosforillenmiş proteinler ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Sakai ve ark 1994). Crk'nın aynı zamanda insüline bağımlı yolakta IRS-1 ile de bağlandığı gösterilmiştir (Beitner-Johnson ve ark 1996). Crk guanin nukleotid değişim faktörleri Sos

ve C3G'ye bağlanmak için SH2 alanlarını kullanır (şekil 2.16). C3G c-Jun kinazı aktive ederek transformasyonunu indükler (Tanaka ve ark 1997).

Nck, SH3-SH3-SH3-SH2 bölgesine sahip 47-kDa'luk çokyönlü uyum proteinidir. Nck; IRS-1 (Lee ve ark 1993), birçok farklı tirozin kinaz, birçok serin/treonin kinaz ile ilişki kurar (Hu ve ark 1995). Nck'nın aşırı ifadesi hücrelerin transformasyonuyla sonuçlandığından, kinazlar ve Sos ile etkileşime girerek IRS proteinlerinden mitojenik uyarıları iletebilir.

2.4.1.4. SH2 enzimleri

SH2 enzimleri SH2 bölgeleri yoluyla tirozinle fosforillenmiş proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin birçoğu Fyn, c-Cbl ve Csk gibi mitogenezi düzenleyen protein kinazlar ve proto-onkogenlerin bir ailesine aittir. IRS proteinlerinin diğer SH2 alan partnerleri PI 3-kinaz aktivitesini (SHIP) veya bu substratların defosfrilasyonunu yaparak tirozin fosforilasyonunun (SHP-2) seviyesini düzenleyebilir. Bu SH2 enzimlerinin herbirinin katalitik aktivitesi fosforillenmiş IRS proteinlerine bağlandığında artar.

2.4.1.5. Fyn/Cbl/CAP bileşeni

SH2 bölgesi ile diğer fosfotirozin proteinlerine bağlanarak işlevsel hale getirebilen Fyn, bir sitoplazmik tirozin kinazdır (Mastick ve Saltiel 1997). Fyn insülin alıcı proteini ile doğrudan doğruya işlevsel hale gelmez, IRS-1 ve diğer insülin alıcı proteini substratı c-Cbl'nin etkileşimi ile işlevsel hale gelir (Mastick ve Saltiel 1997). Cbl proteini PTB bölgesine sahiptir ve SH2 adaptör proteinleri olan Grb2, Crk ve PI 3-kinazın p85 altünitesine bağlanır (Mastick ve Saltiel 1997). Tirozinle fosforillenmiş c-Cbl insülin uyarımıyla Fyn'e bağlanır ve insülin uyarımından sonra kaveol ismi verilen plazma membranının küçük girintilerine yerleşir (Mastick ve Saltiel 1997). Kaveolde bulunan kaveoilin proteininin fosforilasyonundan sorumlu kinazlardan birisi Fyn'dir (Mastick ve Saltiel 1997). Kaveolinin iki izoformunu fosforile etme yeteneğindeki tek hormon insülindir, diğer büyüme faktörlerine cevaben fosforillenme olmaz (Mastick ve Saltiel 1977). C-Cbl ile ilişkili protein (CAP), 3 tane ardı ardına sıralanmış SH3 alanına sahiptir ve insüline cevap veren hücre tiplerinde özgün olarak ifade edilir (Ribon ve ark 1998). CAP C-Cbl ve insülin alıcı proteini ile ilişkilidir (Ribon ve ark 1998).

2.4.1.6. Csk

Sitoplazmik tirozin kinaz olan (COOH uç Src kinaz) Csk, tirozin fosforilasyonu ile Src tipi kinazları inaktive eder (Liu ve Pawson 1994). Csk'nın IRS-1'e SH2 bölgesi ile bağlandığı ve insüline bağlı yolakda yerel yapışkan kinazın (fokal adhezyon kinazın; FAK) defosforilasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Tobe ve ark 1996). FAK hücre-hücre etkileşimi, integrinin hücre-hücre dışı matriks etkileşimi ve diğer büyüme faktörü uyarı-ileti yolu için anahtar ara metabolitlerden biridir (Tobe ve ark 1996). Csk'nın insülin uyarı-ileti yolunda FAK işlevini değiştirerek hücre iskeleti bileşenlerinin insülinle uyarılan yeniden düzenlenmesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Baron ve ark 1998).

2.4.1.7 SHIP

PI3-kinaz aktivasyonu PIP2 ve PIP3'ü meydana getirir (Cohen ve ark 1997). Bu ürünlerin serin/treonin kinaz Akt/PKB ve onların aktivatörleri PDK1 gibi yokuşaşağı moleküllerinin PH bölgelerine bağlanarak, insülin ve diğer büyüme faktörlerinin bazı biyolojik cevapları için ikincil aracı olarak görev yaptıkları düşünülmektedir (Cohen ve ark 1997). SHIP (SH2 içeren inositol 5-fosfataz; SH2-containing inositol 5-phosphatase) 145-kDa'luk bir proteindir (Erneux ve ark 1998). PIP4 ve PIP3'ün 5'-fosfatı için özgün fosfataz olarak belirlenmiştir (Erneux ve ark 1998). PIP3'ün insülinin PI3-kinaza bağlı biyolojik işlevlerinde başlıca aracı olduğu bildirilmiştir (şekil 2.16) (Vollenweider ve ark 1999). SHIP, SH2-fosfataz-NPXY-NPXY prolince zengin olan yapısı ile birçok etkileşim alanı içerir. İnsülin, büyüme faktörleri ve sitokinler ile hücrelerin uyarımını takiben SHIP tirozinle fosforillenir, daha sonra Shc'nin PTB alanına bağlanır. SHIP'nin eritropoietine cevaben IRS-2 ile ilişki kurduğu gösterilmiştir (Verdier ve ark 1997).

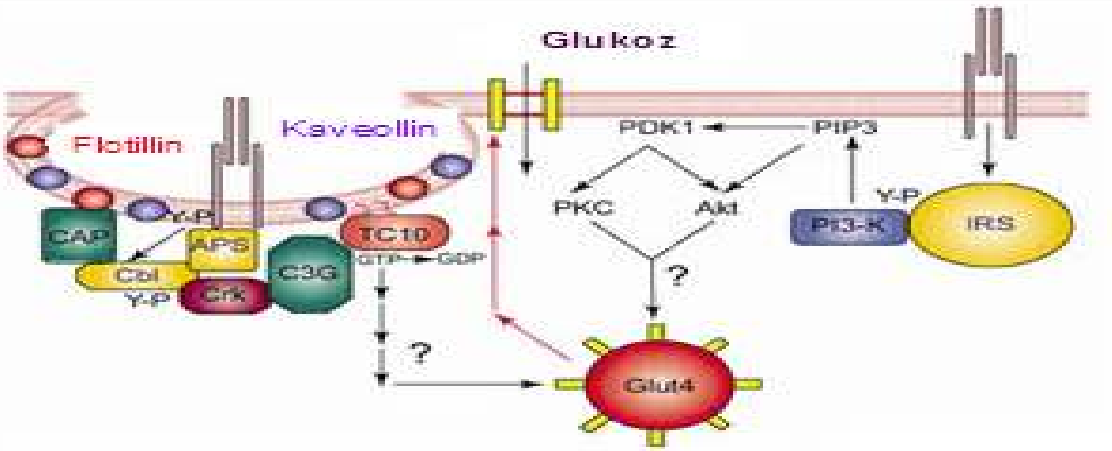
2.4.1.8 *Fosfotirozin fosfataz, SHP2*

SHP2 memeli hücre ve dokularında ifade edilen SH2 içeren tirozin fosfatazdır (Freeman ve ark 1992). EGFr, PDGFr ve c-kit gibi birçok büyüme faktörü alıcı proteini SHP2'deki SH2 bölgelerine özgün olarak bağlanır (Feng ve ark 1993). Fosforillenmiş SHP2 Grb2-Sos kompleksi ve işlevsel hale gelmiş PDGFr arasında adaptör molekül olarak görev yapar (Li ve ark 1993) (şekil 2.16). Bu alıcı proteinlerle etkileşim esnasında, SHP2 tirozinle fosforillenmiştir. SHP2 aynı zamanda IL3 (interlökin 3) ve granulosit/makrofaj koloni uyaran faktörü de içine alan birçok non-reseptör tirozin kinazlar için bir hedeftir

(Welham ve ark 1994). SHP2'nin insülin uyarı-ileti yolunda elzem bir bileşen olduğu bildirilmiştir. İnaktif SHP2 insülinle uyarılan MAP kinaz ve c-fos transkripsiyonunu baskılar (Yamauchi ve ark 1995). İnsülin uyarımı esnasında, IRS-1 ve IRS-2'nin COOH ucunun sonlarına doğru iki tirozin dizisine SHP2 bağlanır (Eck ve ark 1996). SHP2 insülin alıcı proteininin düzenleyici halkasındaki fosforillenmiş Tyr1146'ya da bağlanır (Kharitonenkov ve ark 1995). Bu da insülin alıcı proteini ve IRS-1 arasında oldukça kararlı bir bağlantı sağlayabilir. Bu ilişki insülinle uyarılan glukoz girişi sırasında da bir rol oynayabilir (Kharitonenkov ve ark 1995). SHP2, insülin uyarımı esnasında 115kDa'luk bir proteine de bağlanır (Eck ve ark 1996). Plazma zarında yerleşen bu protein YXX(LNI) dizilimine sahiptir ve diğer tirozin kinaz alıcı proteinleri ve insülin alıcı proteini için doğrudan doğruya substrat olabilir (Yamao ve ark1997). Çeşitli bağlanma proteinleri ile SHP2'nin ilişkisi, hücre içindeki çeşitli bölgelerde bu fosfatazın yerleşmesine neden olur. SHP-2'nin aşırı ifadesi Ras/MAP-kinaz yolunun insülinin işlevsel hale gelmesi gibi hücre adhesyonu ve göçünü sağlar (Xiao ve ark 1994). IRS-1 ve IRS-2 ile insan insülin alıcı proteininin beraber ifadesi SHP2'nin insülinle uyarılmış fosforilasyonunu arttırır (White 1997). Alıcı protein düzenleyici halkasındaki Tyr1146'ya bağlanma insülin alıcı proteini ile etkileşimi kolaylaştırır. SHP2'nin fosforilasyonu fosfataz işlevselliğini daha fazla sağlayabilir ve diğer yokuşaşağı uyarı-ileti moleküllerine bağlanma bölgesi sağlayabilir (White 1997).

2.4.2. PI 3-kinaz/Akt Yolu

PI 3-kinaz insülinin metabolik ve mitojenik işlevlerinde önemli bir rol oynar. İşlevsel haldeki PI3K, PI(3)P, PI(3,4)P2, PI(3,4,5)P3 oluşturmak için PI ara ürünlerine özgün fosforilasyonu gerçekleştirir (Avruch 1998). İkincil aracılar olarak görev yapan bu fosfolipidler PI3K'ya bağlı serin/treonin kinazları (PDK1) ve kinazların PH bölgelerine bağlanarak sitoplazmadan plazma zarına Akt'yi (diğer serin/treonin kinaz) toplar (Avruch 1998). Lipid bağlama ve zara geçiş Akt'de yapısal değişikliğe neden olur. Bu da Akt'nin PDK1 ile Thr 308 ve Ser 473'ünü sonradan fosforiller. PDK1 ile fosforilasyon sonrası Akt tamamen işlevsel hale gelir (Avruch 1998, Farese 2001) (şekil 2.17).



Şekil 2.17. PI 3-kinaz Akt ve PI 3-kinazdan bağımsız GLUT4 taşınım yolakları. PI3-kinazın düzenleyici alt üniteleri insüline cevaben IRS proteinleri ile etkileşime girer ve PI3-kinaz işlevselleşir. Fosfatidil ara ürünleri plazma zarına Akt'yi toplar. Yapısal değişikliğe uğrayan Akt PDK1'i fosforiller. İşlevsel hale gelen Akt hücresel fizyolojisinin birçok davranışı ile ilgili yokuş aşağı proteinlerini fosforiller ve bu proteinlerin işlevini düzenler. PI 3-kinaz/Akt yolu GLUT 4 naklinin yokuşyukarısındadır. GLUT 4 naklinin PI 3-kinazdan bağımsız yolun yokuş aşağısında başka bir yolla da gerçekleştiği bildirilmiştir.

İşlevsel hale gelen Akt hücresel fizyolojisinin birçok davranışı ile ilgili yokuş aşağı proteinlerini fosforiller ve bu proteinlerin işlevini düzenler (Czech ve Corvera 1999, Ueki ve ark 1998). Akt; glukoz nakledicileri 4 (GLUT 4) bileşeni, protein kinaz C (PKC) izoformları ve GSK 3'ün üyelerini fosforiller ve işlevselleştirir. Bunların hepsi insülin aracılıklı metabolik etkilerde önemli aşamalardır (Czech ve Corvera 1999, Ueki ve ark 1998). Wortmannin ve LY294002 ile PI3K'nın farmakolojik baskılanması sonucu, GLUT4'ün hücre yüzeyine insülinle uyarılan geçişi ve glukozun hücre içine girişinin engellendiği gösterilmiştir (Okada ve ark 1994, Cheatham ve ark 1994). PI3K'nın p110 katalitik altünitesinin işlevsel yapıları ve Akt'nin aşırı ifadesi, insülin aracılıklı metabolik etkileri uyarır (Ueki ve ark 1998, Martin ve ark 1996), halbuki dominant-negatif p85 düzenleyici alt ünite yapıları insülin aracılıklı metabolik etkileri baskılar (Katagiri ve ark 1996, Kohn ve ark 1996). GLUT 4 geçişinde Akt'nin insülin aracılıklı rolü hala tartışmalı kabul edilse de (Hajduch ve ark 2001), farelerde Akt1 eksikliğinin insülin direnci ile ilgili olduğu ve Akt'nin insülin işlevinde önemli olduğu fikri güçlü olarak desteklenmektedir (Cho ve ark 2001, Cho ve ark 2001).

PI3-kinazın düzenleyici alt üniteleri insüline cevaben IRS proteinleri ile etkileşime girer ve PI3-kinaz işlevselleşir (Alessi ve Downes 1998). Antilipolizis, yağ asidi sentezinin aktivasyonu, asetil CoA-karboksilaz, glikojen sentaz, Akt'nin fosforilasyonu glikojen sentaz kinaz 3β etkinsizleştirilmesi, protein sentezi ve DNA sentezi uyarımı gibi insülinin birçok hücresel etkisi PI3-kinaz baskısı ile de engellenebilir. (Alessi ve Downes 1998).

2.4.3. GLUT 4 Taşınımı

GLUT 4'ün hücre içi bölgelerden plazma zarına uyarılmasıyla, insülin kas ve adipoz dokuda glukoz girişini sağlar. İnsülin uyarımını takiben kas ve yağ hücrelerinde GLUT 4 naklinin ve glukoz girişinin azalması insülin direncinde önemli bir bozukluk olduğunu gösterir (Shulman 2000). PI 3-kinaz/Akt yolunun GLUT 4 naklinin yokuş yukarısında olduğu gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarda GLUT 4 naklinin PI 3-kinazdan bağımsız yolun yokuş aşağısında da olduğu gösterilmiştir (Baumann ve ark 2000).

Metabolik olarak cevap veren hücrelerde c-Cbl'nin tirozin fosforilasyonu insülin ile uyarılır. Cbl bir proto-onkoproteindir (Ribon ve ark 1998). C-Cbl adaptör protein CAP yoluyla insülin alıcı proteini ile bileşen oluşturmak için toplanır (şekil 2.17) (Ribon ve ark 1998). CAP'ın COOH ucu SH3 bölgesiyle Cbl'nin prolinle zengin alanına bağlanır. Cbl fosforilasyonunda, Cbl/CAP bileşeni, lipid öbeklerinde ve kaveolede zenginleşen plazma zarına nakledilir (Chiang ve ark 2001). Lipid öbeklerinde, CAP kaveolar proteini flotillin ile alakalı ve TC10, CRKII'yi de içeren çok sayıda protein ve vesiküler trafik ve zar füzyonuyla ilgili diğer yardımcı proteinler ile bileşen oluşturur (Chiang ve ark 2001). Cbl SH2 içeren adaptör proteini CRKII'yi, guanin nükleotid değişim faktörü C3G ile birlikte lipid öbeklerine bağlar. C3gG, rho ailesi proteini TC10'u işlevsel hale getirir (Chiang ve ark 2001). Bu G proteini yağ ve kas dokusunda ifade edilir ve PI 3-kinazdan bağımsız CAP'a bağımlı yolakta insülin ile işlevselleştirilebilir (Chiang ve ark 2001). Dominant negatif CAP mutantının ifadesi, insülinle uyarılan glukoz girişi ve GLUT 4 naklini engellediğini göstermiştir (Pessin ve Saltiel 2000). Bu bilgi, PI 3-kinaz/ Akt yolu ve CPA/Cbl bileşeninin GLUT 4 naklini sağlayan iki bölünmüş paralel yolu olduğunu gösterir.

Protein modifikasyonu ve protein-protein etkileşimi tip 2 şeker hastalığında bozulmuş olan insülin uyarı iletim mekanizmalarının birçoğunu gerçekleştirir . Tip 2 şeker hastalığının başlıca bozuklukları periferal insülin direnci ve pankreatik β hücrelerinin salınan insülinin miktarını arttırmasına rağmen ortaya çıkan metabolik bozuklukları

düzeltememesidir. Karaciğerde artan glukoz yapımı, periferal glukoz kullanımının azalması ve β hücrelerinden salınan yetersiz insülin, glukoz intolerans ve frank diyabete neden olur. İnsülin alıcı proteini ile gönderilen uyarılar insülin salgı araçlarının salınımına ihtiyaç duyarlarKas, karaciğer, yağ doku ve β hücrelerindeki insülin direncinin bir araya gelmesi tip 2 şeker hastalığının fenotipini oluşturabilir. Şeker hastalığına neden olan insülin direncinin nedeni ne olabilir sorusu aklımıza gelmektedir. Hastalığın kalıtlanabilir olması genetik faktörlere dikkati çevirmektedir. Glukoz ve lipid metabolizması için birçok aday gen çalışılmıştır fakat tip 2 diyabete hassas tek bir gen belirlenmemiştir. Tip 2 şeker hastalığının birçok alttiplerinin olması nedeni ile tek bir gen belirlenememiştir. Farklı mekanizmaların bir araya gelmesi insülin hassasiyetini bozmakta ve direnç gelişmektedir.

Bazı insüline direnç durumlarında bazı metabolik mekanizmalar da bozukluklar beraberinde görülür. Bu mekanizmaların çoğu tip 2 şeker hastalığı ve şişmanlık ile, birçoğu da çevresel faktörler ile ilişkilidir. İnsülin uyarı ileti yolunun birçok adımındaki genetik bozukluklar az olsa bile çevresel faktörler ile beraber glukoz dengesinin muhafazasını bozabilir. Tip 2 şeker hastalığı ile uyarı ileti yolundaki protein dizilerinin gen çokyapılılıklarını göz ardı etmemek gerekir. Tek bir gen çokyapılılığı insülin direncinin sadece küçük bir kısmını açıklasa bile, birçok gen çokyapılılığının birleşmesi bu hastalığın multifaktoriyal doğasına neden olabilir. IRS proteinleri birçok alıcı protein ve hücre içi uyarı ileti yolları arasında çok yönlü işlevsel aracılık yapar. İnsanlarda insülin alıcı proteini ve IRS-1 arasındaki etkileşimin azalması tip 2 şeker hastalığının oluşmasına katkıda bulunur. İnsülin alıcı proteini, IRS-1 ve IRS-2'de oluşan mutasyonlar birbirleri arasındaki etkileşimi azaltıp insülin uyarı sisteminde bozukluklara neden olabilir. Bu genlerdeki mutasyonlar proteinlerin yapısında bozukluğa neden olduğundan dolayı insülin uyarı ileti sisteminde diğer ara ürünler ile etkileşim bozulur ve şişmanlık ve enfeksiyonlar gibi çevresel faktörler ile birleşerek bozulmuş glukoz toleransı ve diyabetin oluşumunu hızlandırırlar.

