T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya Bölgesinde Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında TCF7L2 (Transcription factor 7 like-2) Gen Polimorfizmlerinin Taranması ve Hastalık ile İlişkilerinin Ortaya Konulması

Dudu ERKOÇ KAYA

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya Bölgesinde Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında TCF7L2 (Transcription factor 7 like-2) Gen Polimorfizmlerinin Taranması ve Hastalık ile İlişkilerinin Ortaya Konulması

Dudu ERKOÇ KAYA

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202048 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2012

i. ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen ve çalışmalarım süresince, akademik birikimiyle olduğu kadar, güçlü manevi ve insani özellikleriyle de ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na,

Emekli olarak aramızdan ayrılan, önceki danışmanım sayın Prof. Dr. Ferhan PAYDAK'a,

2006 yılında bölümümüzden ayrılmasına rağmen hem akademik hem de manevi desteğini hala sürdüren Dr. Melda AKSOY HEPDOĞRU'ya,

Aynı süreci paylaştığım değerli çalışma arkadaşım Dr. Hülya ÖZDEMİR'e,

Çalışma gruplarının oluşturulmasında yardımcı olan sayın Prof. Dr. M. Sait GÖNEN ve Uzman Dr. Süleyman Hilmi İPEKÇİ'ye,

Tezin istatistik değerlendirmesinde yardımlarını aldığım sayın Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a,

Yaşamım boyunca her aşamada olduğu gibi, tüm eğitim hayatım süresince de en büyük motivasyon ve güç kaynağım sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Desteklerinden dolayı Kaya ailesinin tüm fertlerine,

Varlığı, doktora sürecindeki sonsuz desteği ve sabrı için sevgili eşime,

Ve tüm uğuruyla yaşamıma konuveren biricik kızım Neris Bilge'me sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ii. İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

ONAY SAYFASI

i. ÖNSÖZ..... i

ii. İÇİNDEKİLER..... ii

iii. SİMGELER VE KISALTMALAR.....v

iv. ŞEKİLLER LİSTESİ..... vi

v. ÇİZELGELER LİSTESİ..... vii

vi. RESİMLER LİSTESİ..... viii

1. GİRİŞ 1

1.1.Diabetes Mellitus 5

1.1.1.Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri 5

1.2. Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırılması 5

1.3. Tip 2 Diabetes Mellitus.....6

1.3.1. Tip 2 Diyabetin Epidemiyolojisi.....6

1.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patofizyolojisi 9

1.4. Pankreas β-Hücrelerinde İnsülin Salınım Mekanizması ve Glikozun İnsülin Salgılanmasındaki Rolü 12

1.5. İnsülinin Hedef Dokularda İşlevi.....14

1.6. Glukoz Homeostazı.....15

1.7. Tip 2 Diyabet Gelişiminde Genler ve Çevresel Faktörler.....15

1.7.1. T2DM nin Genetik Temelini Ortaya Koyan Kanıtlar.....16

1.7.2. Çevresel Faktörlere Yönelik Kanıtlar 17

1.8. Tip 2 Diyabetin Moleküler Genetiği 17

1.8.1.Monogenik Kökenli Diyabet.....19

1.8.2. Çok Genli Kalıtım Gösteren Diyabet.....20

1.9. Wnt Sinyal Yolağı.....22

1.9.1. Wnt Sinyal Mekanizması 26

1.9.2. Wnt Sinyal Yolu ve Diabetes Mellitus.....30

1.10. TCF7L2 (TCF4) proteini 30

1.11. TCF7L2 Geni 33

2. GEREÇ VE YÖNTEM 43

2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması 43

2.2.DNA İzolasyonu, PZR, SSCP, RFLP ve Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli

Olan Gereçler 43
2.3. DNA izolasyonu, PZR, SSCP, RFLP ve Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli Olan Kimyasal Maddeler 44
2.4. DNA İzolasyonu.....44
2.4.1. DNA izolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması 44
2.4.2. DNA Eldesi 46
2.5. Hedef Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı 46
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması.....48
2.6.1. Gradient PZR 48
2.6.2. PZR uygulamaları 49
2.7. Agaroz Jel Elektroforezi 49
2.7.1. Jelin Hazırlanması.....49
2.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi.....49
2.7.3. Örneklerin Jelde Yürütülmesi 49
2.7.4. Görüntüleme.....49
2.7.5. Agaroz Jel Elektroforezde kullanılan çözeltilerin Hazırlanması 50
2.8. DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi.....50
2.8.1. RsaI Enzim Kesimi Reaksiyonu 51
2.8.2. Tsp509I (TasI) Enzim kesimi reaksiyonu.....51
2.8.3. Cac8I (R0579) Enzim kesimi reaksiyonu 52
2.8.4. BseNI (BsrI) Enzim kesimi reaksiyonu 52
2.9. SSCP Yöntemi ve Uygulaması 53
2.9.1. SSCP Tekniğinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....53
2.9.2. SSCP'ninYapılışı 55
2.10. Dizi Analizi 56
2.11. İstatistiki Analizler.....56
3. BULGULAR.....58
3.1. Çalışma Gruplarının Klinik Özellikleri.....58
3.2. TCF7L2 Genindeki SNP'lerin belirlenmesi.....59
3.3. İlişki Çalışması.....64
3.4. Genotip-fenotip ilişkisi.....64
3.5. SNP'lerin Epistatik Etkisi 65
4.TARTIŞMA 66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....82

6. ÖZET.....84
7. SUMMARY 86
8. KAYNAKLAR 87
9. EKLER.....100
EK: Etik Kurulu Kararı……101
10. ÖZGEÇMİŞ.....101

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

DM: Diabetes Mellitus

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

İD: İnsülin direnci

SNP: Tek Nükleotid Degisimi

GWA: Genom Boyu İlişki

VKİ: Vücut kitle indeksi

VNTR: Değişken sayıda ardışık tekrar

CRC: Kolorektal

APC: Adenamatöz Polipozis Koli

TCF4: T hücre faktörü 4

hTCF4: İnsan T hücre faktörü 4

TCF7L2: Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2 geni

LEF: Lenfoid Arttırıcı Faktör

Fz: Frizzled (kıvrımlanmış)

LRP: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-ilişkili Protein

GSK-3β: Glikojen Sentaz Kinaz-3β

CKIα: Kazein Kinaz α

pERK: Fosforlanmış ERK

Dsh/Dvl: Dishevelled

β-TrCP: β-transdusin tekrarı içeren protein

Dkk: Dickopff

GLP-1: Glukagon benzeri peptid 1

CtBP: Karboksi Uca Bağlanan Protein

hTCF: insan T hücre Faktörü

HMG: Yüksek Mobiliteli Grup

CTNNB1: β-katenin

TSS: Trankripsiyon başlama bölgesi

HOMA-IR: İnsülin direncinin homeostatik model değerlendirmesi

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

SSCP: Tek iplik konformasyon polimorfizmi

v. ŞEKİLLER LİSTESİ **Sayfa No**

Şekil 1.1. Pankreatik beta hücrelerinden İnsülin salınım mekanizması.....13
Şekil 1.2. İnsülinin moleküler etki mekanizmasının şematik görünümü.....14
Şekil 1.3. Biyolojik fonksiyonlarına göre T2DM gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen aday genler.....19
Şekil 1.4. Wnt sinyal yolları 24
Şekil 1.5. Wnt-Fz-LRP5/6 üçlü kompleksi.....25
Şekil 1.6. Wnt/β-katenin yolağının aktivasyon modeli.....27
Şekil 1.7. Kanonical WNT yolağının özeti.....28
Şekil 1.8. β-catenin/Tcf4 kompleksinin yapısı 31
Şekil 1.9. β-Catenin/Tcf-4/BCL9 kompleksinin yapısı 31
Şekil 1.10. TCF4 proteininin aminoasit dizisi 32
Şekil 1.11. TCF7L2 protein yapısının şematik gösterimi.....32
Şekil 1.12. TCF7L2 geninin 10 nolu kromozom üzerindeki yerleşimi 33
Şekil 1.13.TCF7L2 geninin yapısı ve alternatif olanlar dahil tüm ekzonlarının şematik gösterimi 34
Şekil 1.14. hTCF-4'ün genomik organizasyonu ve alternatif kesimleri.....34
Şekil 1.15. TCF7L2 N-terminal kısmının yapısı 35
Şekil 1.16. TCF7L2 gen yapısının şematik gösterimi 36
Şekil 1.17. TCF7L2 geninin yapısının ve tezin konusunu oluşturan SNP'lerin kromozom üzerinde gen içerisindeki yerleşiminin şematik gösterimi.....39
Şekil 1.18. TCF7L2 geni Intron 3 kısmi dizisi 40
Şekil 1.19.TCF7L2 geni İntron 4 kısmi dizisi 41
Şekil 3.1. rs7901695 (intron 3), T→C dönüşümü dizileme sonuçları.....60
Şekil 3.2. rs11196205 (intron4) G→C dönüşümü dizileme sonuçları 61
Şekil 3.3. rs7903146 (intron 3) C→T dönüşümü dizileme sonuçları.....62
Şekil 3.4. rs12255372 (intron 4) G→T dönüşümü dizileme sonuçları.....62
Şekil 3.5. rs11196213 (intron 4) C→T dönüşümü dizileme sonuçları.....63
Şekil 3.6. rs3814573 (intron 4) C→T dönüşümü dizileme sonuçları.....64

vi. ÇİZELGELER LİSTESİ **Sayfa No**

Çizelge 1.1. Diabetes mellitus tanı kriterleri 5

Çizelge 1.2. 2010 Yılında Dünya'da Diyabet ve Bozulmuş Glukoz Toleransı ve 2030 Yılı için Beklenen Artış (20-79 yaş grubu).....8

Çizelge 1.3. 2010 yılında Türkiye'de Diyabet ve Bozulmuş Glukoz Toleransı.....9

Çizelge 1.4. Tip 2 Diyabet için aday genlerin bilinen veya muhtemel biyolojik etki mekanizmalarına göre gruplandırılması.....22

Çizelge 2.1. TCF7L2 genindeki taranan SNP'ler ve ilgili özellikleri.....47

Çizelge 2.2. TCF7L2 geninin hedef bölgelerine uygun tasarlanan primer dizileri47

Çizelge 2.3. Gradient PZR karışımının Hazırlanması 48

Çizelge 2.4. Gradient PZR Reaksiyon Koşulları 48

Çizelge 3.1. Hasta ve kontrol gruplarının klinik ve biyokimyasal özellikleri 58

Çizelge 3.2. TCF7L2 geninde bulunan SNP'lerin yerleri ve özellikleri.....59

Çizelge 3.3. TCF7L2 genindeki SNP'lerin genotiplerinin hasta ile kontrollerdeki görülme sıklıkları 59

vii. RESİMLER LİSTESİ **Sayfa No**

Resim 3.1. rs7901695 (intron 3)'in SSCP jel resmi 60
Resim 3.2. rs11196205 (intron 4)'in SSCP jel görüntüsü 61
Resim 3.3. RsaI Enzim kesimi sonuçları 61
Resim 3.4. Tsp509I (TasI) Enzim kesimi sonuçları 62
Resim 3.5. Cac8I (R0579) Enzim kesimi sonuçları 63
Resim 3.6. BseNI (BsrI) Enzim kesimi sonuçları.....63

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), glukoz düzeylerinin uzun süreli yüksekliği sonucu karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklar ile karakterize heterojen bir grup metabolik hastalık şeklinde tanımlanmaktadır (ADA 2009). DM, insülin salınımı ve insülin işlevi ya da her ikisinin de kusurlu olmasından kaynaklanmaktadır (Altuntaş 2001, Powers 2001, Arslan 2003, İmamoğlu 2005).

Kan şekeri yüksekliği (hiperglisemi) kontrol altına alınamazsa, kronik hiperglisemi uzun dönemde çeşitli doku ve organlarda özellikle de göz, böbrek, sinir, kalp ve damarlarda hasara, fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine yol açar. Henüz tanı almamış veya hastalığı kontrol altına alınmamış diyabetiklerde körlük, renal yetmezlik, felç ve ekstremite amputasyonları morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. DM yılda 4 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Bu oran dünya genelinde hastalıklardan ölüm sebebi olarak % 9'luk bir kısmı oluşturmaktadır (ADA 1998, Caro ve ark 2002). Tüm ölüm sebepleri arasında beşinci sırada (ADA 2002, Roglic ve ark 2005, IDF 2006) yer almasının yanı sıra, hastalığın kendisi ve komplikasyonlarına yönelik yapılan tedavi harcamaları da bireye ve topluma büyük bir ekonomik yük getirmektedir (ADA 1998, Caro ve ark 2002).

Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle Tip 2 diyabet prevelansı hızla yükselmektedir. 2009 sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabetli sayısı 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında 438 milyona ulaşması beklenmektedir (IDF 2009). Bu konuda en fazla diyabetli sayısını barındıracak tahmini ilk üç ülke ise Hindistan, Çin ve Amerika Birleşik Devletleri'dir (Malecki 2005). İnsüline bağımlı olmayan diyabet (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus-NIDDM) olarak da bilinen Tip 2 diyabet mellitus (T2DM), DM'nin en yaygın formudur ve hastalığın prevalansının % 90-95'inden sorumludur (ADA 2005, Das ve Elbein 2006).

Ülkemizde 1997-1998 yıllarında gerçekleştirilen Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması (TURDEP I) sonuçlarına göre; T2DM prevelansı % 7.2 (tahminen 2.85 milyon) bozulmuş glukoz toleransı (BGT) prevelansı % 6.7 (tahminen 2.6 milyon) olarak saptanmış iken (Satman ve ark 2002); 2010 yılında gerçekleştirilen TURDEP II çalışma sonuçlarına göre geçen 12 yılda Türk erişkin toplumunda T2DM sıklığının % 13.7 ye ulaştığı görülmüştür (Satman ve ark 2010).

Diyabet gelişmiş ülkelerde, kişisel ve toplumsal düzeyde sağlık hizmetlerinin ve kaynaklarının en çok kullanılmasına sebep olan hastalıktır. Bu nedenle diyabet günümüzde ciddi tehdit oluşturan bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Diyabetli bir hastaya bakım hizmeti vermenin ortalama maliyeti sağlık sisteminden hizmet alan hastalardan ortalama 2.4 kat fazla olarak hesaplanmıştır (ADA 2003). Çeşitli ülkelerde toplam sağlık hizmeti harcamalarının % 3-12'sini diyabet giderleri oluşturmaktadır (Donovan 2002).

Toplumda diyabet riski taşıyan kişilerin belirlenmesi için uygun yöntemlerin bulunması, diyabetin henüz ortaya çıkmadan önlenmesini veya erken dönemlerde tedavisini mümkün kılacaktır. Bunu başarmak için, öncelikle T2DM'de genetiğin rolü ve genler ya da aile hikayesi bilgisinin hedef müdahalelere nasıl yardım edeceğinin anlaşılması gerekmektedir.