2.5. Tip 2 Şeker Hastalığının Yaygınlığı ve Etiyolojisi

Tip 2 şeker hastalığı en sık görülen şeker hastalığı tipi olup beyaz toplumlardaki olguların %85'inden sorumludur (Williams ve Pickup 2004). İleri yaş, şişmanlık, tembellik, şeker hastalığı aile öyküsü, insülin direnci sendromları, pankreas hastalıkları, coğrafi ve ırksal değişkenliklerden dolayı görülme sıklığındaki farklılıklar gibi değişik klinik risk

faktörleri hastalıkla ilişkilidir (Yenigün M 1995, Williams ve Pickup 2004). Bu etmenler hastalığın etiyoloji ve patofizyolojisi ile ilgili ipuçları vermektedir. Farklı ülkelerde tip 2 şeker hastalığı görülme oranı geniş bir değişkenlik gösterir. En yüksek oranlar özellikle ABD, Arizona'daki Pima yerlileri (%50) ve Güney Pasifikteki Nauru adası (%40) gibi bazı yerli Amerikan kabilelerinde de bulunur (Williams ve Pickup 2004). Birçok bölgede şeker hastalığı, kentsel toplumlarda kırsaldakine göre daha sıktır. Sosyal çöküş, işsizlik ve fakirlik, hareket azlığı, batılı diyet ve şimanlık gibi diyabetojenik yaşam tarzı etmenleri ile birlikte bulunabilir (Williams ve Pickup 2004).

Tip 1 şeker hastalığının aksine bu hastalarda daima bir insülin üretimi ve salınımı vardır. Fakat insülin hedef doku hücrelerinde insüline karşı bir direnç vardır. Hiperglisemi ile birlikte hiperlipidemi, hipertansiyon ve şişmanlık sıklıkla görülür. Uzun zaman ihmal edildiğinde ya da kontrol altına alınmadığında vasküler bozukluklara, iyileşmeyen ülserasyonlara ve gangrene yol açarak ayak ve parmakların kesimine, kardiyovasküler ölümlere, retinopati ve nöropatiye yol açan bir hastalıktır (Yenigün M 1995).

Gelişmekte olan ülkelerde hastalık başlangıcının en çok görüldüğü yaş, batı dünyasında geleneksel olandan 10-20 yaş kadar erken olup, şu anda 40-45 yaş civarındadır (Williams ve Pickup 2004). Tip 2 şeker hastalığı genellikle şişman ve şeker hastalığı aile öyküsü zemini olan çocuk ve erişkinlerde görülmeye başlamıştır. İlk kez yerli Amerikalılar gibi yatkın etnik gruplarda bildirilen çocukluk olguları artık tüm dünyada bildirilmektedir (Williams ve Pickup 2004).

Tip 2 şeker hastalarının %80 kadarı şişmandır (Williams ve Pickup 2004). Şeker hastalığı gelişme riski vücut kitle indeksinin (VKİ; ağırlık (kg)/boy (m^2)) artması ile ilerleyerek artar. Halen şişmanlık, VKİ'nin >30kg/m^2 olması şeklinde kabul görmektedir. Şişmanlık, iç organlardaki (viseral) yağ miktarı ile en yakın ilişkisi olan, insülin direncine neden olarak şeker hastalığının oluşumuna katkıda bulunur (Williams ve Pickup 2004).

Egzersizin hem insülin duyarlılığını artırması hem de şişmanlığı önlemesinden dolayı düşük fiziksel aktivite, muhtemelen tip 2 şeker hastalığı gelişiminin öncülerindendir. Fazla egzersiz yapan kişilerde, şişmanlık ve şeker hastalığı aile öyküsü gibi diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak tip 2 şeker hastalığı gelişme riski %25-60 daha düşüktür (Williams ve Pickup 2004).

Tip 2 şeker hastalığının genetik bir temeli olduğuna dair kanıtlardan biri de hastalığın ailesel yığılmalar göstermesidir (Williams ve Pickup 2004). Ancak bu genetik

farklılık Mendel kurallarına uymaz. Aynı yumurta ikizlerinde hastalığın aynı anda bulunma oranı %33-90 arasında hesaplanmıştır (Williams ve Pickup 2004). Ancak bunun yorumu tartışmalıdır. Ayrı yumurta ikizlerinde %17-87 dir. Aynı anda bulunma oranlarının yüksekliğinin bir açıklaması da, bu ikizlerin genellikle tek bir plesantayı paylaşmaları ve aynı intrauterin çevreden etkilenmeleri olabilir (Williams ve Pickup 2004).

Tip 1 şeker hastalığının aksine tip 2 şeker hastalığı HLA bölgesindeki genlerle ilişkili değildir. Muhtemelen çokgenli kalıtım olup olası gen bozukluklarının değişik kombinasyonları söz konusudur. Bazı ailelerde tip 2 şeker hastalığı ile ilişkisi denenen ve tanımlanan genler arasında insülin destekleyicisi, hepatik nükleer faktör 4A gibi bazı transkripsiyon faktörleri, peroksizom proliferatörü ile işlevsel hale gelen alıcı protein gama ve insülin alıcı protein ara ürünü-1 ve -2 sayılabilir. Bugüne kadar hastalığa orta ya da ileri düzeyde etkisi olan herhangi bir gen tanımlanmamıştır (Williams ve Pickup 2004). Tip 2 şeker hastalığının diğer çok genli kalıtım hastalıklardan farklı olarak, heterojen poligenik özellik göstermesi, birkaç ana gende aynı zamanda genetik bir bozukluk, kromozom üzerinde birkaç diğer bölgelerde olan bozuklukların da katılımıyla farklı klinik özellik göstermesidir (Arslan ve ark 2001). Hastalığın bu yönü ve çevresel koşulların doğrudan doğruya etkilemesi sebebiyle kalıtsal niteliğini tanımlamak güçleşmektedir. Bağlantı analizleri tek genli kalıtsal hastalıkların tanımında oldukça güçlü bir teknik olmasına rağmen birden fazla genin sebep olduğu tip 2 şeker hastalığında aynı hassasiyette başarılı olmak zordur. Çünkü farklı işaretleyiciler ve farklı gen bölgeleri bu hastalık için iştirak etmiştir. Ayrıca her işaretleyicinin ilgili olduğu bölgeye de hasta bölge denilemez, sadece gen çokyapılığı denilebilir (Arslan ve ark 2001). Tip 2 şeker hastalığı birçok genin gen çok yapılılıklarının birbirlarine eklenmesiyle belirli çevre koşullarında ve beslenme alışkanlıklarında ortaya çıkan hastalıktır (Arslan 2001). Bu yüzden tip 2 şeker hastalığı çok genli kalıtıma sahip ve çok farklı koşullara gereksinim gösteren bir hastalıktır.

Tip 2 şeker hastalığı β hücre işlevlerinin ileri derecede bozulmasıyla birlikte β hücrelerinin karşılayamayacağı düzeyde artmış insülin direncinin gelişmesi nedeniyle oluşur (Williams ve Pickup 2004). Tip 2 diyabette β hücre işlevindeki ana bozukluklar arasında intravenöz glukoza olan birinci ve ikinci faz insülin yanıtlarının belirgin olarak azalması, karışık besinlere olan yanıtların gecikmesi sayılabilir.

Tip 2 şeker hastalarının (>%90) adacıklarındaki temel histolojik bozukluk, hücrelerin dışında uzanan ve adacık amiloid polipeptidinden (IAPP; amilin olarak da bilinir), kaynaklanan amiloid birikimidir (Yenigün M 1995). IAA, insülinle birlikte 1:10-

50 molar oranında salgılanır (Yenigün M 1995). IAPP'nin insülin salınımı bozduğu ve β hücrelerine toksik olduğu bildirilmişse de tip 2 şeker hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynamadığı düşünülmektedir (Williams ve Pickup 2004). Tip 2 şeker hastalarında, β hücre kitlesinin yalnızca %20-40 azalaması, insülin salınımındaki %80'den fazla olan azalmayı açıklamamaktadır. Şeker hastalığında β hücrelerindeki ek işlevsel bozukluklar arasında glukotoksisite, lipotoksiste ve IAPP'nin aşırı salınımının etkileri sayılabilir.

İnsülin direnci, sıklıkla metabolik sendrom ya da insülin direnci sendromu olarak bilinen klinik ve biyokimyasal özelliklerin birlikteliği ile ilişkilidir. Bu sendrom, glukoz intoleransı (Tip 2 şeker hastalığı veya Impaired Glucose Tolerance; Bozulmuş Glukoz toleransı; IGT), santral şişmanlık (karın bölgesinde yağ birikimi), hipertansiyon, aterosklerozda hızlanma, düşük serum yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), kolesterol ve yüksek trigliserid ve/veya çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) derişikliği ile kendini gösterir (Williams ve Pickup 2004).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Grupların oluşturulması ve kan örneklerinin eldesi

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalının Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyetinden dünya sağlık örgütü kriterlerine göre belirlenen 120 Tip 2 şeker hastası seçildi. Seçilen hastaların 40 yaş üstü olmasına, insülin kullanmamasına, akrabalık ilişkisi olmamasına ve vücut kitle indekslerinin (VKİ) 30'un altında olmasına dikkat edildi. Hastalar diyet ve/veya oral hipoglisemik ilaçlarla beraber tedavi ediliyordu. Rastgele seçilen kontrol grubunu ailesinde diyabet hikayesi olmayan, oral glukoz tolerans testi (OGTT) normal olan, 40 yaş üzerindeki 35 kişi oluşturdu. OGTT 75 gr'lık glukoz yüklemesi ile yapıldı.

Her iki gruptaki bireylerden, DNA eldesi için kullanılmak üzere EDTA'lı tüpe ve serum insülin, C-peptid, glukoz ve HbA1C değerlerini tespit etmek üzere pıhtılaşma engelleyici içermeyen düz tüplere 10'ar ml kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar DNA eldesine kadar geçen süre içinde -20 C'de saklandı. Düz tüplere alınan kanlar ise S.Ü.Meram Tıp Fakültesi Rutin Biyokimya Anabilim dalında analizi yapılmak üzere gönderildi. Alınan insülin ve glukoz sonuçlarından homeostasis model assesment (HOMA-IR) hesaplanarak insülin direnci değerlendirildi.

OGTT Uygulaması: Kontrol grubundaki fertlere 9-16 saatlik açlıktan sonra sabah saat 8'de OGTT yapıldı. 300 ml suda eritilen 75 gr glukoz bir limon sıkılarak limonata şeklinde içirildi. OGTT yapılmadan önce ve glukoz içirildikten 1. ve 2. saatlerde kan örneği alınarak glukoz, insülin, C-peptid ve HbA1C değerleri için analizleri yapılmak üzere Rutin Biyokimya Laboratuvarına gönderildi.

HOMA-IR'nin (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) Hesaplanması: HOMA-IR açlık insülin (µIU/ml) x açlık glukoz mmol/ml / 22.5 formülüne göre hesaplandı ve 2-2.5'un üzerindeki oranda olan hasta ve kontrol grubu fertleri insüline dirençli kabul edildi.

3.2. DNA izolasyonu, SSCP ve agaroz jel elektroforezi için gerekli olan gereçler

Santrifüj (NF 100R, İstanbul, Türkiye), mikropipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya), derin dondurucu (-80), vorteks (Nüve, İstanbul, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Elektro-mag), mikrosantrifüj (Spin Win), PCR aleti (Quanta biotech, İngiltere), mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul, Türkiye), güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida), elektroforez tankı, dikey elekroforez tankı (Biolab), hassas terazi (Sartorius- BP 310 S), biyolojik emniyet kabini, benmari (Nüve, İstanbul, Türkiye), PH-metre (İnoLab), buzdolabı (Arçelik, İstanbul, Türkiye).

3.2.1. DNA izolasyonu, SSCP ve agaroz jel elektroforezi için gerekli olan kimyasal maddeler

Üre (Merck, Darmstadt, Almanya), NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), KCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Na2HPO4, SDS, Proteinaz K (Sigma, St Louis, Amerika), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Etil alkol, NaHPO4, Tris-HCl, Akrilamid (Applichem, Darmstad, Almanya), Bisakrilamid (Applichem, Darmstad, Almanya), Amonyum persülfat (Sigma, St Louis, Amerika), Agaroz (Sigma, St Louis, Amerika), Asetik asit, Borik asit (Sigma, St Louis, Amerika), EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), Formaldehit, Sigma cote (Sigma, St Louis, Amerika), Binding silane (Promega, Mannheim, Almanya), dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Taq polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10x Amonyum sülfatlı PCR tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya), MgCl2 (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Na2CO3 (Merck, Darmstadt, Almanya), Sodyum tiyosülfat (Merck, Darmstadt, Almanya), TEMED (Sigma, St Louis, Amerika), Ksilen siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), Bromofenol mavisi (Merck, Darmstadt,Almanya).

3.3. DNA İzolasyonu

3.3.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması

0.5M EDTA (pH 8)

$EDTAH_2O$ ……. 18.6 gr

dH_2O …….. 80 ml

1N NaOH ile pH 8'e ayarlanır. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanıp otoklavlanır.

1M Tris HCl (pH 8)

Tris HCl …….. 157.6 gr

dH_2O …… 83 ml

1N NaOH ile pH 8'e ayarlanır. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye ayarlanıp otoklavlanır.

4M NaCl

NaCl …… 23.97 gr

dH_2O …….. 100 ml'ye tamamlanır.

Parçalama Çözeltisi (Stok) (5x)

NaCl …….. 4M

EDTA …… 0.5M

Tris HCl ……. 1M

100 ml'ye tamamlanıp, pH 7.5'e ayarlanıp, otoklavlanır.

Üreli Parçalama Çözeltisi

Üre …….. 4.2 gr

dH_2O …….. 10 ml

Parçalama çözeltisi (5X) ……. 2 ml

5M NaCl

NaCl …… 29.22 gr

dH_2O ……... 100 ml'ye tamamlanır.

% 20 SDS (100 ml)

SDS …….. 20 gr

dH_2O …… 80 ml

SDS iyice çözününceye kadar karıştırıcıda ısı da açılarak karıştırılır. Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

% 70 etanol

%96 etanol ……. 72 ml

dH_2O ……. 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Proteinaz K (10mg/ml H2O)

Proteinaz K ……. 10 mg

dH_2O ……... 1 ml'de çözünür. -20C'de saklanır. Kesinlikle otoklavlanmaz.

3.3.2. DNA'nın Eldesi

I.gün

EDTA'lı tüpe alınan kanların oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra üzerlerine hacimleri kadar soğuk saf su eklenir. Nazikçe altüst edildikten sonra 4000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı kısım atılır. Bu işlem üç kez tekrar edilir. Üçüncü santrifüjün ardından, sıvı kısım atıldıktan sonra her bir tüpe 3 ml. üreli parçalama çözeltisi eklenir ve çökeleğin iyice çözünmesi için altüst edilir. Ardından 400 µl %20'lik SDS ve 100 µl 10 mg/ml proteinaz K eklenerek 37 ^{0}C'de 1 gece için inkübasyona bırakılır (Arslan laboratuar notları).

II. gün

İnkübasyondan çıkarılan örneklere 2 ml 5M NaCl eklenir ve 10-15 dakika altüst edilir. Ardından, üzerlerine 8 ml kloroform konularak 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda oluşan 3 fazlık kısımdan üstteki beyaz olarak görünen kısım temiz bir tüpe alınarak, üzerine hacmi kadar soğuk %96'lık etil alkol eklenir. Alkol ilavesi ile çöken DNA'lar pipet ucu ile 1,5 ml.lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000µl %70'lik etil alkol eklenir. Tüpler 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlanır. Bu işlem 3 kez tekrar edilir. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde dökülür. Tüplerin dibinde yapışık durumda olan DNA'lar, kurutulmak üzere oda sıcaklığında 6 saat tüpler ters çevrilerek bırakılır. Kurutma işleminden sonra üzerlerine gerekli miktarlarda deiyonize steril su eklenir. Bir gün +4 C'de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA'lar saklanmak üzere -20 C'lik derin dondurucuya kaldırılır (Arslan laboratuar notları).

3.4. DNA analiz yöntemi

DNA analizi için tercih edilen PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) (PCR; Polymerase Chain Reaction) tekniği, ilgilenilen bir gen bölgesinin in vitro şartlarda çoğaltılmasına dayanan, pratikliği ve güvenilirliği ile günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda en çok kullanılan tekniklerden birisidir. Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Temizkan G ve Arda N 2004)).

IRS-1 ve IRS-2 gen bölgelerinin çoğaltılması işlemi Quanta Biotech PZR cihazı ile gerçekleştirildi. PZR tepkimesi için gerekli karışımların tümü otoklavlanmış malzemeler kullanılarak biyolojik sağlık kabininde hazırlandı.

3.4.1. Primer tasarımı ve kullanılan primerler

IRS-1 ve IRS-2 gen bölgelerinin ekzonun kodlanan ve kodlanmayan bölgelerine uygun olarak http://workbench.sdsc.edu adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlandı. Bu çalışmada IRS-1 gen bölgesine ait 20, IRS-2 gen bölgesine ait 15 çift primer takımı kullanılmıştır (Tablo 3.1, 3.2).