T2DM patogenezinde 2 temel bozukluk bulunmaktadır; kas, yağ ve karaciğer dokusu gibi hedef dokularda insülin etkisine karşı duyarlılığın azalması ile karakterize insülin direnci (İD) ve pankreas beta (β-) hücresinden bozulmuş insülin salınımı (Doria ve ark 2008). Diyabet açısından pozitif aile öyküsüne, azalmış fiziksel aktivite ve dismetabolik durumun (abdominal obezite, insülin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi) eklenmesi diyabet gelişim riskini oldukça artırmaktadır (Laaksonen ve ark 2002, Lorenzo ve ark 2003). Genetik olarak programlanmış insülin direnci ve β-hücre fonksiyon bozukluğuna çevresel faktörlerin eklenmesiyle yıllar içinde diyabet gelişebilmektedir. Bazı monogenik formların dışında, T2DM sıklıkla poligenik bir hastalıktır. Glukoz taşınımı, β-hücre fonksiyonu, insülin salgılanması ve etki mekanizmasında görevli proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen değişimler (mutasyon ve polimorfizmler) diyabet genetiğinin temelini oluşturmaktadır.

Son zamanlara kadar, aday gen yaklaşımına göre; insülin aktivitesi, işlevi ve salgılanmasında iş gören çok sayıdaki gen ve yaygın tek nükleotid değişimlerinin (single nucleotide polymorphism, SNP) T2DM için risk oluşturdukları öngörüsüyle birçok çalışma yapılmıştır. Ancak bu aday genlerin birçoğunun öne sürülen etkisi beklenenden daha hafif bulunmuş ve farklı populayonlardan gelen benzer ilişki çalışmalarının sonuçlarının birbiriyle uyumsuz olduğu görülmüştür.

Grant ve ark (2006)'nın İzlanda populayonunda T2DM'li bir grupta yaptıkları genom boyu tarama çalışmasında, TCF7L2 genindeki yaygın bir mikrosatellit marker (DG10S478) ile çok güçlü bağlantı kurulan iki intronik SNP'nin T2DM ile çarpıcı

şekilde ilişkili olduğunu gösteren oldukça güçlü veriler rapor etmeleri T2DM genetiğine yönelik çalışmalar için önemli bir adım olmuştur.

Aynı çalışmacılar tamamen tutarlı bir biçimde bu sonuçları Danimarka ve Amerika'daki vaka kontrol örnekleriyle de elde etmişlerdir (Grant ve ark 2006). Bu çalışmadan sonra T2DM ile ilişkilendirilen genler ile yapılan çalışmalarda TCF7L2 geni odak haline gelmiş ve orijinal bulgulardaki kodlanmayan bölge SNP'leri; rs7903146 ve rs12255372 ile T2DM arasındaki ilişki; kısa bir sürede birçok farklı etnik gruplardan gelen bilgiler ile de doğrulanmıştır. Örneğin İngilizler (Groves ve ark 2006), Avrupalı beyazlar, göçmen Asyalı Hintliler, Afrokarayipliler (Humphries ve ark 2006), Kuzey İsveçliler (Mayans ve ark 2007) ve Almanlar (Marzi ve ark 2007), Hintliler (Chandak ve ark 2007), Asyalı Hintliler (Bodhini ve ark 2007), Japonlar (Hayashi ve ark 2007, Horikoshi ve ark 2007), Meksika Amerikalıları (Lehman ve ark 2007), Batı Afrikalı bireyler (Helgason ve ark 2007), Faslılar (Cauchi ve ark 2007), Fransızlar (Sladek ve ark 2007), Amişler (Damcott ve ark 2006) ve Finlilerle (Scott ve ark 2006) yapılan çalışmalarda da aynı etki görülmüştür. Bununla birlikte, farklı populasyonlarda TCF7L2 risk varyantının toplum sağlığı üzerindeki önemini etkileyecek olan allel frekansında farklılıklar da bulunmuştur (Weedon 2007). TCF7L2 gen polimorfizmlerinin, Güney Asya Hintlileri, Japonlar ve Amerikalı bireylerde de diyabet gelişme riskini artırdığı rapor edilmiştir (Florez 2007). Beş geniş ölçekli genom boyu ilişki (GWA-Genome Wide Association) taramasının tamamlanmış olmasıyla birlikte ve birçok farklı populasyon çalışmasından gelen tutarlı bilgiler ışığında; T2DM'ye yatkınlık oluşturma anlamında bugüne kadar tanımlanmış olan aday genler içinde en dikkat çekeni TCF7L2 genidir (Sladek ve ark 2007, Zeggini ve ark 2007, DGIBIH 2007, Scott ve ark 2007, Steinthorsdottir 2007).

Tip 2 diyabet, kalıtımsal (poligenik) ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu çok farklı yaş gruplarında ortaya çıkabilen metabolik bir hastalıktır. T2DM'ye yatkınlık oluşturan genlerin açık bir şekilde tanımlanması ve hangi kalıtımsal özellikler ile ortaya çıktığının bulunması hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu sayede, hastaya uygulanacak tedavinin bireyin kalıtsal özelliklerinin dikkate alınarak uygulanmasının mümkün olacağı ve böylece hem koruyucu hem de tedavici edici sağlık hizmetlerinin, daha ekonomik ve hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmesi bakımından da daha verimli olacağı muhakkaktır.

Elde edeceğimiz sonuçların; genotip-fenotip ilişkisinin ortaya çıkarılması, hastalığın patolojisi ve kliniği ile ilişkilerinin değerlendirilerek hem ilerde geliştirilecek tedavi yaklaşımlarına hem de T2DM genetiği ile ilgili literatüre katkı sağlayacağı düşünülerek bu tez projesi tasarlanmıştır. Çalışmada TCF7L2 geni için literatürde belirtilen ve hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen polimorfizmlerden genin intron 3 ve intron 4 bölgesindeki 6 SNP taranmıştır. Ayrıca bu tez projesinin, TCF7L2 genindeki söz konusu 6 SNP'nin Türk toplumunda T2DM riski ile ilişkisinin ortaya konulmasına yönelik ilk çalışma olması bakımından, daha sonrasında planlanacak olan diğer çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (Şeker hastalığı), insülin hormonu salgılanmasının azalması veya insülin etkisinin eksikliği sonucunda; karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açan ve kronik hiperglisemi (kan şekerinin yükselmesi) ile karakterize, etiyolojisinde birden fazla etkenin rol oynadığı metabolik bir hastalıktır (Yenigün 2001, İmamoğlu 2005).

1.1.1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Amerikan Diyabet Derneği (ADA 2010) tanı kriterlerine göre; poliüri, polidipsi, glukozüri, ketoüri, agırlık kaybı gibi semptomlar ile birlikte ;

- alınan plazma örneginin glukoz miktarının **200 mg/dl** üzerinde olması
- **10-12** saat açlıktan sonra sabah bakılan plazma glukoz düzeyinin **126 mg/dl** veya üzerinde olması
- açlık kan glukozunun 126 mg/dl altında olmasına rağmen diyabet semptomları ve glukoz tolerans testinde (OGGT) glukoz degerinin **200 mg/dl** üzerinde olması **Diabetes Mellitus** olarak tanımlanır (Çizelge1.1).

Çizelge 1.1. Diabetes mellitus tanı kriterleri (ADA 2010)

Rastgele ölçülen plazma glukozu (Klasik hiperglisemi semptomlarıyla)	**≥ 200 mg/dl**
Açlık plazma glukozu	**≥ 126 mg/dl**
OGTT ile ölçülen plazma glukozu	**≥ 200 mg/dl**
HbA1c	**≥ 6.5 %**

1.2. Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırılması

I. Tip 1 Diyabet
   A. Immün aracılı
   B. Idiopatik

II. Tip 2 diyabet

III. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri (Tip 1 ve Tip 2 diyabetten farklı ve etiyolojileri bilinen diyabet tipleri)
   A. Beta Hücre Fonksiyonunda Genetik Kusurlar
      a) MODY 3 (Kromozom 12, HNF-1α)
      b) MODY 2 (Kromozom 7, glukokinaz)

c) MODY 1 (Kromozom 20, HNF-4α)

d) MODY 4 (Kromozom 13, insülin promotor faktör-1)

e) MODY 5 (Kromozom 17, HNF-1β)

f) MODY 6 (Kromozom 2, Neuro D1)

d) Mitokondrial DNA ve diğer tipler…

B. İnsülin Etkisindeki Genetik Kusurlar

C. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları

D. Endokrinopatiler

E. İlaç ya da kimyasal maddelerle indüklenenler

F. İnfeksiyonlar

1. Konjenital rubella

2. Sitomegalovirus

3. Diğerleri

G. İmmün kökenli nadir görülen diyabet formları

H. Diyabetle bazen ilişkili olabilen genetik sendromlar

IV. Gestasyonel diabetes mellitus

1.3. Tip 2 Diabetes Mellitus

1.3.1. Tip 2 Diyabetin Epidemiyolojisi

Tip 2 Diabetes Mellitus, en sık görülen diyabet tipi olup tüm diyabetlilerin % 90-95'ini oluşturmaktadır (ADA 2008). Obezite, fizik aktivite durumu, coğrafi ve ırksal değişkenlikler, hastalığın ortaya çıkışını etkilediği gibi görülme sıklığı bakımından da farklılıklara neden olmaktadır. Dünya genelinde özellikle Amerika Birleşik Devletlerinde Arizonadaki Pima yerlilerinde (% 50) ve Güney Pasifikte Nauru Adasında (% 40) en yüksek oranlarda görülmektedir (Buse ve ark 2008). Birçok bölgede, hastalığın görülme sıklığı kentsel ve kırsal alanlarda da farklılık göstermektedir. Sosyal çöküş, işsizlik, yoksulluk, hareket azlığı ve beslenme alışkanlıkları gibi etkenler kentlerde bu hastalığın görülme sıklığının yükselmesine yol açmaktadır.

T2DM, obez ve aile öyküsü zemini olan çocuk ve erişkinlerde gittikçe artan sıklıkta görülmektedir. İlk kez yerli Amerikalılar gibi genetik yatkınlığı olan etnik gruplarda rapor edilen çocukluk olguları, artık tüm dünyada bildirilmektedir (De Ferranti ve ark 2007, Shaw 2007, Buse ve ark 2008, Mayer-Davis 2008). Dünya

Sağlık Örgütü (WHO) tahminlerine göre 2007 itibarı ile dünyada 220 milyon diyabetli yaşadığı ve önlem alınmazsa 2030 yılına gelindiğinde, bu sayının 2 katına çıkacağı bildirilmiştir. IDF Diyabet Atlası'nda dünyanın bozulmuş glukoz toleransı (BGT) prevelansı da hesaplanmıştır. Buna göre halen % 7.9 olduğu varsayılan BGT prevelansının yaklaşık olarak % 37 artış göstererek % 8.4'e ulaşacağı sanılmaktadır. Sayısal olarak ifade edilirse halen 344 milyon olduğu tahmin edilen BGT'li prediyabetik nüfusun 2030 yılında 472 milyona ulaşması beklenmektedir (IDF 2009). Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) yayınladığı son rapora göre dünyada 20-79 yaş grubunda 2030 yılı için beklenen diyabet ve BGT sıklıkları ile 2010 verileri Çizelge 1.2'de verilmiştir (TDÖKP 2011).

1997–1998 yılları arasında ülkemizde 270 köy ve 270 mahalle merkezinde gerçekleştirilen rastgele seçilmiş yaklaşık 25 bin kişide yapılan "Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP I)'na göre, 20-80 yaş grubu diyabet sıklığı %7.2 (henüz tanı konmamış yeni diyabet prevalansı %2.3 ve bilinen diyabet sıklığı %4.9), BGT ise %6.7 olarak bildirilmiştir. 60 yaş üzeri populasyonda ise diyabet prevalansı %20'nin üstüne çıkmaktadır (Satman ve ark 2002). Bu oranlara dayanarak Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2007 yılı nüfus rakamlarına göre ülkemizde 2.85 milyonun üzerinde Tip 2 diyabetli ve 2.6 milyon civarında BGT'linin yaşadığı hesaplanmaktadır. Çalışma, ülkemizde yaşayan diyabetlilerin %32'sinin hastalıklarının farkında olmadıklarını ortaya koymuştur. Türkiye'deki Diyabet ve BGT sıklıklarına ilişkin 2010 yılı verileri Çizelge 1.3'de görülmektedir (TDÖKP 2011).

Çizelge 1.2. 2010 Yılında Dünya'da Diyabet ve Bozulmuş Glukoz Toleransı ve 2030 Yılı için Beklenen Artış (20-79 yaş grubu)

	2010 yılı	**2030 yılı**
NÜFUS		
Dünya nüfusu (toplam-milyar)	7,0	8,4
Erişkin nüfus (20-79 yaş)	4,3	5,6
DİYABET		
Genel prevelans (%)	6,6	7,8
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevelans (%)	6,4	7,7
Diyabetli sayısı (milyon)	285	438*
BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI (BGT)		
Genel prevelans (%)	7,9	8,4
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevelans (%)	7,8	8,4
BGT'li sayısı (milyon)	344	472
TİP 1 DİYABET (0-14 yaş)		
Toplam çocuk nüfusu (milyar)	1.9	-
Tip 1 diyabetli çocuk sayısı (bin)	479.6	-
Yeni Tip 1 diyabetli çocuk sayısı (bin)	75.8	-
Yıllık insidans artışı (%)	3,0	-
DİYABET MORTALİTESİ (20-79 yaş)		
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Erkek)	1.826.485	-
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Kadın)	2.136.571	-
DİYABETE BAĞLI SAĞLIK HARCAMALARI		
Kişi başı sağlık harcaması R=2**	703 ABD Doları	-

*2010'dan 2030'a diyabet artışı %54,0 **R=2: Düşük gelir grubu ülkelere göre diyabet maliyet oranı (TDÖKP 2011).

Multifaktöriyel bir hastalık olan T2DM prevalansında çok geniş etnik ve coğrafi farklılıklar mevcuttur. Toplumların sosyal yaşamlarının hızla batılılaşması sonucu gelişen durağan yaşam tarzı T2DM'nin genetik yatkınlığındaki epidemiyi açıklayabilir (Malecki 2005).

Çizelge 1.3. 2010 yılında Türkiye'de Diyabet ve Bozulmuş Glukoz Toleransı

Türkiye nüfusu (toplam)	71.517.100*
Erişkin nüfus (20-79 yaş)	49.759.000*
DİYABET	
Ulusal prevelans (%)	7,4
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevelans (%)	8,0
Diyabetli sayısı	3.679.000
BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI (BGT)	
Bölgesel prevelans (%)	6,3
Dünya nüfusunun standart dağılımına göre prevelans (%)	6,7
BGT'li sayısı	3.137.700
TİP 1 DİYABET (0-14 yaş)	
Tip 1 diyabet insidansı (100.000/yıl)	3,2
DİYABET MORTALİTESİ (20-79 yaş)	
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Erkek)	13.001
Diyabete bağlı ölüm sayısı (Kadın)	20.830
DİYABETE BAĞLI SAĞLIK HARCAMALARI	
Kişi başı sağlık harcaması R=2**	572 ABD Doları

*TUİK Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi 2008 yılı verileri (http://www.turkstat.gov.tr) **R=2: Düşük gelir grubu ülkelere göre diyabet maliyet oranı (TDÖKP 2011).