Tablo 3.1. IRS-1 gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PZR ürünü büyüklükleri

	5'→ 3'
Ekzon 1	344 bç
IRS1- 1F	CTCGGCCCGGAATGTAGA
IRS1- 1R	ACTCATCCCTGCCCCTCG
Ekzon 2	292 bç
IRS1- 2F	CGAACCCTTCCCAAACCTC
IRS1- 2R	CGCCCAAATACCAGCTCAG
Ekzon 3	327 bç
IRS1- 3F	GCAGCAACAGCAACAGCC
IRS1- 3R	CACCAGGAAGGAGCGAAG
Ekzon 4	245 bç
IRS1- 4F	ATCGCTGCTTCCAGAGGG
IRS1- 4R	AGTTTTCGGGCGCTTCAC
Ekzon 5	238 bç
IRS1- 5F	TCTTCGCTCCTTCCTGGTG
IRS1- 5R	ACATGCAAACAGGGCTGGA
Ekzon 6	296 bç
IRS1- 6F	AGAGTCGGGGTTTCTGCTGC
IRS1- 6R	ACTTGTGCCGCCACTTCTTC
Ekzon 7	328 bç
IRS1- 7F	TCGAGTACTACGAGAACGAG
IRS1-7R	TCACCGTAGCTCAAGTCC
Ekzon 8	342 bç
IRS1- 8F	GCTGCACAACCGTGCTAAG
IRS1- 8R	CCCACCTCGATGAAGAAGC
Ekzon 9	308 bç
IRS1- 9F	GAACATCAGGCGCTGTGG
IRS1- 9R	AGGTGGCGGTGATGCTCT
Ekzon 10	342 bç
IRS1- 10F	CGGCACCATCTCAACAATCC

IRS1- 10R	GCCACTGGTGCTACTGGACG
Ekzon 11	364 bç
IRS1- 11F	ACCACAGCCGCTCCATCC
IRS1- 11R	CCATTGCCACCCCGAGAC
Ekzon 12	308 bç
IRS1- 12F	CGGTGAGGAGGAGCTAAGCA
IRS1- 12R	GTGGGTAGGCAGGCATCATC
Ekzon 13	312 bç
IRS1- 13F	AGAAGACCCCGTCCCAGT
IRS1- 13R	ATACGCTCTTGGGGCTCA
Ekzon 14	315 bç
IRS1- 14F	ATGAGCCCCCAAGAGCGTAT
IRS1- 14R	CCCCACTGGTGACATGTTC
Ekzon 15	344 bç
IRS1- 15F	CTTGCCTCACCCCAAACCC
IRS1- 15R	GCCTAGCCCCGCAGTATCC
Ekzon 16	314 bç
IRS1- 16F	TTCCACCAGCAGCGACAGC
IRS1- 16R	CCACCGGGCCAGACAAGTA
Ekzon 17	285 bç
IRS1- 17F	AGTCTGGCTACTTGTCTGGC
IRS1- 17R	TCTGACGGGGACAACTCAT
Ekzon 18	348 bç
IRS1- 18F	TAGCATTTGCAGGCCTACC
IRS1- 18R	CGGATCACTTTGGCACTCT
Ekzon 19	277 bç
IRS1- 19F	GTGAACCTCAGTCCTAACCG
IRS1- 19R	ACAGTTTGGCTGGCTCCT
Ekzon 20	276 bç
IRS1- 20F	CAAGGAGCCAGCCAAACT
IRS1- 20R	CGCACCTGCTGTGATGTC

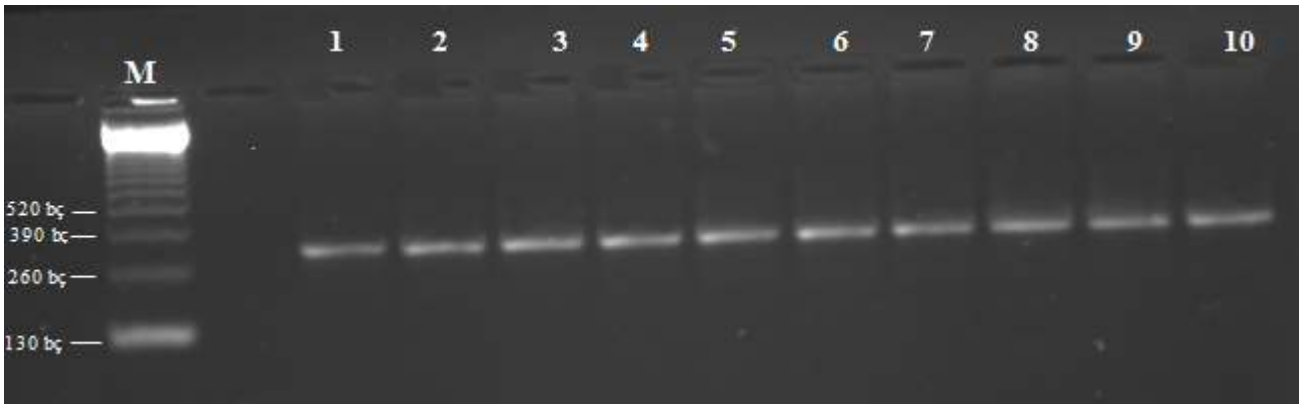
Tablo 3.2. IRS-2 gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PZR ürünü büyüklükleri

	5'→ 3'
Ekzon 1	394 bç
IRS2- 1F	GCTGTGTGTGCCTGCGTA
IRS2- 1R	GCTCCTTGAGGATGCCCG
Ekzon 2	357 bç
IRS2- 2F	AGAGCCCGAGGAGGCAG
IRS2- 2R	TTGTTGTTGTTGAGGTTGGG
Ekzon 3	360 bç
IRS2- 3F	GCCCCAACCTCAACAACA
IRS2- 3R	GGTACCAGCCCTCCTGCT
Ekzon 4	383 bç
IRS2- 4F	ACGAGTACTTCGCCGTGG
IRS2- 4R	GCGGATGTTCATGAGCTG
Ekzon 5	349 bç
IRS2- 5F	GGGTGTACCGTCTGTGCC
IRS2- 5R	AGGTTGACCAGGTGGTGG
Ekzon 6	363 bç
IRS2- 6F	CCACCACCACCTGGTCA
IRS2- 6R	ACATGGAGCGGCTGTGTT
Ekzon 7	393 bç
IRS2- 7F	AACACAGCCGCTCCATGT
IRS2- 7R	GGTAGGAGCGGCCACAGT
Ekzon 8	397 bç
IRS2- 8F	CATGGACAGGCCCCTGAG
IRS2- 8R	CATGTAGTCGTCGCTCCTGC
Ekzon 9	390 bç
IRS2- 9F	AGCTCCAGCAGCAACCTG
IRS2- 9R	GGGGGACACGTTGAGGTAGT
Ekzon 10	354 bç
IRS2- 10F	CATGGAGCATGCAGATGG
IRS2- 10R	AGGGCTTCTTGGGCCAG
Ekzon 11	400 bç

IRS2- 11F	AGCCCCCTCACCCTGTAG
IRS2- 11R	AGTCGGAGAGCGGAGACC
Ekzon 12	319 bç
IRS2- 12F	CACCAGCAGCGACAGCC
IRS2- 12R	ACCATTGTCCCCGGTGT
Ekzon 13	388 bç
IRS2- 13F	CGCCTCATCGTTGTCCTC
IRS2- 13R	CTCGCTGCTTTTCCTGAGAG
Ekzon 14	248 bç
IRS2- 14F	GCCTCCGTGGAAAATGTCT
IRS2- 14R	TCGATGGCGATGTAGTTGAG
Ekzon 15	293 bç
IRS2- 15F	GGCTTCCAGAATGGTCTCAA
IRS2- 15R	CAAAGGGCCTCCTCACCT

3.4.2. PZR karışımının hazırlanması ve PZR şartlarının primerlere göre uygulanması

PZR tepkimesinde kullanılan primer çiftlerinin en verimli çalışabilecekleri erime sıcaklıklarını tespit etmek ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile ilk başta 37 çift primer takımı için gradient PZR yapıldı (Resim 3.1).



Resim 3.1. PZR koşullarının en uygununun seçimi için yapılan farklı PZR koşullarının sonucu. Örnek olarak IRS-1/18 primerlerinin tanımladığı 285 bç'lik bölümün, farklı PZR koşullarından sonraki ürünlerinin değerlendirilmesi verilmiştir. Farklı koşullar sonucu oluşan ürünler tek band olarak uygun bç uzunluğunda görüntü vermiştir. Dolayısıyla

kullanılan primerler arzu ettiğimiz bölge için özgündür. Bu şekilde 3. kuyu bandının parlaklığı bu koşulu seçmenin daha uygun olacağını göstermektedir. İlk kuyu 100 bç'lik DNA işaretleyici kuyusudur.

3.4.2.1. PZR reaksiyonu karışımının hazırlanması

Reaksiyon karışım oranları her bir örnek için toplam 20 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

dH20 ……..... 6,585 µl

10XTampon (7300, Fermentas) ……..... 1 µl

MgCl2 ……. .....0.5 µl

İlk denatürasyon ……95 ºC …… …….5 dk

Denatürasyon …… 94 ºC …….15 sn

Bağlanma ……. primerlere göre değişen bağlanma sıcaklığı kullanıldı …20 sn

Uzama ……72 ºC ……. …15 sn

Son uzama ……72 ºC …….. 3 dk

dNTP (10mM) ……..... 0.7 µl

İleri primer ……..... 0.08 µl

Geri Primer …….. ..... 0.08 µl

Taq Polimeraz enzimi …….. ..... 0.055 µl

Tüplerin her birine 1 µl DNA ilave edildi.

3.4.2.2. PZR reaksiyon koşulları

3.4.2.3 Elektroforez

Elektroforez, yüklü moleküllerin doğrusal elektrik akımının sağladığı elektromanyetik alan içinde PZR DNA ürünlerinin moleküler ağırlığına göre, logaritmik hareket mesafesinin uzunluğunu örnek DNA parçalarının uzunluğuna göre mukayese

edilerek tayin etme yöntemidir. Elektroforetik tekniklerden, bu tezde agaroz jel elekroforezi ve SSCP yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz deniz yosunundan elde edilen bir karbohidrat polimerdir. D-galaktoz ve 3,6 anhydro-L-Galaktoz'un glikosidik bağlarla bağlanmasında oluşur. Tampon çözelti içinde çözünen agaroz, katılaştığı (polimerleştiği) zaman DNA'nın ilerleyeceği ağsı bir yapı oluşturur. Agaroz jel elektroforezi, 0.5-25 kilobazlık DNA parçalarını ayırmak için kullanılan kolay ve oldukça etkili bir metottur. DNA taşıdığı negatif yüklü fosfat gruplarından dolayı elektromanyetik alan içinde pozitif kutba doğru göç eder.

Agaroz jel eletroforezi PZR tepkimelerinin verimli çalışıp çalışmadığının ve bulaşık DNA parçalarının olup olmadığının kontrolünde kullanıldı. DNA agaroz jelde etidyum bromür (EtBr) ile görüntülenir. EtBr çift sarmal DNA'ya bağlanır ve UV (260 nm) altında görünür hale gelir.

Jelin Hazırlanması (% 2)

Agaroz ……. 2gr

1xTAE …….... 100 ml

Hazırlanan agaroz jel iyice eriyinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılır. Jelin ısısı 55-60 C'ye düşünce 5 µl ethidium bromür eklenir. Jel tanka dökülürken hava kabarcığı olmamasına dikkat edilir. EtBr kanserojenik olduğu için jel dökme işlemi çeker ocakta yapılır. Polimerleşmenin olması için jel 30 dk. donmaya bırakılır. Etidyum bromidli jelin kullanımı boyunca daima plastik eldiven kullanılır.

Örneklerin jele yüklenmesi

6X Yükleme boyası …….. 2.5 µl

PZR ürünü DNA …… 3 µl

Bantların büyüklüklerini tespit etmek için, ticari olarak alınan ve büyüklüğü bilinen bir DNA belirleyicisi kullanılır. Bu çalışmada DNA belirleyicisi olarak pUC 18 MspI kesimi ve 100 bç'i aralığındaki (100-1500 bç büyüklüğünde) işaretleyici kullanıldı.

Örneklerin jelde yürütülmesi

Çalışılan örnekler jelde 100 volt (V)'da 45 dk yürütülmüştür.

Görüntüleme

UV altında maske ile jeldeki bantlar değerlendirildikten sonra ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.5.2. Jel elektroforezde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

50XTAE tamponu

Tris base ……. 24.2 gr
Glasiel Asetik Asit ……. 5.71 ml
0.5 M EDTA (pH 8)……. 10 ml
Su ……. 100 ml'ye tamamlanır.

1XTAE tamponu

10XTAE tamponu …….. 100 ml
dH_20 ……... 900 ml

3.6. SSCP yöntemi

Tek sarmallı yapısal değişiklik (single strand conformational polymorphism, SSCP), DNA üzerindeki varyasyon/mutasyon tespiti amacıyla geliştirilen teknik olarak kolaylığı ve pratik oluşuyla en çok tercih edilen metodlardan birisidir (Jordanova ve ark 1996). İlk olarak 1989 yılında tanımlanan bir tekniktir (Orita ve ark 1989). Nokta mutasyonları, ekleme/çıkarma tip mutasyonlar, yeniden düzenleme tipi mutasyonlar gibi durumların tespiti için çok uygundur (Orita ve ark 1989, Sekiya 1993). Tek bir baz çiftinde olan değişiklikleri bile SSCP ile yakalamak mümkündür. SSCP; genetik bağlantı çalışmaları, gen bulma çalışmaları ve DNA teşhis amaçlarında da uygulanmaktadır.

Metodun temeli, denatüre edilerek tek sarmal haline getirilen DNA parçacıklarının denatüran olmayan poliakrilamid jelde soğuk ortamda yürütülmesi esasına dayanmaktadır. Nükleotid diziliminden kaynaklanan ikincil yapının kendi üzerinde katlanarak molekül ağırlığından bağımsız, dizilime özel bir şekilde elektromanyetik alanda hareket etmesi SSCP'nin diğer metotlardan farkını oluşturmaktadır (Beler 1993, Kukita ve ark 1997, Glenn 1996, Orita ve ark 1996). Ortamın sıcaklığı, DNA'nın boyu, elektroforez jelinin özellikleri, DNA'yı tek iplikli hale getirmek için kullanılan maddeler ve yöntemler aynı

baz kompozisyonunda farklı ikincil yapılar oluşmasını sağlarlar (Humries ve ark 1997, Savov ve ark 1992). SSCP analizi mutasyonlar sonucu tek iplikli DNA'da oluşan yeni konformasyona bağlı elektroforezdeki yürüme farklılığından yaralanarak mutasyonların yeri hakkında bilgi verir. Mutasyonu tanımlamaz. Fakat PZR ürünlerinin farklı nükleotid kesim yerlerini inceleyerek uygun enzim seçimi ile mutasyon tayini de yapılabilir.

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ve gliserolderişikliği, denatüran ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PCR ürünlerinin denatürasyon yötemi, mutasyonun tipi ve bulunduğu yer performansı etkiler (Nollau ve Wagener 1997). Optimal koşullar sağlandığında elektroforetik hızı tek zincirli nükleik asitlerin büyüklükleri ve dizileri etkiler (Sheffield ve ark 1993). SSCP'de en sağlıklı sonuca ulaştıracak ürün büyüklüğü 89-400 bç aralığıdır. Rahatlıkla değerlendirilebilen bantlar 110-275 bç büyüklüğündeki bantlardır (Arslan kişisel görüşme).

SSCP jelinde gen çokyapılılığı/mutasyon içeren PZR DNA ürünleri jel görüntüsünde bir örnekte bir veya birden fazla bant verebilirler, ancak tek bant görmek mümkün değildir. İki bant ve kıyaslanan örneklerden farklı konumda bant yerleşimi farklı dizilime; üç bant mozaik yapıya; dört bant ise her iki sarmalında da farklı dizilime sahip olduğunu işaret etmektedir.

3.6.1. SSCP yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

10XTBE tamponu (pH 8.3)

EDTA …… 9.37 gr
Tris base ……. 108 gr
Borik asit ……. 55 gr
Toplam hacim 1000 ml'ye dH_2O ile tamamlanır.

1XTBE tamponu

10XTBE tamponu …….. 100 ml
dH_2O …….. 900 ml

Gümüş Boyama:

Durdurma çözeltisi:

% 10 Asetik asit

Asetik asit …….. 10 ml

Toplam hacim 100 ml'ye dH_2O ile tamamlanır.

Boyama çözeltisi:

% 0.1 Gümüş nitrat

Gümüş nitrat …… 0.25 gr

dH_2O ……... 250 ml'ye tamamlanır.

0.3 ml formaldehit eklenir.

Renk Geliştirme çözeltisi:

% 0.75 Na2CO3 (Sodyum Karbonat)

Sodyum karbonat ……. 0.75 gr

dH_2O …… 250 ml'ye tamamlanır.

Soğuması için derin dondurucuya kaldırılır. Kullanmadan hemen önce,

Sodyum Tiyosülfat …….. 52.5 µl

Formaldehit ……. 0.3 ml eklendi.

%10 APS

APS …….. 1 gr

dH_2O …… 10 ml

%50 Akrilamid stok (100ml) (49:1)

Akrilamid ……. 49 gr

Bisakrilamid ……. 1gr

dH_2O'da çözülerek wattman 3MM'de süzülür ve +4C'de saklanır.

Kullanım için %7'lik akrilamid

%50 akrilamid stok ……. 5.6 ml

dH_2O …….. 32 ml
10XTBE ……2.4 ml
hazırlandıktan sonra kullanım öncesi,
TEMED …… 20 µl
%10 APS …….. 200 µl
eklenerek hepsi karıştırıcıda karıştıktan sonra dökülür.

SSCP Tamponu (10 ml)
Ksilen siyanol …….. 0.025 gr
Bromofenol mavisi ……... 0.025 gr
Formamid ……. 8 ml
dH2O …… 2 ml

3.6.2. SSCP'nin yapılışı

Camların hazırlanması

Camlar deterjan ile yıkanıp iyice durulandıktan sonra kurumaya bırakılır. U şekilli ve dikdörtgen şekilli her iki cam da ilk önce %70'lik alkolle gazlı bez kullanılarak temizlendi. Daha sonra %96'lık alkol kullanılarak hav bırakmayan peçete ile 3 kez (her defasında 1-1.5 ml alkol kullanılarak) temizlendi. Camların iki dik kenarına aralık meydana getirecek aralık çubukları (spacer) yerleştirildi. Camların alt kısımlarının aynı hizada olmasına dikkat edilir. Camlar elektroforez kıskaçları ile iyice sıkıştırıldıktan sonra jel dökme aparatına yerleştirildi. Jelin akıtıp akıtmayacağını kontrol etmek için bu aşamada deiyonize su dökülebilir.

Jelin hazırlanması

Jel karışımı, 250 ml'lik beher içerisine ürün büyüklüğüne bağlı olarak 49:1 veya 29:1 akrilamid:bisakrilamid oranında hazırlandı. Jel karışımı 5.6 ml %50'lik stok akrilamid çözeltisi, 2.4ml 10XTBE, 32ml dH2O şeklinde hazırlandı ve iyice çözünmesi sağlandı. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan karışıma burada %10 APS'den 200 µl ve 20 µl TEMED eklendi. 4-5 saniye karışması beklendikten sonra 50 cc'lik enjektör yardımıyla yavaşça ve hava kabarcığı bırakmamaya özen göstererek iki cam arasına döküldü. Hemen ardından

tarak takıldı. Böylece örnekleri yüklemek için kuyular oluşturulmuş oldu. Jel döküldükten sonra polimerize olması için en az 45 dakika beklendi.

Örneklerin hazırlanması ve jele yüklenmesi

Jel polimerize olduktan sonra jel dökme aparatından çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforezin orta kısmına 1XTBE konuldu, tarak çıkarıldı ve kuyular enjektöre çekilmiş 1XTBE ile yıkanarak jel artıkları temizlendi. Güç kaynağı ile bağlantılar yapılarak 88 Voltta 30 dakika boş olarak pH dengesinin sağlanması amacıyla ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin ardından, hazırlanan örnekler kuyucuklara 3 µl PCR ürünü 15 µl denatüre edici tampon ile 0.5 ml'li eppendorf tüpte karıştırılıp hazırlandı. Hazırlanan örnekler jele yüklenmeden önce 95C'de 10 dakika denatürasyonun hemen ardından buz üzerine alındı ve en az 5 dakika bekletildi.

Örneklerin görüntülenmesi

Jelin yürümesi tamamlandıktan sonra tanktan alınan camlar birbirinden ayrıldı. Camlar arasında aralık oluşturan çubuklar çıkarıldı. Bıçak veya bistüri ucu ile jel bir ucundan yavaşça ve dikkatli bir şekilde kaldırıldı. 500 ml %10'luk asetik asit solüsyonu içinde 15 dakika bekletildi. Ardından dH_2O ile yıkandı. %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisi içinde 30 dakika bekletildikten sonra %0.75'lik soğuk sodyum karbonat çözeltisinde bantlar görünene kadar elde çalkalandı. Bantlar görünür halde geldikten sonra dH2O'da 1 dakika çalkalandı. Daha sonra %10'luk asetik asit çözeltisinde 5 dakika, tekrar dH20'da 5 dakika çalkalandıktan sonra jel iki asetat kağıdı arasına alındı. Jel görüntüsü tarayıcı kullanılarak bilgisayara aktarıldı.

3.7. İstatiki Analizler

İstatistiki analizler SPSS 11.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Biyokimyasal veriler ± ortalama standart sapma olarak verilmiştir. Parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması eşleşmemiş student t testi ile hesaplanmıştır. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma gruplarının klinik özellikleri

Dahiliye Anabilim Dalının Endokrinoloji Bilim Dalından ve Konya Diyabet Cemiyetinden 120 tip 2 şeker hastası ve 35 kontrol grubu seçildi. Konya ve çevresinden gelen fertler her iki grubu oluşturdu. Tablo 4.1'de hasta ve kontrol grubunun klinik ve metabolik özellikleri gösterilmiştir. Şeker hastalarının ortalama yaşı 57'di. Hastalar zayıf, hiperglisemik ve hastalığın ortalama başlangıç yaşı >50'dü.

Tablo 4.1. Tip 2 şeker hastaları ve kontrol gruplarının klinik özellikleri

	Tip 2 Şeker Hastaları Grubu	**Kontrol**
Cinsiyet (E/B)	122 (80/42)	35 (24/11)
Yaş	57.32±8.78	49.40± 9.59
Vücut kitle indeksi (kg/m^2)	26.38± 2.51	26.80± 2.46
Açlık glukoz (mg/dl)	153.04± 60.29	101.83± 10.10
Açlık insülin (mIU/l)	8.24± 3.82	7.83± 3.81
HbA1C (%)	7.21± 2.48	5.33± 0.86
C-peptid	1.86± 0.84	6.03± 5.44
HOMA-IR	2.23 ±2.48	1.16 ±0.78
Diyabetin başlangıç yaşı	50.02± 8.74	-
Diyabetin süresi	7.93 ±5.62	-

Sonuçlar , ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.2. IRS-1 gen çokyapılılığının belirlenmesi

IRS-1 geninin birinci ekzonun kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinin, 122 tip 2 şeker ve 35 kontrol ferdinde taranması sonucu 4 farklı nükleotid değişimi belirlenmiştir. Bu değişimler PZR-SSCP yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu nükleotid değişimlerine yapılan

dizi analizi sonucunda 2 missense, 2 sessiz (silence) mutasyon bulunmuştur. Bulunan gen çokyapılılıklarının sıklığı tablo 4.2'de verilmiştir.

Kodon 972'deki GGG→AGG (Gly→Arg) gençokyapılılığı 122 hastanın 4'ünde, 35 kontrolün 4'ünde bulunmuştur (resim 4.1). Gly972Arg gen çokyapılılığı tip 2 şeker hastalarının %3.2'sinde, kontrol fertlerinin %11.4'ünde gözlenmiştir.

GCC→CCC (Ala→Pro) gençokyapılılığı kodon 513'te gözlenmiştir. Bu çeşitlilik şeker hastalarının 2/122'sinde (%1.6), kontrol fertlerinin 0/35'inde belirlenmiştir (resim 4.3). Tüm örnekler bu aminoasit yerdeğişimi için heterozigottu.

Kodon 487'deki TCT→TCA (S;serin) sessiz mutasyonu 2 hastada (%1.6), 90. kodondaki GAC→GAT (D;aspartik asit) sessiz mutasyonu 2 hasta (%1.6) ve 2 kontrolde (%5.7) bulunmuştur (resim 4.2). Bu dört gen çokyapılılıklarından bir tanesi [Ser^{487} (TCT→TCA)] daha önceki çalışmalarda belirlenmemişti.

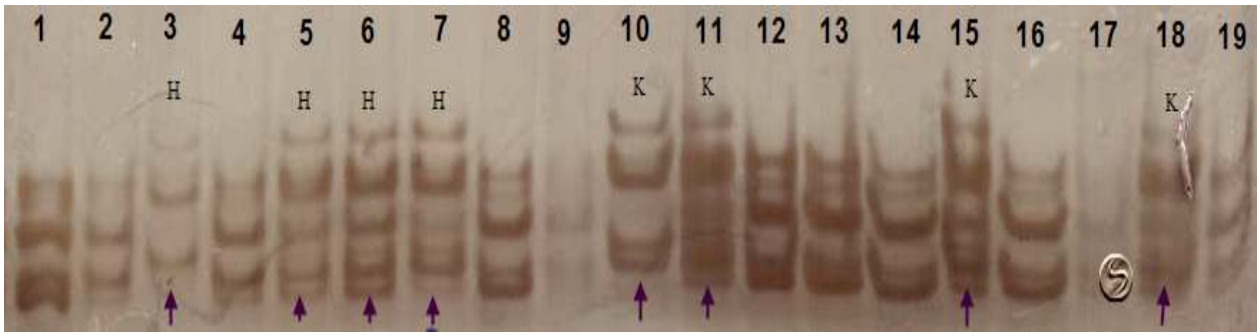
Tablo 4.2. IRS-1 geninde bulunan gen çokyapılılıkları (polimorfizm)

	Görülme sıklığı (%)	
Kodon değişikliği	**Tip 2 şeker hastaları**	**Kontrol grubu**
972 GGG→ AGG (Gly→ Arg)	4/ 122 (%3.2)	4/ 35 (%11.4)
513 GCC→ CCC (Ala→ Pro)	2/ 122 (%1.6)	0/ 35 (0)
90 GAC→ GAT	2/ 122 (%1.6)	2/ 35 (%5.7)
487 TCT→ TCA	2/ 122 (%1.6)	0/35 (0)

122 tip 2 şeker hastası ve 35 kontrol grubunun fertlerinin IRS-1 gen bölgesi PZR-SSCP analizi kullanarak tarandı. IRS-1 gen çokyapılılığına sahip fertlerin hepsi heterozigottu.

Tip 2 şeker hastaları ve kontrol grubu fertleri arasında bu gen çokyapılılıklarının sıklığı açısından istatistiksel farklılık yoktu. Bununla birlikte her bir gen çokyapılılığı tip 2 diyabet hastalarında kontrol grubundaki fertlerden daha yaygındı. Amino asit değişimine sahip iki IRS-1 gen çokyapılılığının sıklığı kontrol fertlerinde tip 2 şeker hastalarından daha yüksekti (%17.1, %4.8, sırasıyla).

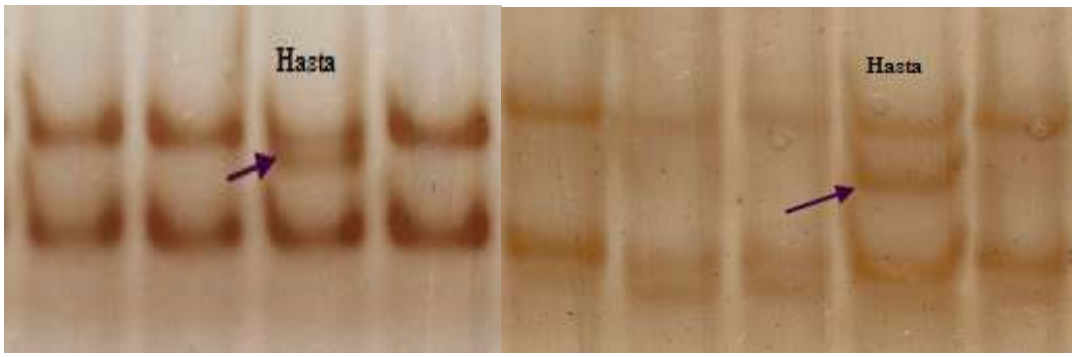
Met 613 Val, Ser 1043 Tyr, Cys 1095 Tyr, Ser 892 Gly çeşitlilikleri bizim çalıştığımız toplumda bulunmamıştır.



Resim 4.1. Gly 972 Arg çeşitliliğine ait hasta ve kontrol fertlerinin tek zincirli DNA'larının göç profilleri. Kodon 972 gen çokyapılılığı için 3 numaralı hasta ile 10 numaralı kontrol ferdi homozigot diğerleri heterozigottur. Oklar farklı yürüme özelliği gösteren fertleri işaret ediyor.



Resim 4.2. Kodon 90'da sessiz mutasyonu olan hasta ve kontrol fertlerinin poliakrilamid jel görüntüsü. Her iki hasta ve kontrol ferdi bu değişiklik için heterozigottur. Oklar nükleotid değişikliği olan fertleri gösteriyor.



Resim 4.3. Ala 513 Pro gen çokyapılılığına sahip hastaların tek zincirli DNA'larına ait poliakrilamid jel görüntüleri. Hastalar bu aminoasit yerdeğişimi için heterozigottur. Nükleotid değişiminden dolayı farklı bant yapısını oklar göstermektedir.

4.3. IRS-1 gen çokyapılılığına sahip fertlerin klinik özellikleri

IRS-1 971 ve 513 gen çokyapılılığının fertler üzerindeki etkisi bazı klinik parametreler ile analiz edildi. Sonuçlar tablo 4.3'te gösterilmiştir. IRS-1 gen çokyapılılığına sahip kontrol ve hasta grubunun fertleri ile gen çokyapılılığına sahip olmayan hasta ve kontrol grubunun fertleri arasında klinik özellikler açısından istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. IRS-1 gen çokyapılılığına sahip hasta ve kontrol gruplarında açlık hiper insülinemisi gözlenmemiştir.

Bu çeşitliliklerin herhangi birisinin varlığında insülin, glukoz, VKİ, C-peptid seviyelerinin ortalama değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Buna karşılık Gly 972 Arg gen çokyapılılığına sahip hastalar ile kontrol grubu fertleri arasında açlık insülin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$).

HOMA indeksi açlık glukoz ve insülin değerleri arasında hesaplandı. Bu çeşitliliklere sahip olan ve olmayan hasta ve kontrol grubu arasında HOMA değerleri açısından istatistiki bir fark bulunamadı.

Tablo 4.3. IRS-1 gen çokyapılılığı olan fertlerin klinik özellikleri

	Gly 972 Arg		Ala 513 Pro	Gen çok yapılılığı olmayan fertler	
	Tip 2 şeker hastaları	**Kontrol grubu**	**Tip 2 şeker hastaları**	**Tip 2 şeker hastaları**	**Kontrol grubu**
n	4	4	2	116	31
Yaş	59.50± 4.04	48.00± 11.34	58.00± 1.41	57,26±8,94	49,58±9,54
VKİ (kg/m^2)	28.00± 1.16	26.00± 2.94	25.50± 3.54	26,34±2,51	26,90±2,43
Diyabetin başlangıç yaşı	53,50±7,14	-	53.50± 6.36	49,83±8,80	-
Açlık glukoz	118.75± 15.44	99.75± 9.54	153.00± 2.83	154.09±61.20	102,10±10,29
Açlık insülin	8.73± 1.02	5.31± 1.44	9.10± 4.10	8.21±3.88	8,16±3,91
HbA$_{1C}$	6.83± 1.66	5.53± 0.60	6.20± 0.85	7.26±2.52	5,31±0,89
Diyabetin Süresi	7,75±2,50	-	7.00± 1.41	7,98±5,73	-
C-peptid	2.00± 0.50	5.23± 5.32	1.50± 0.07	1,85±0,86	6,13±5,53
HOMA	1.20± 0.14	0.73± 0.22	1.30± 0.37	2,27±2,52	1,22±0,80

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Glukoz, insülin ve C-peptidin plazma konsantrasyonları sabah aç karnına ölçülmüştür.

4.4. IRS-2 gen çokyapılılığının belirlenmesi

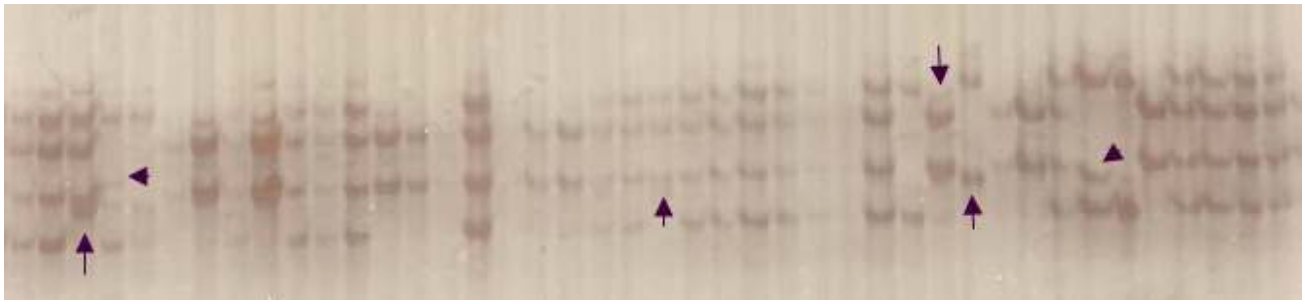
IRS-2 geninin birinci ekzonun kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri, 122 tip 2 şeker ve 35 kontrol ferdinde PZR-SSCP yöntemi ile tarandı. Bu tarama sonucunda 10 farklı nükleotid değişimi bulunmuştur. Nükleotid değişimlerine sahip fertlerin DNA'larına çift yönlü yapılan dizi analizi sonucunda 4 missense, 6 sessiz mutasyon belirlenmiştir. Bu gen çokyapılılıklarının sıklığı tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. IRS-2 geninde görülen gen çokyapılılıkları

Kodon değişikliği	Görülme sıklığı (%)	
	Tip 2 şeker hastaları	Kontrol grubu
483 CCT→ CCC	0/ 122 (0)	1/ 35 (%2.9)
488 GCT→ GCC	0/ 122 (0)	1/ 35 (%2.9)
497 GGT→ GGC	0/ 122 (0)	1/ 35 (%2.9)
829 CCC→ CCT	3/ 122 (%2.5)	0/ 35 (0)
845 ACC→ ACG	6/ 122 (%5)	0/ 35 (0)
807 TGT→ TGC	1/ 122 (%2.5)	0/ 35 (0)
849 ACC→ AGC (Thr→ Ser)	6/ 122 (%5)	0/ 35 (0)
1304 CGC→ GGC (Arg→ Gly)	1/ 122 (%2.5)	2/ 35 (%5.7)
1253 AAG→ CAA (Lys→ Asn)	1/ 122 (%2.5)	2/ 35 (%5.7)
1318 TGT→ CGT (Cys→ Arg)	1/ 122 (%2.5)	2/ 35 (%5.7)

Amino asit yerdeğişikliğiyle sonuçlanan bu gen çokyapılılıklarının 4'ü: Thr^{849}→Ser (ACC→ AGC), Arg^{1304}→Gly (CGC→ GGC), Lys^{1253}→ Asn (AAG→ CAA), Cys^{1318}→ Arg (TGT→ CGT), diğer 6 gençokyapılılığı: Pro^{483} (CCT→ CCC), Ala^{488} (GCT→ GCC), Gly^{497} (GGT→ GGC), Pro^{829} (CCC→ CCT), Thr^{845} (ACC→ ACG), Cys^{807} (TGT→ TGC)'dir. Bu on gen çokyapılılığından dokuzu yeni bulunmuştur ve önceki yapılan çalışmalarda bildirilmemiştir.

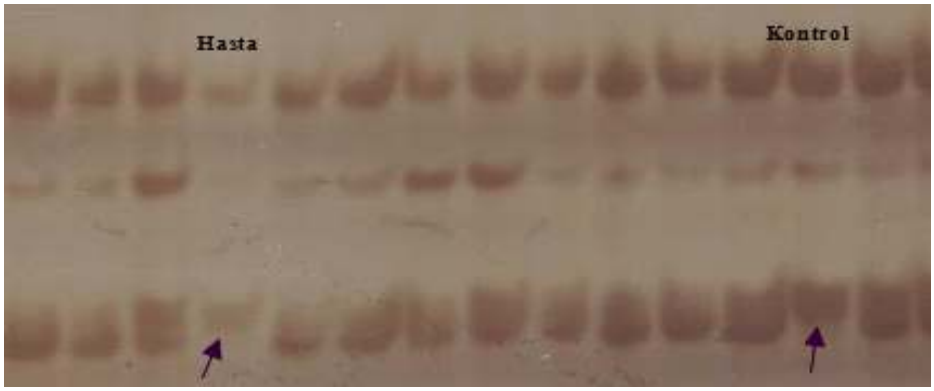
Sessiz mutasyonlardan kodon 483 (CCT→ CCC), kodon 488 (GCT→ GCC), kodon 497 (GGT→ GGC) 35 kontrol ferdin 1'inde (%2.9) bulunmuştur. Kodon 829'daki CCC→ CCT (P;Pro) sessiz mutasyonu 3 hastada (%2.5), 845. kodondaki ACC→ ACG (T;Thr) sessiz mutasyonu 6 hastada (%5) belirlenmiştir. Kodon 829'daki gen çokyapılılığı diğer toplumlarda



Resim 4.4. Thr 849 Ser gen çokyapılılığına sahip hastaların tek zincirli DNA'larına ait poliakrilamid jel görüntüleri. Oklar farklı nükleotid değişikliğine sahip hastaları gösteriyor.

yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Wang ve ark 2001). Kodon 807'deki TGT→ TGC (C;Cys) aminoasit yerdeğişikliği 1 hastada (%2.5) bulunmuştur. Kontrol grubu fertlerinde bu sessiz mutasyonlara rastlanmamıştır.

ACC→ AGC (Thr→ Ser) gen çokyapılılığı kodon 849'da gözlenmiştir (resim 4.4). Bu gen çokyapılılığı şeker hastalarının 6/122'sinde (%5), kontrol fertlerinin 0/35'inde belirlenmiştir. Kodon 1304'deki CGC→ GGC (Arg→ Gly) gen çokyapılılığı hastaların 1/122'sinde (%2.5), kontrol grubu fertlerinin 2/35'inde (%5.7) bulunmuştur (resim 4.5). Kodon 1253'deki AAG→ CAA (Lys→ Asn) ve 1318'deki TGT→ CGT (Cys→ Arg) yerdeğişiklikleri 122 hastanın 1'inde (%2.5), kontrol grubu fertlerinin 2'sinde (%5.7) görülmüştür. Bu gen çokyapılılıkları önceki yapılan çalışmalarda bildirilmemiştir.



Resim 4.5. Arg 1304 Gly, Lys 1253 Asn, Cys 1318 Arg gen çokyapılılıklarına ait hasta ve kontrol fertlerinin tek zincirli DNA'larının poliakrilamid jel elektroforezindeki görüntüsü. Bir hasta ve bir kontrol grubu ferdinin diğerlerine göre farklı yürüyen bandı oklarla gösterilmiştir.

4.5. IRS-2 gen çokyapılılığına sahip fertlerin klinik özellikleri

IRS-2 849 ve 1304, 1253 gen çokyapılılıklarının hasta ve kontrol grupları üzerindeki etkisi bazı klinik parametreler ile analiz edildi. Sonuçlar tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. IRS-2 gen çokyapılılığı olan fertlerin klinik özellikleri

	Thr 849 Ser	Arg 1304 Gly - Lys 1253 Asn- Cys 1318 Arg		Gençokyapılılığı olmayan fertler	
	Tip 2 şeker hastaları	Tip 2 şeker hastaları	Kontrol grubu	Tip 2 şeker hastaları	Kontrol grubu
n	6	1	2	115	33
Yaş	52.33± 9.27	63.00	50±1.41	57.53± 8.74	49.36± 9.88
VKİ (kg/m^2)	27.83± 5.91	25.00	26± 1.41	26.31± 2.24	26.85± 2.51
Diyabetin başlangıç yaşı	42.50± 3.89	61.00	-	50.31± 8.74	-
Açlık glukoz	136.50± 20.28	126.00	113.5± 21.92	154.14± 61.79	101.12± 9.18
Açlık insülin	9.63± 4.00	10.00	4.22 ±1.37	8.15± 3.83	8.05± 3.81
HbA1C	6.41± 1.87	6.00	5.55± 1.06	7.26± 2.51	5.32± 0.87
Diyabetin süresi	9.93± 7.63	2.00	-	7.88± 5.52	-
C-peptid	1.78± 0.37	1.8	6.26± 6.71	1.86± 0.86	6.01± 5.48
HOMA	1.37± 0.53	1.4	0.55± 0.21	2.28± 2.54	1.20± 0.78

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Glukoz, insülin ve C-peptidin plazma konsantrasyonları sabah aç karnına ölçülmüştür.

IRS-2 gen çokyapılılığına sahip kontrol grubu fertleri ile gen çokyapılılığına sahip olmayan kontrol grubu fertleri arasında açlık glukoz değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Arg 1304 Gly, Lys 1253 Asn ve Cys Arg gen çokyapılılığına sahip olan kontrol grubu fertlerinin glukoz ortalaması çokyapılılığı olmayan kontrol grubuna göre daha yüksektir ($p<0.05$). Aynı kontrol grupları arasında C-peptid değerleri istatistiksel olarak farklıydı ($p<0.001$). Yani gen çokyapılılığı olan kontrol grubu fertleri arasında C-peptid ortalaması daha yüksek bulunmuştur.