1.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Patofizyolojisi

Diabetes Mellitus, Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus olarak iki gruba ayrılır. Tip 1 Diabetes Mellitus pankreatik β-hücrelerinin otoimmün parçalanmasına bağlı olarak mutlak insülin yetersizliği ile ortaya çıkan genç yaş şeker hastalığıdır. Tip 2 Diabetes Mellitus ise, hedef dokularda insülin direnci ve pankreatik β-hücrelerinde insülin salınımının azalması ile karakterize edilen bir hastalıktır (Özbey ve Orhan 2003). Tip 1 şeker hastalığının aksine bu hastalarda daima bir insülin üretimi ve salınımı vardır. Fakat insülinin hedef doku hücrelerinde insüline karşı bir direnç vardır (Dorman ve ark 2004).

Normal glukoz seviyesinin korunması (homeostaz), dokuların insülin varlığında glukozu alabilme yeteneğine (insülin hassasiyeti), hücelerin insülin

yokluğunda glukozu kullanabilme yeteneğine (glukoz hasasiyeti) ve pankreatik β-hücrelerinin düzenli insülin salınımıyla glukoz seviyesini kontrol edebilme yeteneğine ve insülin üretim ve salgılama seviyesinin kandaki glukoz seviyesine göre düzenlenmesine bağlıdır. T2DM hastalarında periferal dokularda insüline karşı hassasiyet azalmış ve bir direnç kazanılmıştır. İkinci özellik ise, bu hastalarda pankreatik β-hücreleri, artan direnci aşacak insülini salgılayamamaktadır (Mueckler ve ark 1994, Eftychi ve ark 2004).

T2DM gelişiminde insülin direnci ve β-hücre fonksiyon bozukluğunun hangisinin daha önce ve daha önemli olduğu tam bir kesinlik kazanmamıştır (Kabalak ve Çetinkalp 2009). T2DM gelişimi açısında risk taşıyan diyabetiklerin birinci derece akrabalarında henüz glukoz tolerans bozukluğu gelişmeden önceki dönemlerde insülin direnci (İD) varlığının gösterilmesi hastalığın patogenezinde insülin direncinin primer bozukluk olabileceğini düşündürmüştür (Martin ve ark 1992). Bununla birlikte, diyabet açısından aile öyküsü olmayan non-diyabetik bireylerde sadece İD' nin bulunmasının ileride diyabet gelişimi için çok kuvvetli bir belirleyici olmadığı da gösterilmiştir (Goldfine ve ark 2003). İnsüline direnç gelişimi T2DM riskini artırmasına karşılık, hastalıkta temel özellik β-hücre işlevinin bozulmasıdır (Utzschneider 2004, Kahn 2004). β-hücre fonksiyonunun bozulması β-hücre kütlesinde azalma ile beraberdir ve diyabetin ortaya çıkmasından daha önce vardır. Ancak disfonksiyona yol açan mekanizmalar henüz tam anlaşılamamıştır.

Daha yaygın kabul edilmekte olan görüş ise her iki bozukluğun (β-hücre işlevi ve insüline direnç gelişimi) da T2DM patogenezinde önemli olduğu ve erken basamaklarında yer aldığıdır (Lyssenko ve ark 2005). Fakat bu iki bozukluğun patogeneze olan etkileri heterojendir, etnik ve kişisel farklılıklar göstermektedir. T2DM, çevresel ve genetik faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Diyabet açısından pozitif aile öyküsüne, azalmış fiziksel aktivite ve dismetabolik durumun (abdominal obezite, insülin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi) eklenmesi diyabet gelişim riskini oldukça artırmaktadır (Laaksonen ve ark 2002, Lorenzo ve ark 2003).

İleri yaş, şişmanlık, egzersiz yetersizliği, şeker hastalığı aile öyküsü, sigara, genetik yatkınlık, beslenme alışkanlıkları, insülin direnci sendromları, pankreas hastalıkları, geçirilmiş gestasyonel diyabet, coğrafi ve ırksal değişkenliklerden dolayı görülme sıklığındaki farklılıklar gibi değişik klinik risk faktörleri hastalık gelişimi ile ilişkilidir. Başlangıç yaşı genelde 40'ın üzerinde olmakla birlikte son yıllarda

gençlerde de önemli oranlarda rastlanmaktadır. Hastaların %80 kadarı şişmandır (Akçay 2000, Yenigün 2001). T2DM'de her birey için altta yatan sebepler farklılık gösterir. Obezitenin varlığına ve yokluğuna göre T2DM, iki alt gruba ayrılır; obez T2DM ve obez olmayan T2DM. Irklara göre diyabette obezite prevalansı farklılık gösterir. Obezite, vücut kitle indeksi (VKİ)'nin >30kg/m^2 olması şeklinde kabul görmektedir. Şeker hastalığı gelişme riski VKİ'nin (ağırlık (kg)/boy (m^2)) artması ile ilerleyerek artar. Şeker hastalığı genellikle ağız kuruluğu, polidipsi, poliüri, bulanık görme ve kilo kaybı gibi belirtiler ile ortaya çıkar (Dorman ve ark 2004).

Bireylerde bir kez diyabet geliştikten sonra, beraberinde bulunan metabolik bozukluklar birincil neden ile ikincil nedenlerin birbirinden ayrılmasını zorlaştıracağı ve erken tanı ile diyabet gelişim riski yok edilebileceği ya da en azından ötelenebileceği için prediyabetiklerin tanı, tedavi ve takibi önemlidir

Kronik hiperglisemi, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları beraberinde getirir. Kardiyovasküler hastalıklar, nefropati, nöropati, retinopati ve alt ekstremite amputasyonları gibi diyabetle ilişkili komplikasyonlar, artmış morbidite ve mortalitenin önemli nedenleridir.

T2DM'nin çok azı (<%5) monogenik iken çoğu poligeniktir ve kronik hiperglisemi ve dislipidemiye yanıtta metabolik bir düzensizlik söz konusudur. Transgenik hayvan çalışmalarıyla bu bozuklukların nasıl geliştiği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Hepatik glukoneojenetik enzimlerin artışı, pankreatik β-hücrelerinde glukokinaz azalması, iskelet kasında tirozin kinaz eksikliği olan insülin reseptörlerinin aşırı sunumu, iskelet kası ve yağ dokusunda GLUT4 glukoz taşıyıcılarının eksikliği ile glukoz intoleransı gelişmiş, fakat aşikar diyabet ortaya çıkmamıştır (Virally ve ark 2007). Sonuç olarak; T2DM, İD ve insülin salgılanması bozukluğunun birlikteliğinde ortaya çıkmaktadır. β-hücre disfonksiyonu; insülin salgılanmasının pulsalite ve kinetiklerindeki bozukluk, insülinin kantitatif veya kalitatif anormallikleri ve β-hücre kaybını içerir. Normoglisemik kişilerde insülin salgılanması her 10-15 dakikada bir pik ve her 60-120 dakikada daha büyük bir salınım gösterir. Tip 2 diyabetiklerde erken faz insülin salınımı kaybolmuş, geç faz ise azalmış ve gecikmiştir. İnsülin salgılanmasının ilk fazındaki azalma diyabetin erken dönemlerinde hatta diyabet öncesi dönemde gösterilmiştir (Virally ve ark 2007). Pulsatilite ve glukoza ilk faz insülin yanıtındaki bozulmanın kısmen glukokinaz ve iyon kanallarında fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Virally ve ark 2007). T2DM'de insülin salgılanmasındaki azalma

ilerleyicidir. Birleşik Krallık Potansiyel Diyabet Çalışması (United Kingdom Prospective Study-UKPDS) verilerine göre T2DM tanısı alan hastaların çoğunda tanı sırasında β-hücrelerinin sadece % 50'sinin fonksiyon gördüğü bilinmektedir. Yaşam tarzı değişikliği, biguanid, sülfonilüre ya da insülin ile tedavi edilenlerin tedaviden 6 yıl sonra fonksiyon gören β-hücresi % 25'dir. T2DM tanısından yaklaşık 10-15 yıl sonra endojen insülin salgılanması normalin % 10'u kadardır (Çorakcı ve ark 2009).

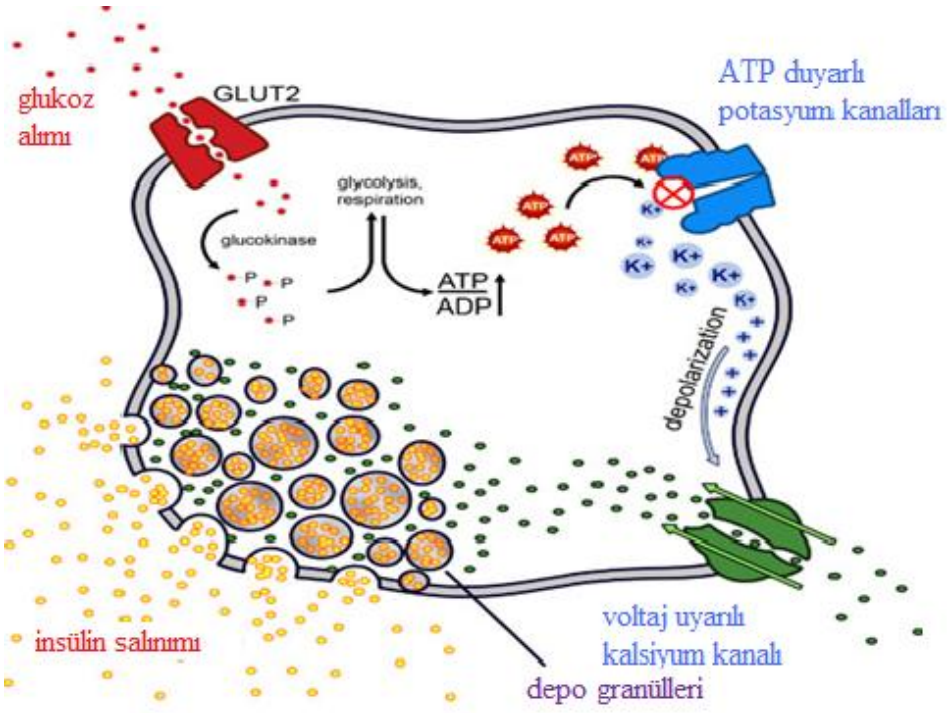
Diyabetik olmayanlarda, β-hücrelerinden insülin duyarlılığına göre gereksinim kadar insülin salgılanır ve böylece plazma glukoz düzeyinin normal sınırlar içinde sürdürülmesi sağlanır. İnsülin salgılanması ve duyarlılığı arasında hiperbolik bir ilişki vardır. Kompanzasyon bozulursa plazma glukozu dereceli olarak yükselir. β-hücre fonksiyon bozukluğu Tip 2 diyabetin erken dönemlerinin yanı sıra Tip 2 diyabetiklerin normoglisemik birinci derece yakınlarında da gösterilmiştir (Pimenta ve ark 1995). İD, glukozun karaciğerde aşırı üretimi ve iskelet kasında azalmış alım ve tüketimi ile karakterizedir. İskelet kasındaki İD'nin, insülin bağımlı glukoz taşınımındaki bozukluk nedeniyle geliştiği gösterilmiştir. Tip 2 diyabetiklerde, insülin tarafından uyarılan glukoz taşıyıcılarının (GLUT4) hücre zarında tanınması azalmaktadır (Virally ve ark 2007). Çeşitli metodların özellikle de "öglisemik hiperinsülinemik klemp" tekniğinin kullanılması Tip 2 diyabetiklerde İD'nin tanımlanmasında önemli bulgular sağlamıştır. Tip 2 diyabetik obezler kendileri ile benzer derecede obez fakat nondiyabetik kişilere göre daha fazla insülin direnci gösterirler (Virally ve ark 2007).

1.4. Pankreas β-Hücrelerinde İnsülin Salınım Mekanizması ve Glukozun İnsülin Salgılanmasındaki Rolü

İnsülin, pankreastaki langerhans adacıklarının β-hücreleri tarafından üretilen polipeptid yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Granüllü endoplazmik retikulumun ribozomlarında preproinsülin olarak sentezlenir. Preproinsülin, salgı granülleri içinde paketlenecek şekilde proinsüline yıkılır. Proinsülin, golgi aygıtına geçer ve buradaki proteazların etkisiyle c-peptid segmenti koparılarak insüline dönüşür (Steiner ve James 1992). Proinsülinin bir kısmı (%15 kadarı) yıkılmaz ve az miktarda c-peptid ve insülin ile birlikte dolaşıma salınır. Bu kısmın miktarında artış plazma proinsülin/insülin oranında artışı ifade eder ve insülin olgunlaşması/salınma bozukluğunun bir göstergesi olarak düşünülür. Bu oran Tip 2

diyabetiklerde artmaktadır (% 40 civarı) (Roder ve ark 1998, Kahn 2000, Ahren 2005). C-peptid insülin salgılanmasının periferik göstergesidir (Pedersen ve ark 1990).