IRS-2 gen çokyapılılığına sahip olan ve olmayan hasta grupları arasında klinik özellikler açısından istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Bu gen çokyapılılıklarının herhagi birisinin varlığında insülin, glukoz, VKİ, C-peptid seviyelerinin ortlama değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

HOMA indeksi açlık glukoz ve insülin değerleri arasında hesaplandı. Bu çeşitliliklere sahip olan ve olmaya hasta ve kontrol grubu arasında HOMA değerleri açısından istatistiki bir fark bulunamadı.

5. TARTIŞMA

Tip 2 şeker hastalığı, bozulmuş insülin salgısı ve insülin direnci ile karakterize olan heterojen bir düzensizliktir (DeFronzo ve ark 1992). Tip 2 şeker hastalığı çok genli kalıtımdır ve birçok gendeki farklı mutasyonun bir araya gelmesinden ve çevresel etkilerden dolayı farklı fenotipte görülür (Cook ve ark 1993). İnsülin direncinin genetik bozuklukları için aday bölgeler insülin alıcı proteini, insülin uyarı iletim yolunu, glukozun periferal kullanımı ve hepatik glukoz üretiminin baskılanmasıyla alakalı insülinle düzenlenen genleri içerir (Taylor ve ark 1988). Tip 2 şeker hastalığının başlıca iki patofizyolojik bozukluğu; bozulmuş insülin uyarısı ve artan insülin isteğini beta hücrelerinin karşılayamamasıdır (Kahn ve ark 1996). İnsülin uyarı ileti yolunda (Sun ve ark 1995) ve beta hücresi gelişimi ve/veya canlılığında önemli rolleri olduğundan dolayı IRS-1 ve IRS-2 Tip 2 şeker hastalığının patogenesisine aday genler olarak bildirilmiştir (Withers ve ark 1998).

Çalışmamızda IRS-1 ve IRS-2 gen çokyapılılığını belirlemek ve Türk hasta ve kontrol grubu fertlerinde tip 2 şeker hastalığının gelişmesine katkısını tespit etmek için her iki genin ekzonunun kodlanmayan ve kodlanan bölgeleri PZR-SSCP tekniği ile analiz edildi. IRS-1 geninin kodlanan bölgesinde amino asit yerdeğişimleriyle sonuçlanan 4 tane gen çokyapılılığı bulunmuştur. Dizi analizi sonucunda bunlardan ikisinin missense, diğer ikisinin ise sessiz mutasyon olduğu belirlenmiştir.

Farklı etnik grupların Tip 2 şeker hastalarının ve 4000'den fazla normal ferdin IRS-1 geninin moleküler taranması amino asit yerdeğişimleri ile sonuçlanan birçok gen çokyapılılığını açığa çıkarmıştır (Almind ve ark 1993, Imai ve ark 1994, Hitman ve ark 1995, Zhang ve ark 1996, Hager ve ark 1993, Mori ve ark 1995, Ura ve ark 1996, Laakso ve ark 1994, Shimokawa ve ark 1994, Lee-Ming ve ark 1996, t Hart ve ark 1999, Lei ve ark 1999, Celi ve ark 1995). Kodon 972'deki Gly-Arg değişikliği (Arg^{972}) IRS-1 geninde bulunan mutasyonların en yaygın olarak görülenidir (Almind ve ark 1993, Imai ve ark 1994, Hitman ve ark 1995, Zhang ve ark 1996, Hager ve ark 1993, Mori ve ark 1995, Ura ve ark 1996, Laakso ve ark 1994, Shimokawa ve ark 1994, Lee-Ming ve ark 1996, t Hart ve ark 1999, Lei ve ark 1999, Celi ve ark 1995). Burada bir nokta mutasyonu glisinden (GGG) argininine (AGG) değişikliğe neden olur (Almind ve ark 1993, Imai ve ark 1994).

Çalışmamızda, Gly^{972} Arg yerdeğişimini tip 2 şeker hastalarda % 3.2, kontrol grubunda

% 11.4 olarak bulduk. Kontrol ve hasta grubumuz arasındaki sayı farkından dolayı, bu gruplar arasında bu gençokyapılılığının görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak bir fark vardı. Kontrol grubunda Arg^{972} g ençokyapılılığı istatistiksel olarak daha yüksekti. Sunulan çalışmada Arg^{972} gen çokyapılılığı daha önce bildirilen Finli (% 9.8), Danimarkalı (% 11.6), Fransız (% 9.9), Güney Amerikalı (% 10.3) ve İtalyan (% 22.6) toplumlarındaki tip 2 şeker hastalarından daha düşük sıklıkta, Tayvanlı tip 2 şeker hastalarından (1.2) daha yüksek sıklıkta bulundu (Almind ve ark 1993, Laakso ve ark 1994, Imai ve ark 1994, Hitman ve ark 1995, Hager ve ark 1993, Lee-Ming ve ark 1996). Kontrol grubumuz ise Finli (% 8.7), Danimarkalı (% 4), Fransız (% 6.9), Güney Amerikalı (% 5.3) toplumların kontrol grubundan daha yüksek sıklıkta (Almind ve ark 1993, Laakso ve ark 1994, Imai ve ark 1994, Hitman ve ark 1995), İtalyan (% 12.5) kontrol grubundan ise daha düşük sıklıkta bulundu (Hager ve ark 1993). Kontrol grubumuzun görülme sıklığının yüksek oranda görülmesi bu grubu oluşturan fert sayısının düşük olmasından kaynaklanabilir. Özata ve ark (2005) yaptığı çalışmada Arg^{972} gen çokyapılılığı tip 2 diyabetik hastalarda % 15.8, kontrol grubunda % 12.9 olarak bildirilmiştir. Arg^{972} ve Pro^{513} gen çokyapılılığı Pima yerlilerinde görülmemiştir (Celi ve ark 1995). Pima yerlilerinde bu kodonların tip 2 şeher hastalığının sorumlusu olmadığı bildirilmiştir (Celi ve ark 1995). Arg^{972} gen çokyapılılığının görülme sıklığındaki bu farklılık etnik gruplar arasındaki farklılığı yansıtabilir. Etnik farklılıkların yanında Arg^{972} gen çokyapılılığının görülme sıklığında önemli bölgesel farklılıklar Hoorn ve Rotterdam'dan Hollanda'lı kontrol grupları arasında da gözlendi (% 9.4-% 18.6) (t Hart ve ark 1999). Şeker hastalığı, VKİ ve hiperinsülinema ile IRS-1 mutantının arasında bir ilişki bulunamamıştır (t Hart ve ark 1999). Bizim çalışmamız ile Özata grubunun yaptığı çalışma arasında da önemli bölgesel farklılık bulunmaktadır (% 3.2-%15.8, sırasıyla).

Çalışmamızda $Ala^{513}\rightarrow$ Pro yerdeğişimi tip 2 diyabetli hastalarda % 1.6 bulunmuştur. Bu gen çokyapılılığı kontrol grubunda gözlenmemiştir. $Ala^{513}\rightarrow$ Pro yerdeğişimi Danimarkalı hastalarda (%8.6) (Almind ve ark 1993) ve Fransız Kafkaslarda (Hager ve ark 1993) bulunmuş, Finli (Laakso ve ark1994), Japon (Shimokawa ve ark 1994) ve Güney Hindistanlı (Hitman ve ark 1995) tip 2 şeker hastalarında bulunmamış veya nadir bulunmuştur. Özata grubunun yaptığı çalışmada bu gen çokyapılılığı hasta grupta gözlenmemiş, kontrol grubunda 1 kişide gözlenmiştir. Burada bir nokta mutasyonu alaninden (GCC) proline (CCC) değişikliğe neden olur.

Gly^{972}→ Arg yerdeğişimi küçük yüksüz bir aa ile yüklü büyük bir aa'in yerdeğişimidir ve PI 3-kinazın iki bağlanma bölgesinde meydana gelen bir değişimdir (Kahn 1994). Ala^{513}→ Pro yerdeğişimi de PI 3-kinazın iki bağlanma bölgesi arasında meydana gelmiş bir değişimdir. Prolinin α-heliks yapısını bozduğu bilinmektedir (Celi ve ark 2000). Her iki değişiklik de korunmamıştır ve IRS-1 proteininin yapısında yapısal değişikliklere neden olarak işlevini bozabilirler (Almind ve ark 1993).

Met 613 Val, Ser 1043 Tyr, Cys 1095 Tyr, Ser 892 Gly çeşitlilikleri bizim çalıştığımız toplumda bulunmamıştır. Bu çeşitliliklerin bulunamaması örnek büyüklüğünden dolayı olabilir. Bu mutasyonlar diğer toplum çalışmalarında da nadir bulunmuştur (Celi ve ark 2000, Sanchez-Corona ve ark 2004).

Çin toplumunda yapılan çalışmada, iki yeni çeşitlilik CCA→CCC ($P^{737}P$) ve CCT →TCT ($P^{1079}S$), iki sessiz mutasyon GAT→GAC ($D^{422}D$) ve CCA→CCC ($P^{737}P$) bulunmuştur (Zeng ve ark 2000). Bu dört çeşitlilik sadece hasta grupta görülmüştür. Çin toplumundaki Gly^{971} varyasyonunun sıklığı Japon hastalarıyla benzer bulunmuştur (Ura ve ark1996). $P^{1079}S$ yerdeğişimi, hidrofobik bir aa ile hidrofilik bir aa arasında olmuştur. Y^{1012} XXM yakınında yerleşmiş prolinin serinle yerdeğişimi IRS-1 proteininin de yapısal değişikliğe neden olabilir ve onun fonksiyonunu bozabilir (Zeng ve ark 2000).

NIDDM'li Kafkas'larda Arg^{972} gençokyapılılığından başka Gly→Arg^{819} ve Arg→ Cys^{1221} gençokyapılılıkları da bulunmuştur (Imai ve ark 1994, Imai ve ark 1997). Bu hastalar aynı zamanda IRS-1 Arg^{972} için de heterozigottu. Cys^{1221} iki potansiyel tirozin fosforilasyon (Tyr^{1179} ve Tyr^{1229}) bölgesi arasında yerleşmiştir. Bu bölgelerin tirozin protein fosfataz SHP-2'ye bağlanmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu iki IRS-1 polimofizmi, Cos7 hücrelerinde ifade edilen IRS-1'in ifadesi ve işlevinde bir değişikliğe neden olmamıştır (Imai ve ark 1997).

IRS-1 Arg^{972} çeşitliliğine sahip olan Danimarkalı beyaz diyabetik hastaların açlık plazma insülin ve C-peptid seviyelerinin daha düşük bulunduğu rapor edilmiştir (Almind ve ark 1993). Arg^{972} çeşitliliği için heterozigot olan glukoz toleranslı hastalarda taşıyıcı olmayanlara göre, oral glukoz yüklemesine cevaben insülin seviyesinin düştüğü ve hiperinsülinemik klamp esnasında insülin salgısında azalma olduğu gözlenmiştir (Stumvoll ve ark 2001). Bu toplumda IRS-1 Gly 972 Arg gençokyapılılığının β hücre işlevinin biyolojik değişimine yardımcı olduğu gösterilmiştir (Stumvoll ve ark 2001). Yapılan bu çalışmaların sonucunda, diğer aday genler ve çevresel faktörlerle beraber Arg^{972} IRS-1 gençokyapılılığının tip 2 diyabetin tipik özellikleri olan periferal insülin

direnci ve bozulmuş insülin salınımına neden olduğu yorumu yapılabilir (Sesti ve ark 2001).

Bizim çalışmamızda IRS-1'de bulduğumuz 2 gen çeşitliliğinin diyabetik hastaların insülin seviyesinde herhangi bir etkisinin olmadığını gözledik. Bu çeşitlilikleri taşıyan tip 2 diyabetik hastaların fenotiplerinde belirlenebilir bir farklılık bulunamadı. İnsülin, glukoz ve C-peptidin ortalama seviyeleri açısından hasta ve kontrol gruplarında istatistiki olarak anlamlı bir fark yoktu. Özata ve ark (2005), Arg^{972} çeşitliliği taşıyan hastalarda düşük açlık insülin seviyesi tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda insülin seviyesinde bir farklılık görülmemesinin nedeni Arg^{972} çeşitliliğini taşıyan hasta sayımızın az olmasından kaynaklanabilir.

Tayvan, Güney Amerika ve İtalyan toplumlarında yapılan çalışmalarda da düşük insülin seviyesi ile IRS-1 $Gly^{972} \rightarrow$Arg gençokyapılılığı arasında bir ilişki bulunamamıştır (Celi ve ark 2000, Chuang LM ve ark 1996, Imai ve ark 1994).

İnsülin sentezi ve salgısı; insülin alıcı protein fosforilasyonu, IRS-1'in tirozin fosforilasyonu ve PI 3-kinazın aktivasyonunu içeren insülin uyarı iletiminin otokrin aktivasyonuyla sağlanır (Xu ve ark 1999, Porzio ve ark 1999, Kulkarni ve ark 1999). Bu sonuçlar, IRS-1 Arg^{972} gençokyapılılığını β hücresi insülin salgısını etkileyebileceğini önerir. Sıçan RIN β hücre hattındaki Arg^{972} çeşitliliğinin ifadesi, PI 3-kinazın p85 altünitesinin IRS-1'e bağlanmasında %60 azalma ve IRS-1'in PI 3-kinaz ile aktivitesinde %50 azalmayla sonuçlamıştır (Porzio ve ark 1999). Endojen IRS-2'nin ifadesi ve fonksiyonu etkilenmemiştir (Porzio ve ark 1999). IRS-1 Arg^{972} taşıyıcılarından izole edilen pankreatik adacıklar IRS-1 ile ilişkili PI 3-kinaz aktivitesinde bozulma, insülin salgısında azalma ve apoptosiste artma göstermiştir (Federici ve ark 2001). Sağlıklı normaller ile karşılaştırıldığında insülinin antiapoptotik etkisine direnç olduğu gözlenmiştir (Federici ve ark 2001). PI 3-kinaz/Akt canlılık yolunun bozuk bir işlevi proapoptotik protein Bad'ın fosforilasyonunun azalması ve etkinsizleştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen Bcl-2 ailesinin proteinlerinden olan Bad, IRS-1 Arg^{972} taşıyıcılarından izole edilen pankreatik adacıkların gözlenenen apoptosisi için sorumlu bir mekanizma açığa çıkarmıştır (Federici ve ark 2001).

Kodon 972'deki Gly → Arg değişikliğinin insülin işlevi ve salgısı üzerindeki işlevsel etkileri birçok in vitro çalışmada rapor edilmiştir (Hribal ve ark 2000, Porzio ve ark 1999, Almind ve ark 1996, Yoshimura ve ark 1997, Imai ve ark 1997). 32D IR hücrelerinde IRS-1 Arg^{972} çeşitliliğinin ifadesi PI 3-kinaz'ın p85 altünitesinin IRS-1 çeşitliliğine bağlanmasında özgün bir bozukluğa neden olduğunu göstermiştir (Almind ve

ark 1996, Yoshimura ve ark 1997). IRS-1 ile PI 3-kinaz aktivitesinde %36-39 azalma olmuştur. Gly→Arg^{972} değişikliği IRS'nin ifadesinin seviyesini ve IRS-1'in insülinle uyarılan tirozin fosforilasyonunu değiştirmediği bildirilmiştir. IRS-1 ile PI 3-kinazın SH2 alanları arasındaki ilişki, IRS-1'in üçüncül yapısının değişmesi ile bozulur (Almind ve ark 1996, Yoshimura ve ark 1997). Bu bozulma insülinin mitojenik etkilerinde %32 azalmayla gözlenmiştir (Almind ve ark 1996, Yoshimura ve ark 1997). Aynı çalışmada Pro170 R ve Met 209 T değişimleri de bulundu. Bu değişimlerle MAP kinaz ve PI 3-kinaz aktivitelerinde azalma görülmüştür (Almind ve ark 1996, Yoshimura ve ark 1997). Pro^{170} ve Met^{209} IRS-1'in PTB alanında yerleşmiştir ve Pro→Arg ve Met→Thr yerdeğişimi ile IRS-1 proteininin PTB alanında meydana gelen yapısal değişikliklerinden dolayı, IRS-1'in insülin alıcı proteinine bağlanması azalmıştır (Yoshimura ve ark 1997). PTB alanının insülin alıcı proteini NPXY motifi için bağlanma bölgesi β4 ve β5 strandlarıdır. Met^{209}, PTB alanının β4 ve β5 dizisi ile ilişki kuran helikal dönüşte yerleşmiştir ve fosfotirozin dizisi için bir bağlanma bölgesi oluşturur. Bu aa yerdeğişiminden dolayı, insülin alıcı proteininin NPXY motifine IRS-1 bağlanması bozulur. Pro^{170}, β tabakasının altında form alan şapkaya yerleşmiştir ve IRS-1 PTB alanının yapısını korumada önemli rol oynayabilir. Bu iki aa yerdeğişimi, IRS-1 PTB alanının yapısal değişikliği ile insülin alıcı proteinine bağlanma işlevini bozmuştur (Yoshimura ve ark 1997). Sunulan çalışmada Pro^{170} →R ve Met^{209}→T değişimleri bulunmadığından dolayı insülin salınımında önemli bir fark bulunamamıştır.

Kodon 972 çeşitliliği, adacık hücre farklılaşması ve olgunlaşmasını da etkileyebilir. Buna bağlı olarak β hücre cevabında azalma meydana gelebilir (Almind ve ark 1996). L6 iskelet kası hücrelerinde IRS-1 Arg^{972} varyantının ifadesi, sağlıklı normal IRS-1 ifade eden L6 hücreleriyle karşılaştırıldığında, bazal ve insülinle uyarılan glukoz naklinde azalma görülmüştür (Hribal ve ark 2000). Bu değişiklikler hem insülin cevabında hem de bazal durumda plazma zarına GLUT4 naklinin miktarındaki azalmayla ilişkilidir. Ancak total hücresel GLUT4 protein içeriğinde değişiklik olmamıştır. Ser/Thr Akt kinaz glukoz nakli ve glukoz nakledicilerin plazma zarına geçişini içeren insülinin birçok biyolojik fonksiyonunu PI 3-kinaza bağlayan bir anahtar enzim olarak rol oynar (Hajduch ve ark 1998). Bu fikirle uyumlu olarak, L6 miyositlerindeki IRS-1 Arg972 çeşitliliğinin ifadesi IRS-1 ve PI 3-kinaz arasındaki ilişkinin bozulmasından dolayı Akt fosforilasyonu ve aktivitesinde önemli bir azalma rapor edilmiştir (Hribal ve ark 2000). Akt aynı zamanda glukojen sentaz kinaz 3 (GSK-3)'ün fosforilasyonu ve inaktivasyonunu içeren bir mekanizma ile glukojen sentezinin düzenlenmesiyle de ilişkilidir. L6 miyositlerinde IRS-1

Arg^{972} çeşitliliğinin ifadesi Akt ile GSK-3 fosforilasyonu ve inaktivasyonunda önemli bir azalmayla sonuçlanmıştır. IRS-1 Arg^{972} gençokyapılılığı insülinin PI 3-kinaz/Akt/GSK-3 uyarı ileti yolunu aktive etme yeteneğini bozarak insülin direncine neden olur (Hribal ve ark 2000). Böylece glukoz nakli, glukoz nakledicilerinin translokasyonu ve glukojen sentezinde bozukluklar meydana gelir (Hribal ve ark 2000).