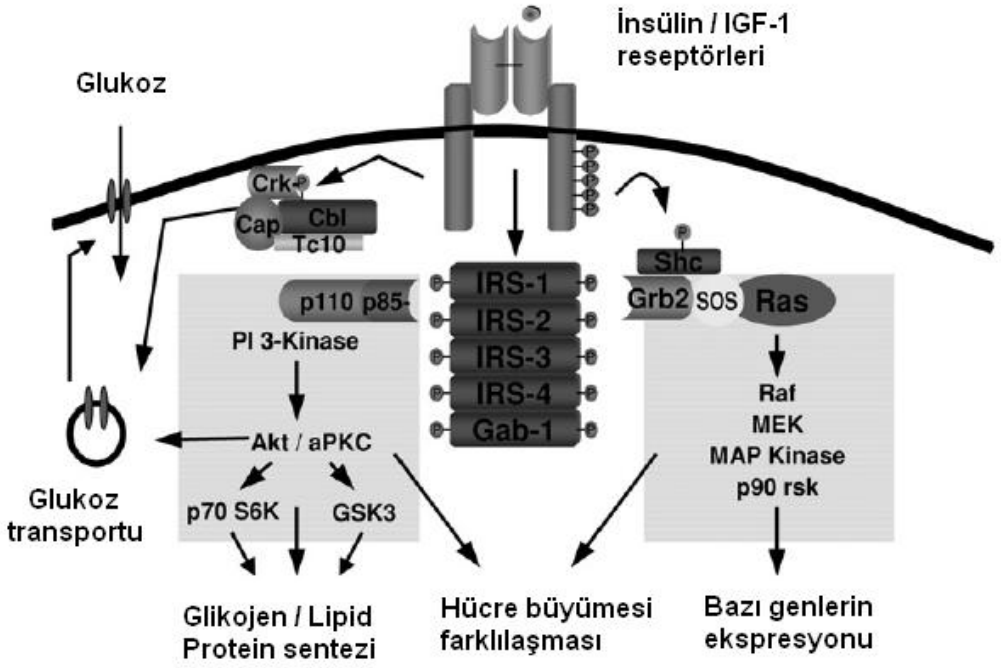
Glukoz, insülinin hem yapımında hem de salgılanmasında en önemli rolü oynar. Besin sindirimi sonucu, kanda glukoz düzeyi yükselmeye başlayınca, glukozun β-hücresine giriş hızı artar. İnsülin salgılanması için en güçlü etki, β-hücrelerine glukozun alınımıyla sağlanır. Glukoz hücrelere özgün bir taşıyıcı ile (GLUT 2) taşınır, sonra glukokinaz ile fosforillenir ve son olarak Krebs döngüsünde glikoliz ile metabolize olur. Hücre içi enerji üretimindeki artış ATP/ADP oranında artışa ve ATP-duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) inhibisyonuna neden olur. K_{ATP} kanallarının kapanması ile K^{+}'un hücre dışına geçişi bloke olur ve zarın depolarizasyonuna neden olur. Depolarizasyon Ca^{++} kanallarını açar, Ca^{++} iyonları hücre içine akar ve bu da sitozolik Ca^{++} konsantrasyonunda artışa, plazma zarına insülin granüllerinin füzyonuna ve sonuçta insülin salınımına (ekzositoz) neden olur (Şekil 1.1) (Laukkanen ve ark 2004, Malecki ve Klupa 2005). Salgılanan insülin, kapiler damar duvarından geçerek kana karışır; kan yoluyla vücudun herhangi bir köşesine erişebilir ve eriştiği yerlerdeki dokuları etkileyebilir.



Şekil 1.1. Pankreatik beta hücrelerinden İnsülin salınım mekanizması (www.betacell.org/content/articles/articlepanel)

1.5. İnsülinin Hedef Dokularda İşlevi

İnsülin; hedef hücrelerde hücreler arası ve hücre içi madde alışverişi, protein kinazların ve fosfatazların uyarımı, hücresel büyüme ve farklılaşmanın teşviki gibi farklı yolakları aktive ederken bazı yolakları da inhibe eder (Baumann ve Saltiel 2001). İnsülin, metabolik ve büyümeyi devam ettiren iki işleve sahiptir (Kahn ve ark 2004). İnsülinin metabolik işlevi, insülin uyarı-ileti yolunu içerir. İnsülin uyarı-ileti yolunun en önemli aracısı olan reseptörler (almaç), hormonları bağlayan ve bu bağlanmadan sonra hormonun fizyolojik işlevinin başlamasında aracı olan özgün proteinlerdir (Kahn ve ark 2004). İnsülin reseptörü (IR) çift işlevlidir. İnsülin işlevinde ilk adım, insülinin hücrenin plazma zarındaki reseptöre bağlanmasıdır. Daha sonra reseptör-ligand bileşeni hücrede bir seri fizyolojik etkileri tetikler (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. İnsülinin moleküler etki mekanizmasının şematik görünümü (Kahn 2003'den değiştirilerek alınmıştır).

İnsülinin ana hedef dokuları; kas, yağ ve karaciğerdir. İnsülin, bu dokularda glukozun hücre içine girmesini sağlar ve enerji depolarından glukozun salınımını engeller. Çizgili ve kalp kasında glikojen ve protein sentezini teşvik eder ve yağın depolanmasını kolaylaştırır. İnsülin, glikojenoliz ve glikoneojenezi inhibe ederek, karaciğerden glukoz çıkışını baskılar ve glukoz düzeylerini düşürür (Zhang 1996).

İnsülinin glukoz metabolizmasındaki ikinci etkisi glukozu glikojen olarak depolamak için karaciğeri uyarmaktır. İnce bağırsaktan emilen glukozun büyük bir kısmı hepatositler tarafından hemen alınır ve glikojen olarak depolanır.

İnsülinin ikinci etki mekanizması olan büyümeyi teşvik eden etkileri, insülin benzeri büyüme faktörleri olarak (insuline like growth factor, İGF) bilinen diğer hormon gruplarıyla ilgilidir. İGF, insülinin biyolojik etkilerini taklit etme yeteneğinde olan polipeptid hormon ailesidir (Zapf ve ark 1984).

1.6. Glukoz Homeostazı

Normal bir kişide açlık ve tokluk fark etmeksizin plazma glukoz düzeyi oldukça dar sınırlar (3.3 – 8.3 mmol/L) içinde tutulur. Bu sıkı kontrol, karaciğer glukoz üretimi ile periferik dokularda glukozun kullanımı arasındaki denge ile sağlanır. İnsülin, kan glukoz düzeyinin temel düzenleyicisidir. Kas ve yağ dokusuna glukoz alımını artırır ve karaciğerde glukoz yapımını inhibe eder. Ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşmasını uyarır, lipoliz, glukojenoliz ve protein yıkımını engeller. İnsülin direnci veya eksikliğinde bu süreçlerde bozukluk, açlık ve tokluk kan glukoz ve lipid düzeylerinde yükselme meydana gelir (Saltiel ve Kahn 2001) (Şekil 1.2).

1.7. Tip 2 Diyabet Gelişiminde Genler ve Çevresel Faktörler

Tip 2 diyabet hastalığının oluşmasında genetik ve çevre olmak üzere iki grup faktör etkilidir (Malecki ve Klupa 2005). Diyabet ile aile öyküsü arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Amerika'da yapılan bir çalışmada bir aile üyesinde diyabet olması durumunda diğerleri için riskin iki kat daha yüksek olduğu, iki bireyinde diyabet olması durumunda ise riskin dört kat yüksek olduğu görülmüştür. Genetik eğilimin önemi yanında en önemli bağlayıcı etkenlerden biri de çevresel faktörlerin etkisidir. Bu faktörlerin değişken olması risk grubundaki hastaların büyük bir kısmı için rahatlatıcıdır. Çevresel faktörler iyileştirildiğinde risk azalmaktadır. Yine buradan yola çıkarak, genetik eğilimi olan kişilerde obezitenin tedavi edilmesinin ve diğer risk faktörlerinin iyileştirilmesinin (ya da ortadan kaldırılmasının) son derece önemli olduğu söylenebilir.

Tip 2 diyabetin klinik olarak heterojen bir hastalık olması genetik zemininin de heterojen olduğunu düşündürmektedir. Tip 2 diyabet için tanımlanmış tek bir gen yoktur. Sadece, genç erişkinlik döneminde başlayan diyabet (MODY) bunun dışındadır. Tip 2 diyabet sıklıkla poligeniktir ve glukoz toleransı üzerine olan etkileri

kişiden kişiye değişiklik gösteren farklı gen varyantları arasındaki etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Obezite, Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların ortak bir genetik zemine dayandıklarına dair kanıtlar vardır (Froguel ve Hager 1995, Carmelli ve ark 1994, Stern 1996). Obezite gelişiminden ve neden olduğu olumsuz sonuçlardan "diyabet" geninin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Hales ve Barker 1992). Bu genotip, gelisimsel açıdan değerlendirildiğinde, fazla kalorilerin yağ olarak depolanmasını sağlamakta ve obezite gelişimine yol açmakta, buradan da Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gelişmektedir.