Japon toplumunda, insülin direnci (hiperinsülinemik-öglisemik klamp ile ölçüldü) gençokyapılılığı olmayan grupla karşılaştırıldığında, Arg^{972} gençokyapılılığı olan tip 2 diyabetli hastalarda %29.5 ve normal grupta %22 azalmıştır (Ura ve ark 1996). Bu toplumda bulunan Pro^{170}→Arg yerdeğişimi bilinen ATP bağlanma bölgesinin yakınında yerleşmiştir (Sun ve ark 1991). Pozitif yüklü büyük Arg aa ile imino gruplu yüksüz Pro aa'i yerdeğiştirmiştir. Met^{209}→Thr yerdeğişimi PTB ve PH alanları arasında yerleşmiştir (Gustafson ve ark 1995). Metionin hidrofobik sülfür, Thr hidrofilik bir aa'dir.

Tip 2 şeker hastalığı heterojen hastalık olduğundan dolayı, Arg^{971} IRS-1 polimorfizmi şeker hastalığı oluşumuna katkıda bulunan diyet, fiziksel aktivite ve yaş gibi çevresel faktörlerin bir araya gelmesiyle işlev yapabilir. Şişmanlık ile kodon 972 gen çokyapılığının heterozigot formunun birleşmesi, insülin hassasiyetinde %50 azalma ile ilişkilidir (Clausen ve ark 1995). IRS-1 Arg^{972} gen çokyapılılığınına sahip şişmanlar, serum trigliserit, plazma doku plazminojen aktivatör, onun inhibitörü PAI-1 ve plazma glukozun yükselen açlık seviyeleri ile metabolik kardiyovasküler risk faktörlerinin öbeklenmesi ile de karakterize edilir. Bu da gen çokyapılılığının şişmanlık ile bağlantılı insülin direncinin gücünü arttırdığını göstermektedir (Clausen ve ark 1995). Çalışmamızı oluşturan hasta grubu şişman olmayan fertlerden oluştuğundan gen çokyapılılığı olan fertlerle olmayan fertler arasında insülin direncinde bir fark görülmemiştir. İngiltere'de (UK) ileriye dönük şeker hastalığı çalışmasından seçilen örneklerin bir grubunda (UKPDS), Arg^{972} IRS-1 gen çokyapılılığının insülin direnci ve dislipidemi olan tip 2 şeker hastalarında (%26), sadece insülin direnci olanlara (%18) göre yüksek bulunmuştur (Zhang ve ark 1996). Anjiografi yapılan koroner arter hastalarında Arg^{972} IRS-1 polimorfizminin, kontrol grubuna göre 2.8 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Baroni ve ark 1999). Diğer risk faktörleri de eklendiğinde, Arg^{972} IRS-1 gen çokyapılılığı ile ilişkili koroner arter hastalığının nisbi riski normal sağlıklı fertlere göre 2.93 kat daha yüksek bulunmuştur. Şişman fertlerde 6.97 kat, insüline direnç sendromunun klinik özelliklerini taşıyan kişilerde 27.3 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir (Baroni ve ark 1999). Bu toplumda Arg^{972} IRS-1 gen çokyapılılığı şeker hastalığı, hipertrigliserid ve

hiperkolesterolemi ile ilişkili bulunmuştur (Baroni ve ark 1999). Bu sonuçlar, 169 tip 2 şeker hastası şişmanlarla yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu değildi (Grant ve ark 1995). Bu ayrı bulguların; etnik farklılıklar, insülin direncinin farklı derecesi, diğer metabolik faktörlerle ilişki, toplumlardaki grupların farklı sayılarından dolayı olduğu açıklanabilir (Sesti ve ark 2001).

IRS-1'in yaygın formu Gly^{972}→Arg Türk toplumundaki tip 2 şeker hastalarında çok sık bulunmadı ve insülin direnci bu hastalarda yüksek bulunmadı. Bu nedenle bu genin diğer genetik ve çevresel faktörlerle beraber insülin direncini etkileyeceğini düşünmekteyiz. Bu gen çokyapılılığının tek başına insülin direnci ve tip 2 şeker hastalığı patogenesisinde belirleyici bir rol oynamadığını söyleyebiliriz. Koroner arter hastaları ve şişman şeker hastalarından oluşturulan ayrı bir grup ile IRS-1 ve IRS-2 gen bölgelerinin çalışılması sunulan çalışmadan sonra hedeflenen araştırmalardır. Böylece bulunan gen çokyapılılıklarının risk faktörleri ile birleştiğinde bizim toplumumuzdaki tip 2 şeker hastaları üzerindeki etkisi daha iyi anlaşılacaktır.

Fare IRS-1 geninin hedeflenmiş parçalanması ile homozigot IRS-1 (-/-) farelerinin glukoz toleransında anormallikler görülmüştür (Araki ve ark 1994). Heterozigot IRS-1 (-/-) farelerde ise bu anormallikler görülmemiştir (Araki ve ark 1994). Bizim çalışmamızda IRS-1 gen çokyapılılığına sahip olan fertler gen çokyapılılıkları için heterozigottu. IRS-1 geninin homozigot gen çokyapılılıkları şeker hastalığının gelişmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Ala^{513} →Pro, Gly^{972}→Arg, Pro^{170}→Arg, Met^{209}→Thr IRS-1 çeşitliliklerinin in vitro ifadesi ve işlevsel çalışmaları tartışmalıdır (Celi ve ark 2000). Bazı çalışmalarda, bu çeşitliliklerin insülin alıcı proteini ile fosforillenme yeteneklerinin azaldığı bildirilirken (Almind ve ark 1996, Yoshimura ve ark 1997) diğer bazı çalışmalarda ise normal IRS-1 proteinleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Imai ve ark 1997). Bu bulgular, IRS-1'in insülinin metabolik uyarılarını iletmede oldukça büyük rol oynamadığını veya alternatif olarak yardımcı yolların IRS-1 bozukluğunu telafi etmede rol oynadığını düşündürmektedir (Patti ve ark 1995).

Çalışmamızda IRS-2 gen çokyapılılığını belirlemek ve Türk hasta ve kontrol grubu fertlerinde tip 2 diyabetin gelişmesine katkısını tespit etmek için IRS-2 genin ekzonunun kodlanmayan ve kodlanan bölgeleri PZR-SSCP tekniği ile analiz edildi. IRS-2 geninin kodlanan bölgesinde amino asit yerdeğişimleriyle sonuçlanan 10 tane gen çokyapılılığı bulunmuştur. İki yönlü dizi analizi sonucunda bunlardan altısının missense, dördünün ise sessiz mutasyon olduğu belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada, Thr^{849}→Ser yerdeğişimini tip 2 şeker hastalarda % 5 oranında bulundu, kontrol grubunda ise bu yerdeğişimi gözlenmedi. Burada bir nokta mutasyonu treoninden (ACC) serine (AGC) değişikliğe neden olur. Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn, Cys^{1318}→Arg gen çokyapılılıkları hasta fertlerde %2.5, kontrol grubunda %5.7 bulunmuştur. Kontrol grubumuzda bu gen çokyapılılıklarının yüksek oranda görülmesi bu grubu oluşturan fert sayısının düşük olmasından kaynaklanabilir. Bizim toplumumuzda görülen bu gen çokyapılılıkları yeni mutasyonlardır ve daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmemişlerdir.

Thr^{849}→ Ser yerdeğişimi yüksüz hidrofilik bir aa ile yine yüksüz hidrofilik bir aa'in yerdeğişimidir ve PI 3-kinazın p85 düzenleyici alt bölgesinin bağlandığı bölgede meydana geldiği değişimdir (Sun ve ark 1993). Fakat bu bölgedeki değişim aa yapısı bakımından farklı olmadığı için PI 3-kinazın bağlanmasında bir sorun meydana gelmeyebilir. Bu yerdeğişimine sahip hasta ve kontrol grubu ile sahip olmayan hasta ve kontrol grubu arasında açlık glukoz, insülin, C-peptid ve HbA1C değerlerinin istatistiki açıdan farklı olmayışının nedeni bu olabilir. Bu çeşitliliğin insülin uyarı ileti yolunu etkilemediği söylenebilir.

Arg^{1304}→Gly yerdeğişimi yüklü büyük bir aa ile küçük yüksüz bir aa'in değişimi ile olur. Nokta mutasyonu argininden (CGC) glisine (GGC) değişikliğe neden olur. Bu değişikliğin olduğu yer SHP2'nin bağlandığı yerdedir. Lys^{1253}→Asn, Cys^{1318}→Arg yerdeğişiklikleri de SHP2'nin bağlandığı yere yakın olan bölgelerdir. Cys^{1318}→Arg değişimi küçük yüksüz bir aa ile yüklü büyük bir aa yerdeğişimi ile oluşur. SHP2, insülin alıcı proteininin düzenleyici halkasındaki fosforillenmiş Tyr1146'ya da bağlanır (Kharitonenkov ve ark 1995). Bu da insülin alıcı proteini ve IRS-2 arasında oldukça kararlı bir bağlantı sağlayabilir. Bu ilişki insülinle uyarılan glukoz girişi sırasında da bir rol oynayabilir (Kharitonenkov ve ark 1995). Bu üç gen çokyapılılığı da IRS-2 proteininin yapısal değişikliğine neden olarak işlevini bozabilirler. Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn ve Cys^{1318}→Arg yerdeğişikliğine sahip kontrol gruplarının glukoz seviyeleri bu değişiklikleri taşımayan kontrol grubu fertlerinden istatistiki olarak yüksek bulunmuştur. Bu bölgelerdeki değişiklikler SHP2'nin bağlanmasında bozukluğa neden olup, IRS-2 ile SHP2'nin aktivitesindeki azalmayla glukoz girişinin azalmasını sağladığı yorumu yapılabilir. Ayrıca inaktif SHP2 insülinle uyarılan MAP kinaz ve c-fos transkripsiyonunu da baskılar (Yamauchi ve ark 1995). Dolayısıyla bu bozulma insülinin mitojenik etkilerinde de azalmaya neden olabilir. Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn ve Cys^{1318}→Arg

gençokyapılılıklarına sahip olan ve olmayan hasta grubu arasında açlık glukoz, insülin, HbA1C arasında istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır. Çalışma grubumuzdaki hasta ve kontrol fertlerinin sayısının arttırılması ile bu değişikliklerin etkisini daha çok göreceğimizin inancındayız. Gen çokyapılılıklarının görülme sıklığı kontrol grubunda (%17.1) hasta grubundan (%12.5) daha yüksek görülmesi iki grup arasındaki sayı farkından olabilir.

Kodon 1057'deki Gly→Asp gen çokyapılılığı IRS-2 geninde bulunan mutasyonların en yaygın olarak görülenidir (Bernal ve ark 1998, Almind ve ark 1999, D'Alfonso ve ark 2003, Mammarelle ve ark 2000, Stefan ve ark 2003, Wang ve ark 2001). Burada bir nokta mutasyonu glisinden (GGC) asparagine (GAC) değişikliğe neden olur (Stefan ve ark 2003).

IRS-2'si olmayan farelerin fenotiplerine zıt olarak, insan IRS-2 geninin gen çokyapılılığı ne tip 2 şeker hastalığının yaygın formuna ne de erken başlangıçlı otozomal dominant tip 2 şeker hastalığına neden olduğu gözlenmemiştir (Bernal ve ark 1998, Kalidas ve ark 1998, Almind ve ark 1999, Bektas ve ark 1999, Mammarella ve ark 2000). Almind ve ark (1999) tip 2 şeker hastaların özendirici (promotor) dizilerinde genetik değişkenlik olmadığını rapor etmişlerdir. IRS-2 ifadesinin seviyesindeki değişimlere neden olan mutasyonların nadir olabileceğini önermişlerdir (Almind ve ark 1999).

Yaygın olarak görülen kodon 1057'deki Gly → Asp IRS-2 gen çokyapılılığı Danimarka toplumunda belirlenmiştir (Bernal ve ark 1998). Bu değişimin allelik sıklığı normal grupta (%33.9), tip 2 diyabetli hastalarda (%33.8) bulunmuştur. Aynı toplumda kodon 879'da Gly→Ser yerdeğişimi de saptanmıştır. Kontrol ve şeker hastaları grubları arasında bu yerdegisimin gorulme sikligi farkli degildi (Bernal ve ark 1998).

Asp^{1057} IRS-2 çeşitlililiğinin insülin salgısı ve hassasiyeti üzerindeki potansiyel etkisi glukoza toleranslı İskandinav hastalarda çalışılmıştır (Almind ve ark 1999). Bu gen çokyapılılığın 363 genç, sağlıklı Danimarka'lı grupta ve 228 glukoza toleranslı Danimarka'lı grupta insülin salgısı ve hassasiyeti üzerinde bir etkisi belirlenmemiştir (Almind ve ark 1999). Bu sonuçlardan farklı olarak, aynı çalışmada 236 orta yaşlı glukoza toleranslı Danimarka'lı hastada Asp^{1057} IRS-2 çeşitililiği homozigot olarak bulunmuştur. Bu grup, sağlıklı normal taşıyıcılarla karşılaştırıldığında açlık insülin seviyesinde %25 ve açlık C-peptid seviyesinde %17 azalma gözlenmiştir (Almind ve ark 1999). Asp^{1057} IRS-2 çeşitliliğinin homozigot taşıyıcılarının serum insülin ve C-peptid derişiklikleri oral glukoz tolerans testi esnasında düşük olarak kalmıştır (Almid ve ark 1999). Asp^{1057} IRS-2

çeşitliliğinin homozigot taşıyıcılarında plazma glukoz seviyelerinde bir değişiklik saptanmamıştır.

İtalyan toplumunda tip 2 şeker hastalığı ve Asp^{1057} çeşitliliği arasında bir ilişki olup olmadığını çalışmışlardır (Mammarella ve ark 2000). 27 $kg/m^{2'}$den düşük vücut kitle indeksine sahip homozigot Asp^{1057} IRS-2 genotipinin görülme sıklığı, kontrol fertleri ile tip 2 şeker hastalar karşılaştırıldığında düşük, 27 kg/m^2'den büyük vücut kitle indeksine sahip homozigot Asp^{1057} IRS-2 genotipinin görülme sıklığı ise tip 2 şeker hastalarda yüksek bulundu (Mammarella ve ark 2000). Şişman Asp ^{1057} taşıyıcılarında tip 2 şeker hastalığı riskini geriye götüren etkili bir değiştirici olduğu önerilmektedir (Mammarella ve ark 2000). Çinli Han toplumunda yapılan çalışmada IRS-2 ile tip 2 şeker hastalığı arasındaki ilişkinin şişmanlık ile arttığı rapor edilmiştir (Kong ve ark 2005). β-hücresinin işlevsel bozukluğuyla Gly $^{1057}\rightarrow$ Asp gen çokyapılılığının bir ilişkisi olmadığı rapor edilmiştir (Fritsche ve ark 2001). Asya yerlileri ile yapılan toplum çalışmasında, şişman hastalarda DD genotipinin tip 2 şeker hastalığının direncini arttırdığı bildirilmiştir (Bodhini ve ark 2006).

Nadir olarak görülen kodon 647'deki IRS-2 Leu→Val değişikliği tip 2 şeker hastası olan Danimarka'lı hastaların 413'ünün 3'ünde gözlenmiş ve 280 glukoza toleranslı hastaların hiç birinde gözlenmemiştir (Almind ve ark 1999). Val^{647} IRS-2 çeşitliliği KRLB alanında yerleşmiştir. KRLB alanı insülin alıcı proteini β altünitesi ile ilişkilidir (Sawka-Verhelle ve ark1996). IRS-2 Val^{647} çeşitliliği YMXM motifinde Tyr^{653} dizisine yakındır. Bu bölge PI 3- kinazın p85 düzenleyici altünitesi için bağlanma bölgesidir. Maya iki-hibrid sisteminde, IRS-2 Val^{647} çeşitliliğinin ifadesi insülin alıcı proteini ve PI 3-kinazın p85 altünitesi ile IRS-2 KRLB alanının ilişkisini etkilemediği bildirilmiştir (Sawka-Verhelle ve ark 1996). IRS-2 genindeki gen çokyapılılıklarının tip 2 şeker hastalarında insülin hassasiyeti ve salgısı üzerinde yardımcı fonksiyonel etkisinin olmadığı önerilmektedir (Sesti ve ark 2001). Bizim çalıştığımız toplumda Val^{647} gen çokyapılılığı gözlenmemiştir. Bu mutasyon diğer toplum çalışmalarında da nadir bulunmuştur (Almind ve ark 1999, Wang ve ark 2001, D'Alfonso ve ark 2003).

Sunulan çalışmada, IRS-1 geninde bulunan 2 gençokyapılılığı ve IRS-2 geninde bulunan 4 gen çokyapılılığı tip 2 diyabetli hastaların fenotiplerinde belirlenebilir bir farklılık göstermemiştir. Sonuç olarak, Türk toplumunda IRS-1 Ala513Pro, IRS-2 Arg1304Gly, Lys1253Asn ve Cys1318Arg gen çokyapılılıkları nadir, IRS-1 Gly972Arg gen çokyapılılığı ve IRS-2 Thr849Ser ve Asp1057Pro gen çokyapılılıkları sık bulunmasına rağmen tip 2 şeker hastalığının başlıca genetik belirleyicileri değillerdir.

IRS-1 ve IRS-2 genlerindeki mutasyonların tip 2 diyabetin gelişmesine yardımcı olan baskın genetik faktörler olduğu hipotezi bugüne kadar yapılan çalışmalarda tam olarak desteklenmemiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar diğer genetik ve çevresel faktörlerle beraber insüline direnci etkileyebilir. İnsülin direnci ve tip 2 şeker hastalığının patogenesisinde IRS-1 ve IRS-2 tek başlarına belirleyici rol oynamayabilirler. Tip 2 şeker hastalığının patogenesisine neden olan aday PPARgama2, TCF7L2, CAPN10, KCNJ11, insülin alıcı proteini, adiponektin ve HNF-1 alfa gibi genleri aynı hasta grubuyla çalışılıp heterojen düzensizliğe sahip, çok genli kalıtımlı tip 2 şeker hastalarının bir kısmının klinik fenotiplerini tanımlayabilir. Bu genlerde bulunan gen çokyapılılıklarının insülin uyarı ileti yolunu nasıl etkilediği yönündeki araştırmalar da tip 2 şeker hastalığının patogenesisini anlamada bize ışık tutacaktır.

6. ÖZET

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA - 2006

Melda (AKSOY) HEPDOĞRU

İç Anadolu Toplumunda Tip 2 Diyabetli Hastaların IRS-1 ve IRS-2 Gen çokyapılılığının Taranması

İnsülin alıcı protein (reseptör)-1 (IRS-1) ve -2 (IRS-2) substratları insülin alıcı proteini tirozin kinaz için endojen ara maddelerdir ve insülin uyarı ileti sisteminde anahtar rol oynarlar. IRS-1 ve IRS-2'nin fosfatidilinositol (PI) 3-kinazı aktive ettikleri ve GLUT 4 taşınımını ilerlettikleri gösterilmiştir. IRS-1 ve IRS-2 genleri tip 2 diyabetes mellitusun gelişimi için aday genlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insan IRS-1 ve IRS-2 genlerinde birçok gençokyapılılığı belirlenmiştir. Bu gençokyapılılıklarının görülme sıklığı tip 2 diyabetik hastalar arasında yüksektir. Bu çalışmada, IRS-1 ve IRS-2 gen çokyapılılıklarınının görülme sıklığını Türk hasta ve kontrol grubunda belirledik ve bu gençokyapılılıklarının tip 2 diyabetes mellitus gelişimine katkısını tespit ettik. Çalışma grupları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalının hastalarından seçildi. Yaş ve vücut kitle indeksleri birbirleriyle uyumlu, 122 tip 2 diyabetli zayıf hasta ve ailesinde diyabet hikayesi ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan 35 kontrol ferdi seçildi. IRS-1 (20 adet birbiriyle çakışan bölüme ayrıldı) ve IRS-2'nin (15 adet birbiriyle çakışan bölüme ayrıldı) kodlanan ve kodlanmayan dizileri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve tek zincirli konformasyonal polimorfizmi (SSCP) ile tarandı. IRS-1 geninde iki missens (Gly^{972} →Arg, Ala^{513} →Pro) ve iki sessiz (GAC→GAT; Asp^{90}, TCT→TCA; Ser^{487}) mutasyon bulundu. Bu çeşitlilikler ve diyabet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Gly^{972}→Arg mutasyonu 4/122 hasta ve 4/35 hastada görülmesiyle diğer mutasyonlara göre daha yaygındı. Bu gençokyapılılığı tüm fertler için heterozigottu. IRS-2 geninde dört missens (Thr^{849}→Ser, Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn, Cys→Arg) ve altı sessiz mutasyon (CCT→CCC; Pro^{483}, GCT→GCC; Ala^{488}, GGT→GGC; Gly^{497}, CCC→CCT; Pro^{829}, ACC→ACG; Thr^{845}, TGT→TGC; Cys^{807}) bulunmuştur. IRS-

2 geninin kodlama bölgesinde dört yeni amino asit çeşitliliği belirlenmiştir. Bu çeşitlilikler ve diyabet arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sonuç olarak, toplumumuzda IRS-1 Ala513Pro, IRS-2 Arg1304Gly, Lys1253Asn ve Cys1318Arg gençokyapılılıkları nadir, IRS-1 Gly972Arg gençokyapılılığı ve IRS-2 Thr849Ser ve Asp1057Pro gençokyapılılıkları sık bulunmuşlardır. Fakat tip 2 diyabetin başlıca genetik belirleyicileri değillerdir.

7. SUMMARY

Melda (AKSOY) HEPDOĞRU

Screening of Type-II Diabetes Mellitus Patients from Central Anatolian Region for IRS-1 and IRS-2 Gene Polymorphisms

Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and -2 (IRS-2) are an endogenous substrate for the insulin receptor tyrosine kinase, which play a key roles in insulin signalling. They have been shown to activate phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and promote GLUT 4 translocation. IRS-1 and IRS-2 genes are potential candidates for development of type 2 diabetes mellitus. Recent studies have identified several polymorphism in the human IRS-1 and IRS-2 genes that are increased in prevalence among type 2 diabetic patients. In this sudy, we have identified IRS-1 and IRS-2 gene polymorphisms, evaluated their frequencies in Turkish subjects, and analysed the contribution of these polymorphisms to the development of type 2 diabetes mellitus. Study subjects were recruited from patients of Endocrinology Department, Selçuk University Meram Medical Faculty. We chose 122 unrelated, non-obese patients with type 2 diabetes mellitus and 35 unrelated, non-diabetic subjects with no family history of diabetes as age and body mass index matched control subjects. The coding and noncoding sequence of the IRS-1 (divided into 20 overlapping fragments) and IRS-2 gene (divided into 15 overlapping fragments) were amplified by polymerase chain reaction and screened for the presence of single stranded conformational polymorphisms (SSCP). Two missens (Gly^{972} →Arg, Ala^{513} →Pro) and two silent mutation (GAC→GAT encoding Asp^{90}, TCT→TCA encoding Ser^{487}) were detected in IRS-1 gene. There was no significant association found with any of these variants and diabetes. The Gly^{972}→Arg mutation was relatively more common in with 4/122 diabetic patients and 4/35 non-diabetic controls being heterozygous for this variant. Four missense (Thr^{849}→Ser, Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn, Cys→Arg) and six silent mutation (CCT→CCC encoding Pro^{483}, GCT→GCC encoding Ala^{488}, GGT→GGC encoding Gly^{497}, CCC→CCT encoding Pro^{829}, ACC→ACG encoding Thr^{845}, TGT→TGC encoding Cys^{807}) were detected in IRS-2 gene. The Thr^{849}→Ser mutation was more common in with 6/122 diabetic patients for this variant. Four novel amino acid variants were described and identified in the coding region of the IRS-2 gene. There was no significant association found with these variants and diabetes. As a conclusion, IRS-1 Ala^{513}→Pro and IRS-2 Arg^{1304}→Gly, Lys^{1253}→Asn ve Cys^{1318}→Arg mutations rare and

IRS-1 Gly^{972}→Arg, IRS-2 Thr^{849}→Ser mutations were common in our population. But may not be major determinants in genetic susceptibility to type 2 diabetes.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

Acilci D, Nakae J, Kim JJ, Park BC, Rother KI. (1999) *Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in Mouse embryonic development*, J Pediatr Endocrinol Metab, 12,475-485

Adams ME et al (1993) Neuron, 11, 531-540

Adams TE, Epa VC, GArrett TP, Ward CW (2000) *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*, Cell Mol life Sci, 57, 1050-1093

Alessi DR and Downes CP (1998) *The role of PI3-kinase in insulin action*, Biochim Biophys Acta, 1436, 151-164

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald SM, Pedersen O (1993) *Amino acid polymorphism in insulşin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus*, Lancet, 342, 828-832

Almind K, Federiksen SK, Bernal D, Hansen T, Ambye L, Urhammer S et al (1999) *Search of variants of the gene-promoter and the potential phosphotyrosine encoding sequence of the insulin receptor substrate-2 gene: evaluation of their relation with alterations in insulin secretion and insulin sensitivity*, Diabetologia, 42, 1244-1249

Almind K, Inoue G, Pedersen O, Kahn CR (1996) *A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling*, J Clin Invest, 97,2569-2575

Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y et al (1998) *Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS)-3 from those of IRS-1 and IRS-2*, J Biochem, 273 (45), 29686-92.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag BL, Johnson RS, Kahn CR (1994) *Alternative pathways of insulin signalling in mice with targeted distruption of the IRS-1 gene*, Nature (London), 372, 186-190

Araki E, Shimada F, Uzawa A, Mori M, Ebina Y (1987) *Characterization of the promoter region of the human insulin receptor gene*, J Biol Chem, 262, 16186-91

Araki E, Sun XJ, Haag B, Chuang III LM, Zhang Y, Yang-Feng TL, White MF, Kahn CR (1993) *Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1 Characterization of the cDNA, gene and chromosomal location,* Diabetes, 42, 1041-1054

Arslan A, Taştekin G, Bulun M (2001) *Diabetes mellitus ve genetik, Her yönüyle diabetes mellitus,* editör Mustafa Yenigün, , Nobel kitabevi, 2. baskı, İstanbul.

Avruch J (1998) *Insulin signal transduction through protein kinase cascades*, Mol Cell Biochem, 182, 31-48

Backer JM, Schroder GG, Kahn CR, Myers MG Jr, Wilden PA, Cahil DA, White MF (1992) *İnsulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation*, J Biol Chem, 267, 1367-1374

Backer JM, Schroeder GG, Cahill DA, Ullrich A, Siddle K, White MF (1991) *Cytoplasmic juxtamembrane region of the insulin receptor: A critical role in ATP binding, endogenous phosphorylation, and insulin-stimulated bioeffects in CHO cells*, American Chemical Society, 30(26), 6366-6372

Baker E, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ et al (1988) *The structure of 2Zn pig insulin at 1.5 A resolution*, Phil Trans R Soc Lond B, 19, 369-456

Baron V, Calleja V, Ferrari P, Alengrin F and Van Obberghen E (1998) *p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insuli-like growth factor-1 tyrosine kinase receptors*, J Biol Chem, 273, 7162-7168

Baroni M, D'andrea MP, Montali A, Pannitteri G, Barila F, Campagna F, Mazzei E, et al (1999) *A common mutation of insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 19, 2975-2980

Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, Thurmond DC, Mora S, Shigematsu S, Bickel PE, Pessin JE, Saltiel AR (2000) *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport*, Nature, 407, 202-7

Baumann CA, Saltiel AR (2001) *Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action*, BioEssays, 23, 215-222

Beitner-Johnson D et al (1996) *The proto-oncogene product c_Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS*, J Biol Chem, 271, 9287-9290

Bektas A, Warram JH, White MF, Krolewski AS, Doria A (1999) *Exclusion of the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) as a major locus for early-onset autosomal dominant type 2 diabetes*, Diabetes, 48, 640-642

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991) Science, 254, 274-277

Bernal D, Almind K, Yenush L, Ayoub M, Zhang Y et al (1998) *Insulin receptor substrate-2 amino acid polymorphisms are not associated with random type 2 diabetes among Caucasians*, Diabetes, 47, 976-979

Birnbaum MJ (1993) *The insulin-sensitive glucose transporter*, Int Rev Cytol, 137, 239-97

Blaikie P et al (1994) *A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine phosphorylated growth factor receptors*, J Biol Chem, 269, 32031-32034

Blundell TL, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA (1972) *Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology*, Adv protein Chem, 26, 279-402

Bodhini D, Radha V, Deepa R, Ghosh S, Majumder PP, Rao MR, Mohan V (2006) *The G1057D polymorphism of IRS-2 gene and its relationship with obesity in conferring susceptibility to type 2 diabetes in Asian Indians,* IntJ Obes (Lond), Epub ahead of print.

Bowen R (1999) *Insulin synthesis and secretion,* http://arbl.cymbs.colostate.edu/hbooks/pathophys/endocrie/pancreas/insulin.html

Bruning JC, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR (1997) *Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS2 in IRS-1-deficient cells*, Mol Cell Biol, 17, 1513-1521

Burks DJ, Wang J, Towery H, Ishibashi O, Lowe D, Riedel H, White MF (1998) *IRS pleckstrin homology domains bind to acidic motifs in proteins,* J Biol Chem, 273(47), 31061-7

Camilloni G, Seta FD, Negri R, Mauro ED (1986) *Structure of RNA polymerase II promoters*, J Biol Chem, 261, 61, 45-48

Celi F, Silver C, Walston J, Knowler WC, Bogardus C, Shuldiner AR (1995) *Lack of IRS-1 codon 513-972 polymorphism in Pima Indians,* J Clin Endocrinol metab, 80, 2827-2829

Cheatham B, Kahn CR (1995) *Insulin and insulin signaling network*, Endocr Rev, 16, 117-142

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR (1994) *Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation*, Mol Cell Biol, 14, 4902-11.

Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR (2001) *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10,* Nature, 410(6831), 944-8

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ (2001) *Insulin resistance and a diabetes*

mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta), Science, 292, 1728-31

Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001) *Akt1/pkbalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*, J Biol Chem, 276, 38349-52

Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebwohl D et al. (1987) *Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin*, J Biol Chem, 262, 1842-47

Clark SF, Martin S, Carozzi AJ, Hill MM, James DE (1998) *Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes potential involvement of a membrane skeleton*, J Cell Biol, 140, 1211-1225

Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S, Andersen CB, et al (1995) *Insulin resistance: interaction between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1*, Lancet, 346, 397-402

Clemmons DR, Van Wyk JJ (1984) *Factors controlling the blood concentration of somatomedin C*, Clin Endocrinol Metab, 13, 113-44

Cohen P, Alessi DR and Cross DA (1997) *PDK1 one of the missing links in insulin signal transduction?* Growth Regul, 410, 3-10

Cook JTE, Shields DC, Page RCL et al (1993) *Segregation analysis of type 2 diabetes in Caucasian families*, Diabetologia, 37, 1231-1240

Czech MP, Corvera S (1999) *Signaling mechanisms that regulate glucose transport*, J Biol Chem, 274,1865-8.

D'Alfonso R, Marini MA, Frittitta L, Sorge R, Frontoni S, Porzio O et al (2003) *Polymorphisms of the insulin receptor substrate-2 in patients with type 2 diabetes*, The journal of clinical endocrinology & metabolism, 88(1), 317-322.

De Meyts P, Van Obberghen E and Roth J (1978) *Mapping of the residues responsible for the negative cooperativity of the receptor-binding region of insulin*, Nature, 273(5663), 504-9

De Meyts P, Whittaker J (2002) *Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design*, Nat Rev Drug Discov, 1, 769-783

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E (1992) *Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview*, Diabetes Care, 15, 318-368

De-Paganon S, Ottinger EA, Nolte RT, Eck MJ, Shoelson SE (1999) *Crystal structure of the pleckstrin homology phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1*, Proc Natl Acad Sci USA, Vol 96, 8378-8383

Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE (1996) *Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor*, Cell, 85, 695-705

Eck MJ, Pluskey S, Trub T, Harrison SC, Shoelson SE (1996) *Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phophatase SH-PTP2,* Nature, 379, 277-280

Erneux C, Govaerts C, Communi D and Pesesse X (1998) *The diversity and possible functions of the inositol polyphate 5-phosphatases*, Biochim Biophys Acta, 1436, 185-199

Esposito DL, Yunhua LI, Cama A, Quon MJ (2001) *Tyr612 and Tyr 632 in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocaTİON OF glut4 in adipose cells*, Endocrinology, 142(7), 2833-2840

Farese RV (2001) *Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport*, Update II. Exp Biol Med (Maywood), 226,283-95

Fasshauer M, Klein J, Ueki K, Kriauciunas KM, Benito M, White MF, Kahn CR (2000) *Essential role of receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut 4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes*, The Journal of Biological Chemistry, 275 (33), 25494-25501

Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O et al (2001) *The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets*, FASEB J, 15, 22-24

Fener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun X, Kahn CR, White MF (1993) *Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor*, J Biol Chem, 268, 11256-11264

Feng G-S, Hui C-C, Pawson T (1993) *SH-2 containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinase*, Science, 259, 1607-1614

Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE (1992) *Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. Relationship between intramolecular betasubunit trans-and cis autophosphorylation and substrate kinase activation*, J Biol Chem, 267, 19521-19528

Freeman RM, Plutzky J, Neel BG (1992) *Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase:a putative homolog of Drosofila corkscrew*, Prot Natl Acad Sci (USA), 89, 11239-11243

Fritsche A, Madaus A, Renn W, Tschritter O, Teigeler A, Weisser M, Maerker E, Machicao F, Haring H, Stumvoll M (2001) *The prevalent Gly1057Asp polymorphism in the insulin receptor substrate-2 gene is not associated with impaired insulin secretion*, The journal of clinical endocrinology & metabolism, 86(10), 4822-4825.

Furman WL, et al. (1986) *Antibodies to distal carboxyl terminal epitopes in the v-fms-coded glycoprotein do not cross react with the c-fms gene product*, Virology, 152, 432-445

Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D (1993) *Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide Exchange on Ras*, Nature, 363, 88-921

Garvey WT, Birnbaum MJ (1993) *Cellular insulin action and insulin resistance*, Baillieres Clin Endocrinol Metab, 7(4), 785-873

Garvey WT, Sharrocs AD, Show PE (1992) İbid, 358, 414; Marais R, Wynne J, Genome Data Base *(Baltimore, MD)* **(1992)**

Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A and Saraste M (1994) *PH domain: the first anniversary*, Trends Biochem Sci, 19, 349-353

Giovannone B, Scaldaferri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G (2000) *Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential,* Diabetes Metab Res Rev, 16, 434-441

Given B, Mako M, Tager H, Baldwin A, Markese J, Rubenstein A, Oletsky J, Kobayashi M, Kolterman O, poucher R (1980) *Diabetes due to secretion of an abnormal insulin*, Ne Engl J Med, 302,129

Grant PJ, Stickland MH, Mansfield MW (1995) *Insulin receptor substrate-1 gene and cardiovascular risk factors in NIDDM*, Lancet, 346, 841-842

Gustafson TA and Rutter WJ (1990) J Biol Chem, 265, 18663-18667

Gustafson TA et al (1995) *Phosphotyrosine-dependent interaction of Shc and IRS-1 with theNPEY motif of the insulin receptor via a novel (non-SH2 domai),* Mol Cell Biol, 15, 2500-2508

Hager J, Zouali H, Velho G, Froguel P (1993) *Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) polymorphisms in French NIDDM families*, Lancet, 342, 1430

Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS (1998) *Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells*, Diabetes, 47,1006-1013

Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS (2001) *Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport?* FEBS Lett, 492, 199-203

Hanks SK, Quinn Am, Hunter T (1990) Science, 241,42-52

Hara K et al (1994) *1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells*, Proc Natl Acad Sci USA, 91, 7415-7419

Hedo JA, Cushman SW, Simpson IA (1982) *In version of the vectorial disposition of insulin receptor subunits with internalization in rat adipose cells*, Diabetes, 31 (suppl.2),2A

Heldin CH (1995) Cell, 80, 213-223

Heller-Harrison RA, Morin M, Guilhenne A, Czech MP (1996) *Insulin- mediated targeting of phosphaitidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles*, J Biol Chem, 10200-10204

Hitman GA, Hawrami K, McCarty MI, Viswanathan M, Snehalatha C, Ramachandran A et al (1995) *Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications fort he study of polygenic disease*, Diabetologia, 38, 481-486

Hotamşlıgil GS, Spielgeman BM (1994) *Tumor necrosis factor alpha: A key component of the obesity-diabetes link*, Diabetes, 1271-1278

Hribal ML, Federici M, Porzio O, Laura D, Borboni P, Acilci D, Lauro R, Sesti G (2000) *The Gly→Arg^{972} amino acid polymorphism in IRS-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells*, J Clin Endocrinol Metab, 85, 2004-2013

http://en.wikipedia.org/wiki/insülin

http://workbench.sdsc.edu

http://www.expasy.org

Hu Q, Milfay D and Williams LT (1995) *Binding of NCK to SOS and activation of ras-dependent gene expression*, Mol Cell Biol, 15, 1169-1174

Huang K, Xu B, Hu SQ, Chu YC, Hua QX, Qu Y, Li B, Wang S, Wang RY, Nakagawa SH, Theede AM et al (2004) *How insulin binds: the B-chain α-helix contacts the L1 β-helix of the insulin receptor,* J Mol Biol, 341, 529-550

Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA (1994) *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor*, Nature, 372,746-754

Hunter SJ, Garvey WT (1998) *Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction and the glucose transport effector system*, Am J Med, 105 (4), 331-345

Hunter T (1997) *Oncoprotein Networks*, Cell, 88, 333-346

Imai Y, Fusco A, Suzuki Y, Lesniak M, D'Alfonso R, Sesti G, Bertoll A et al (1994) *Variant sequences of insulin receptor substrate-1 in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*, J Clin Endocrinol Metab, 79, 1655-1658

Imai Y, Philippe N, Sesti G, Acilci D, Taylor SI (1997) *Expression of variant forms of insulin receptor substrate-1 identified in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*, J Clin Endocrinol Metab, 82,4201-4207

Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR (1998) *Dynamics of insulin signalling in 3T3-L1 adipocytes. Differetial compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2*, J Biol Chem, 273, 11548-11555

Iwamoto K, Mori H, Okazawa H, Hashiramoto M, Kasuga M (2002) *Identification of a single nucleotide polymorphism showing no insulin-mediated suppression of the promoter activity in the human insulin receptor substrate 2 gene*, Diabetologia, 45, 1182-1195

Jacobs AR, LeRoith D, Taylor S (2001) *Insulin receptor substrate-1 pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains are both involved in plasma membrane targeting,* The journal of biological chemistry, 276(4), 40795-40802

Johannes FJ et al (1994) J Biol Chem, 269, 6140-6148

Kahn CR (1985) *The molecular mechanism of insulin action*, Ann Rev Med, 36, 429-51

Kahn CR (1994) *Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes*, Diabetes, 43, 1066-1084

Kahn CR, and White MF (1988) J Clin Invest, 82, 1151-1156

Kahn CR, Baird KL, Flier JS, Grunfeld C, Harmon JT et al (1981) *Insulin receptors, receptors antibodies and the mechanism of insulin action*, Rec Prog Horm Res, 37, 477-538

Kalidas K, Wasson J, Galser B, Meyer JM, Duprat LJ, White MF, Permutt MA (1998) *Mapping of the human insulin receptor substrate-2 gene, identification of a linked polymorphic marker and linkage analysis in families with Type II diabetes: no evidence for a major susceptibility role*, Diabetologia, 41, 1389-1391

Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR (1982) *Insulin stimulates the phosphorylation of the 95.000-dalton subunit of its own receptor*, Science, 215, 185-187

Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Shibasaki Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y (1996) *Overexpression of catalytic subunit p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 271, 16987-90.

Kharitonenkov A, Schnekenburger J, Chen Z et al. (1995) *Adapter function of PTP1D in insulin receptor/IRS-1 interaction*, J Biol Chem, 270, 29189-29193

Kido Y, Burks DJ, Withers D et al (2000) *Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1 and IRS-2*, J Clin Invest, 105, 199-205

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation*, J Biol Chem, 271, 31372-8

Kong LF, Zhao YY, Li Q, Zheng XM, Ding Q, Liu H, Liu Gl (2005) *Study on the relationship between G1057D variants of IRS2 gene and obese T2DM in Chinese Han subjects*, Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 22(4), 387-90

Kozak M (1989) *The scanning model for translation :an update*, J Cell Biol, 108,229-41

Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, Hanahan D, Kahn CR (1999) *Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient Mouse islets and cultured β-cell lines*, J Clin Invest, 104, R69-R75

Kurose T, Pashmforoush M, Yoshimasa Y, Carroll R, Schwartz GP, Burke GT et al (1994) *Cross-linking of a B25 azidophenylalanine insulin derivative to the carboxyl-terminal region of the alpha-subunit of the insulin receptor. Identification of a new insulin-binding domain in the insulin receptor*, J Biol Chem, 269, 29190-29197

Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Deeb S (1994) *Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes*, J Clin Invest, 94, 1141-1146

Lavan BE, Lane WS and Lienhard GE (1997) J Biol Chem, 272, 11439-11443

Lee CH et al (1993) *Nck associates with the SH2 domain docking proteins IRS-1 in insulin stimulated cells*, Proc Natl Acad Sci USA, 90, 11713-11717

Lee-Ming C, Chuen-Shiang L, Jih IY, Huey-Peir W, Tong-Yuan T, Boniface L (1996) *No association between the Gly972Arg variant of the insulin receptor substrate-1 gene and NIDDM in Taiwanese population*, Diabetes Care, 19, 446-449

Lei HH, Coresh J, Shuldiner AR, Boerwinkle E, Brancati FL (1999) *Variants of the insulin receptor substrate-1 and fatty acid binding protein 2 genes and the risk of type 2 diabetes, obesity, and hyperinslinemia in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study*, Diabetes, 48, 1868-1872

Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB, Schlessinger J (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 10472-10476

Levy-Toledano R, Taouis M, Blaettler DH, Gorden P, Taylor SI (1994) *Insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3-kinase*, J Biol Chem, 269, 31178 (Abstract).

Li N, Batzer A, Daly R et al. (1993) *Guanine-nucleotide-releasing factor mSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases tor as signalling*, Nature, 363, 85-88

Liu X and Pawson T (1994) *Biochemistry of the Src protein-tyrosine kinase:regulation by SH2 and SH3 domains*, Recent Prog Horm Res, 49, 149-160

Lowenstein EJ et al. (1992) *The SH2 and SH3 domain-containing proteins GRB2 links receptor tyrosine kinases tor as signaling,* Cell, 70, 431-442

Mammarella S, Romano F, Di Valerio A, Creati B, Esposito DL, Palmirotta R, Capani F et al (2000) *Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes*, Hum Mol Genet, 9, 2517-2521

Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Klippel A, Williams LT, Olefsky JM (1996) *Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*, J Biol Chem, 271, 17605-8.

Mastick CC and Saltiel AR (1997) *Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific fort he differentiated adpocyte phenotype in 3T3-L1 cells*, J Biol Chem, 272, 20706-20714

Mayer BJ, Hamaguchi M ve Hanafusa (1988) *A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C*, Nature, 332, 272-275

Meyts PD (2004) *Insulin and its receptor: structure, function and evolution*, BioEssays, 26, 1351-1362

Mori H, Hashiromoto M, Kishimoto M, Kasuga M (1995) *Amino acid polymorphism of insulin receptor substrate-1 in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus*, J Clin Endocrinol Metab, 80, 2822-2826

Murakami MS, Rosen OM (1991) *The role of insulin receptor autophosphorylation in signal transduction,* J Biol Chem, 266 (33), 22653-660.

Musacchio A et al (1993) Trends Biochem Sci, 18,343-348

Myers MG Jr and White MF (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol, 36, 615-658

Myers MG Jr, Backer JM, Sun X et al. (1992) *IRS-1 activates the phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with the src homology 2 domains of p85,* Proc Natl Acad Sci (USA), 89, 10350-10354

Myers MG, Sun Jr XJ, White MF (1994) *The IRS-1 signalling system*, Trends Biochem Sci, 19, 289-294

Myers MG, Wang Jr LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF (1994) *Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling,* Mol Cell Biol, 14,3577-3587

Mynarcik DC, Williams PF, Schaffer L, Yu GQ, Whittaker J (1997) *Identification of common ligand bindind determinants of the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors. Insights into mechanisms of ligand binding*, J Biol Chem, 272, 18650-18655

Nystrom FH, Quon MJ (1999) *Insulin signalling: Metabolic pathways and mechanisms for specificity* Cell Signal, 11(8), 563-574

O'Neill TJ, Craparo A, Gustafson TA (1994) Mol Cell Biol, 14, 6433-6442

Odawara M, Kadowaki T, Yamamoto R, Shibasaki Y, Tobe K, et al. (1989) *Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor*, Science, 245, 66-68

Okada T, Sakuma L, Fukui Y, Hazeki O, Ui M (1994) *Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase*, J Biol Chem, 269, 3563-7.

Otsu M et al (1991) *Characterization of two 85kD proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60$^{c\text{-}src}$ complexes and PI3 kinase*, Cell, 65, 91-104

Patti ME, Sun XJ, Bruenings JC, Araki E, Lipes MA, White MF, Kahn CR (1995) *4PS/Insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1 –deficient mice*, The journal of biological chemistry, 270(42), 24670-24673

Pawson T (1995) *Protein modules and signalling Networks*, Nature, 373 (6515),573-580

Pederson T, Rondinone CM (2000) *Regulation of proteins involved in insulin signaling patways in differentiating human adipocytes*, Biochem Biophys Res Commun, 276,162-168

Pessin JE and Saltiel AR (2000) Signaling *pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*, The Journal of Clinical Investigation, 106(2), 165-169

Pons S etal (1995) *The structure and function of p55^{PIK} reveals a new regulatory subunit fort he phosphatidylinositol-3 kinase*, Mol Cell Biol, 15, 4453-4465

Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G (1999) *The Gly972-Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β-cells*, J Clin Invest, 104, R69-R75

Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL III, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A, VanRenterghem B et al (1997) J Biol Chem, 272, 22059-22066

Razzini G, Ingrosso A, Brancaccio A, Sciacchitano S, Esposito DL, Falasca M (2000) Mol Endocrinol, 14,823-836

Reaven GM (1988) *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*, Diabetes, 37(12), 1595-1607

Ribon V, Printen J, Hoffman NG, Kay BK ve Saltiel AR (1998) *Anovel multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes*, Mol Cell Biol, 18, 872-879

Rondinone CM, Wang LM, Lonnroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U (1997) *Insulin receptor substrate (IRS)1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphotidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus*, Proc Natl Acad Sci, USA, 94,4171-4175

Sakai R et al (1994) *A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner,* EMBO J, 13, 3748-3756

Saltiel AR and Kahn CR (2001) *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*, Nature, 414, 799-806

Sanchez-Corona J, Flores-Martinez SE, Machorro- Lazo MV, Galaviz-Hernandez C, Moran-Moguel MC, Perea FJ, Mujika-Lopez KI, Vargas-Ancona L, Laviada-Molina HA, Fernandez V et al (2004) *Polymorphisms in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexian population with metabolic syndrome findings*, Diabetes Res Clin Pract, 63, 47-55

Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White M, Obberghen EV (1996) *Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding*

domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786, The Journal of Biological Chemistry, 271 (11), 5980-5983

Schaffer, L (1994) *A model for insulin binding to the insulin receptor*, Eur J Biochem, 221(3), 1127-32

Seino S, Sieno M, Bell GI (1990) *Human insulin-receptor gene*, Diabetes, 39, 129-133

Sesti G (2000) *Insulin receptor substrate polymorphism and type 2 diabetes mellitus*, Pharmacogenomics, 1(3), 343-57

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R (2001) *Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders,* The FASEB Journal, 15, 2099-2111

Shimokawa K, Kadowaki H, Sakura H, Otabe S, Hagura R, Kosaka K et al (1994) *Molecular scanning of the glycogen synthase and insulin receptor substrate-1 in Japanese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus*, Biochem Biophys res Commun, 202, 463-469

Shoelson SE, Chatterjee S, Chaudhuri M, White MF (1992) *YMXM motifs of IRS-1 define substrate specifity of the insulin receptor kinase*, Proc natl Acad Sci USA, 89, 2027-2031

Shulman GI (2000) *Cellular mechanisms of insulin resistance*, J Clin Invest, 106, 171-6.

Sigal RJ, Doria A, Warram JH, Krolewski AS (1996) *Codon 972 polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene, obesity, and risk for noninsulin-dependent diabetes mellitus*, J Clin Endocrinol Metab, 81, 1657-1659

Skolnik EY et al. (1993) *The function of GRB2 in linking the insulin receptor tor as signaling pathways*, Science, 260, 1953-1955

Slansky JE, Farnhm PJ (1996) *Transcriptional regulation of the dihydrofolate reductase gene,* Bioessays, 18, 55-62

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F et al (1993) Cell, 72, 767-778

Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T et al (1994) Mol Cell Biol, 14, 2777-2785

Stoffel M, Espinosa III R, Keller SR, Lienhard GE, Le Beau MM, Bell GI (1993) *Human insulin receptor substrate-1 gene (IRS): chromosomal localization to 2q35-q36.1*

and identification of a simple tandem repeat DNA polymorphism, Diabetologia, 36,335-337

Stumvoll M, Fritsche A, Volk A, Stefan N, Madaus A, maeker E, Teigeler A, Koch M et al (2001) *The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans*, Diabetes, 50,882-885

Sun X, Rothenberg P, Kahn CR et al (1991) *The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein,* Nature, 352, 73-77

Sun X, Wang LM, Zhang Y, Yenush LP, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*, Nature, 377, 173-177

Sun XJ, Crimmins DL, Myers Jr MG, Miralpeix M, White MF (1993) *Pleitropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1*, Mol Cell Biol, 13, 7418-7428

Sun XJ, Pons S, Asano T, Myers Jr MG, Glasheen E, White MF (1996) *The fyn tyrosine kinase binds IRS-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation*, J Biol Chem, 271,10583-10587

Sun XJ, Pons S, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Burks D, Myers MG, Glasheen E, Copeland NG, Jenkins NA, Pierce JH, White MF (1997) *The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action,* Mol Endocrinol, 11, 251-262

Sun XJ, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahil DA, Goldstein BJ, White MF (1991) *Role of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*, Nature, 352, 73-77

t Hart LM, Nijpels G, Dekker JM, Maassen JA, Heine RJ, Haeften TMW (2002) *Variations in insulin secretion in carriers of gene variants in IRS-1 and -2,* Diabetes, 51, 884-887

t Hart LM, Stolk RP, Dekker JM, Nijpels G, Grobbee DE, et al (1999) *Prevalence of variants in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in the Netherlands: the Rotterdam study and the Hoorn study*, J Clin Endocrinol Metab, 84, 1002-1006

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S (1994) *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1*, Nature (London) 372, 182-186

Tanaka S, Ouchi T and Hanafusa H (1997) *Downstream of Crk adaptor signaling pathway:activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide Exchange protein C3G,* Proc Natl Acad Sci USA, 94, 2356-2361

Tavare JM, Siddle K (1993) *Mutational analysis of insulin receptos function:consensus and controversery*, Biochim Biophys Acta, 1178, 21-39

Taylor SI (1999) *Deconstructing type 2 diabetes*, Cell, 97,9-12

Taylor SI, Cama A, Acilci A (1988) *Molecular genetics of insulin resistant diabetes mellitus*, J Clin Endocrinol Metab, 73, 1158-1163

Temizkan G, Arda N (2004) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler,* Temizkan ve ark Ed.ler, Biyogem Yay No: 2, Nobel Tıp kitabevi

Tobe K, Sabe H, Yamamoto T, Yamauchi T, Asai S, Kaburagi Y et al (1996) *Csk enhances insulin-stimulated dephosphorylation of focal adhesion proteins*, Mol Cell Biol, 16(9), 4765-72.

Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ (1994) J Biol Chem, 269, 10217-10220

Treisman R (1993) Cell, 73,381

Trub T, Choi WE, Wolf G, Ottinger E, Chen Y, Weiss MA, Shoelson SE (1995) *Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino terminal to phosphotyrosine,* J Biol Chem, 270, 18205-18208

Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffer PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T (1998) *Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis*, J Biol Chem, 273,5315-22.

Ullrich A, Bell J.R., Chen E. Y., Herrera R., Petruzelli L. M., Dull T. j., Gray A., Coussens L., Liao Y. C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P. H., Grunfeld C., Rosen O. M. and Ramachandran J 1985) *Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes*, Nature, 313(6005), 756-6

Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M et al (1996) *Molecular scanning of the IRS-1 gene in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: identifcation of five novel mutations in IRS-1 gene*, Diabetologia, 39, 600-608

Vaben L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L (1999) *Human insulin receptor substrate-2 Gene organization and promoter characterization*, Diabetes, 48, 1877-1880

Valverde AM, Kahn CR, Benito M (1999) *Insulin signaling in Insulin Receptor substrate (IRS)-1-deficient Brown adipocytes*, Diabetes, 48, 2122-2131

Van der Geer P., Hunter T. and Lindberg R.A.(1994) *Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways,* Annu Rev Cell Biol, 10,251-337

Verdier F et al (1997) *Erytropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternative patway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation*, J Biol Chem, 272, 26173-26178

Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999) *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance*, The Journal of Clinical Investigation, 103 (7), 931-943

Vollenweider P et al (1997) *An SH2 domain-containing 5' inositol phosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament*, Mol Cell Biol, 19, 1081-1091

Wang H, Rissanen J, Miettinen R, Karkkainen P, Kekalainen P, Kuusisto J, Mykkanen L, Karhapaa P, Laakso M (2001) *New amino acid substitutions in the IRS-2 gene in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes*, Diabetes, 50, 1949-1951

Wang LM, Keegan AD, Paul WE, Heidaran MA, Gutkind JS, Pierce JH (1992) EMBO J, 11, 4899-4908

Wang LM, Myers MG Jr, Sun X, Aaronson SA, White MF, Pierce JH (1993) Science, 261, 1591-1594

Warram, JH, Rich, SS, Krolewski AS. (1995) *Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In Joslin's Diabetes Mellitus*, ed. CR Kahn, GC Weir, pp. 24-56 Philadelphia:Lea&Febiger. 13th ed.

Welham MJ, Dechert U, Leslie KB, Jirik F, Schrader JW (1994) *Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphotidylinositol 3-kinase,* J Biol Chem, 269, 23764-23768

White MF (1997) *The insulin signalling system and the IRS proteins*, Diabetologia, 40, S2-S17

White MF (1998) *The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action*, Molecular and Cellular Biochemistry, 182, 3-11

White MF (2002) *IRS proteins and common path diabetes*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 283, 413-422

White MF et al (1988) Cell, 54, 641-649

White MF, Maron R and Kahn CR (1985) Nature, 318, 183-186

Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR (1992) *The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies*, J Biol Chem, 267(19), 13729-27.

Williams G, Pickup JC (2004) *Diyabet El Kitabı,* üçüncü baskı Blackwell publishing

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y et al (1998) *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice*, Nature, 391, 900-904

www.betacell.org

www.betacell.org/content/briefs

www.pnb.sunysb.edu

www-nmr.cabm.rutgers.edu

Xiao S et al. (1994) *Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction*, J Biol Chem, 269, 21244-21248

Xu GG, Gao Z, Borge PD, Wolf BA, (1999) *Insulin signaling in ınsulin receptor substrate 1 induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca2+ uptake in beta cells. Autocrine regulation of intracellular Ca2+ homeostasis and insulin secretion*, J Biol Chem, 18, 18067-18074

Yamamoto-Honda R, Kadowaki T, Momomura K et al (1993) *Normal insulin receptor substrate-1 phosphorylation in autophosphorylation-defective truncated insulin receptor*, J Biol Chem, 268, 16859-16865

Yamao T, Matozaki T, Amano K, Matsuda Y, Takahashi N et al (1997) *Mouse and human SHPS-1: Molecular cloning of cDNAs and chromosomal localization of gene*, Biochem Biophys Res Commun, 231, 61-67

Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR, Pessin JE (1995) *Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling*, Proc Natl Acad Sci (USA),

Yenigün M (1995) *Diabetes mellitus fizyopatolojisi. (Her yönü ile diabetes mellitus adlı kitaptan)* Ed: Yenigün, M. Birinci baskı, İstanbul Nobel tıp kitap evi s.49-80

Yenush L, Makati KJ, Smith-Hall Jİ, Ishibashi O, Myers MG Jr, White MF (1996) J Biol Chem, 271, 24300-24306

Yoon HS, Hajduk PJ, Petros AM, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW (1994) *Solution of a pleckstrin homology domain*, Nature, 369,642

Yoshimura R, Araki E, Ura S, Todaka M, Tsurozoe K, Furukawa N et al (1997) *Impact of natural IRS-1 mutations on insulin signals*, Diabetes, 46, 929-936

Zapf J, Schimid Ch, Froesch ER (1984) *Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II*, Clin Endocrinol Metab, 13, 3-30

Zeng W, Peng J, Wan X, Chen S, Song H (2000) *The mutation of insulin receptor substrate-1 gene in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*, Chinese Medical Journal, 113(1), 80-83

Zhang B, Roth RA (1991) *Binding properties of chimeric insulin receptors containing the cysteine-rich domain of either the insulin-like growth factor 1 receptor related receptor*, Biochemistry, 30,5113-5117

Zhang Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, Turner RC (1996) *UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and β3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations*, Diabetologia, 39, 1505-1511

9. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında İzmir'de doğdu. İlkokul öğrenimini 1978-1983 yılları arasında Bornova 9 Eylül İlkokulu'nda, orta öğrenimini 1983-1989 yılları arasında Bornova Suphi Koyuncuoğlu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 1989-1994 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yaptı. 1994 yılında Selçuk Üniversitesi Karaman Meslek Yüksekokulu'na Öğretim Görevlisi olarak atandı. 1996 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans tezinin deneysel aşamasını Almanya Justus-Liebig Üniversite'sinde yaptı. 2000 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak doktora eğitimine başladı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına Öğretim Görevlisi olarak atandı. Evlidir.

10. TEŞEKKÜR

2003/010 numaralı projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatorlüğüne ve 105S306 numaralı projemi destekleyen TUBİTAK SBAG birimlerine teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Moleküler çalışmalarımda yardımcı olan Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı elemanlarından Yrd.Doç.Dr. Sibel Oğuzkan, Bülent Göğebakan, Yusuf İğci ve Mehri İğci'ye, laboratuar cihazlarını kullanmamda gösterdikleri ilgiden dolayı Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Kuddusi Ertuğrul, Yrd.Doç.Dr. Emine Arslan ve Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. A.Kaan Karabulut'a, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Hasan Acar'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol gruplarının toplanmasında yardımcı olan Endokrinoloji Bilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Said Gönen, Uzman Dr. Kaan Güngör ve Uzman Dr. Oğuz Dikbaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresince manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Dr.Hilal Arıkoğlu'na, desteklerinden dolayı eşime, anneme, babama ve kardeşime teşekkürlerimi bir borç bilirim.