Birçok farklı yönden elde edilen veriler T2DM patogenezinde genetik bileşenlerin rolünü destekleyen önemli kanıtlar oluşturmaktadır.

1.7.1. T2DM nin genetik temelini ortaya koyan kanıtlar

Farklı etnik gruplarda farklı diyabet prevalansı: T2DM prevalansı populasyondan populasyona çok geniş bir spektrumda farklılaşır. Şili Mapuşe yerlilerinde % 1, Avrupa Kafkas halkında % 2, Nauru (Pasifik adasında) % 41 ve Arizonadaki pima yerlilerinde ise % 50'dir (Malecki ve Klupa 2005, Das ve Elbein 2006). Pima yerlilerinde olduğu gibi bazı etnik gruplarda T2DM sıklığı sadece çevresel faktörler ile açıklanamayacak kadar yüksektir (Bhatia 2004).

Ailesel kümelenme: Aileler genlerden başka çevreyi, kültürü ve alışkanlıkları da paylaşırlar. Bu nedenle ailesel kümelenme diyabet patogenezinde genlerin rolüne önemli kanıtlardan biridir. Diyabetik bir probandın kardeşlerinde T2DM gelişme riski, genel populasyon ile karşılaştırıldığında 4 kat daha fazladır (Das ve Elbein 2006). Tip 2 diyabetiklerin birinci derece yakınlarında insülin duyarlılığı daha azdır ve ileride diyabet gelişimi sıktır (Lyssenko ve ark 2005).

İkiz çalışmaları: T2DM patogenezinde genetiğin önemli olduğuna yönelik kanıtlar ikiz çalışmaları sonucunda elde edilmeye başlamıştır (Malecki 2005). Amerika ve Danimarka'daki T2DM çalışmalarında elde edilen verilere göre, monozigotik ikizler arasındaki konkordans (hastalığın aynı anda ikiside de görülmesi) oranı (%41-55), dizigotik ikizlere (%10-15) göre oldukça yüksektir (Malecki ve Klupa 2005, Das ve Elbein 2006).

1.7.2. Çevresel faktörlere yönelik kanıtlar

Bütün bunların yanı sıra T2DM insidansının, çevresel faktörlerle de yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yaşam şekli ve beslenme alışkanlıkları ile açıkça bağlantılı şekilde yükselen T2DM insidansı, hastalığın gelişiminde sadece genetik özelliklerin değil beslenme ve fiziksel hareketlilik gibi çevresel faktörlerin de rolüne dikkat çekmektedir. Farklı coğrafik ve kültürel bölgelerde yaşayan akraba populasyonlarda (örneğin Japonya ve USA'de yaşayan Asyalılar), T2DM prevalansında farklılıkların olması genetik olmayan faktörlerin rollerini desteklemektedir (Fujimoto ve ark 1994, Malecki 2005). İkiz çalışmalarında, T2DM'nin monozigotik ikizlerde aynı anda bulunma oranlarının yüksekliği ile ilgili olarak, bu ikizlerin genellikle tek bir plasentayı paylaşmaları ve aynı intrauterin çevreden etkilenmeleri olabileceği yaklaşımı da yine çevresel faktörlere dikkat çekmektedir (Williams ve Pick Up 2004).

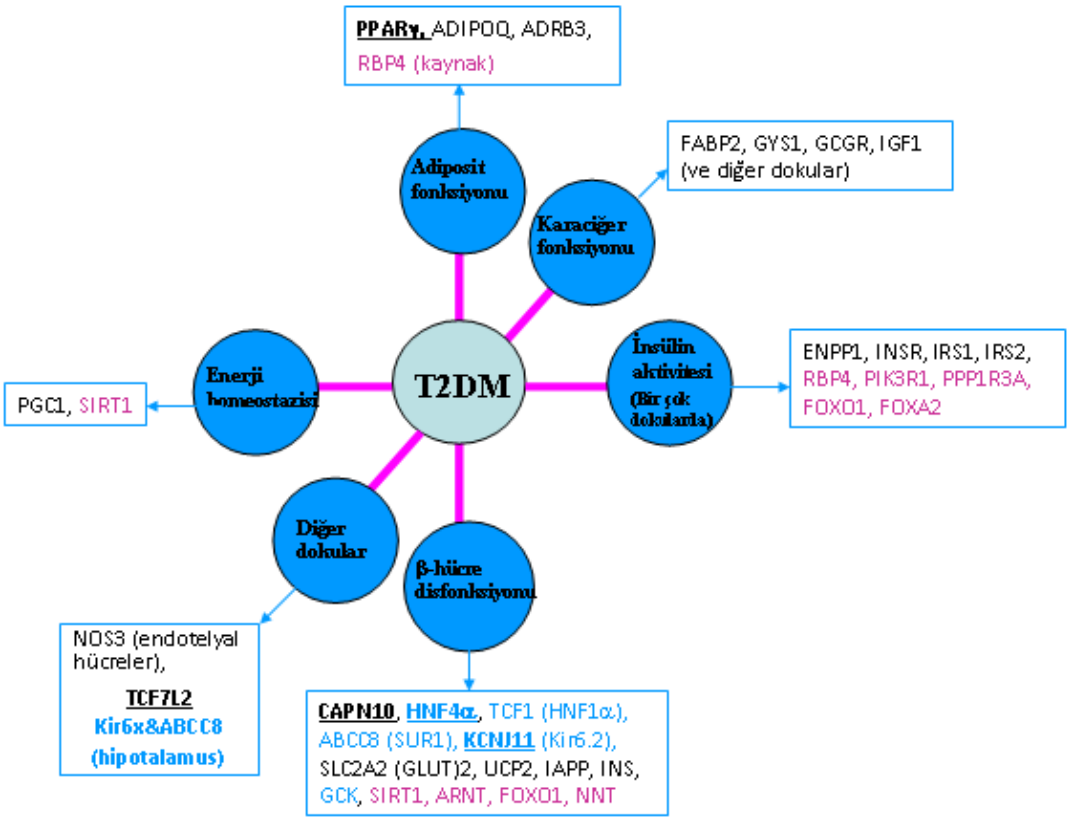
1.8. Tip 2 Diyabetin Moleküler Genetiği

Genetik özelliklere göre T2DM, monogenik ve poligenik olarak ikiye ayrılabilir. Monogenik formlar, tek bir gendeki nadir mutasyonlar sonucu ortaya çıkan, belirli klinik ve fenotipik özellikler gösteren T2DM formlarıdır. Fenotipik olarak kendini göstermesi (penetransı) yüksektir, genotip/ fenotip oranı 1' e yakındır. Genetik faktörler patogenezde önemli rol oynadığı için hastalığın kliniği çevresel faktörlerle çok az değiştirilebilir. MODY (maturity onset diabetes of the young – gençlerde görülen erişkin tipi diyabet) monogenik T2DM formuna bir örnektir (Malecki 2005).

Poligenik ya da multifaktöriyel T2DM, birçok farklı genin birbirleri ve çevre ile karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıktığı için klinik görünümü de daha karmaşık ve heterojendir. Bu karmaşık genetik yapının incelenmesi T2DM patogenezinin aydınlatılması, diyabet ve komplikasyonların gelişimi açısından riskli bireylerin belirlenmesi, genom-ilaç etkileşimlerinin aydınlatılarak hastaların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için önemli bilgiler sağlayabilir. Monogenik bozuklukların tersine poligenik T2DM'de hastalığa yatkınlık oluşturan ve hastalık oluşumundan koruyan allelleri ortaya çıkarma konusunda bazı zorluklar bulunmaktadır. T2DM, patogenez açısından ortak mekanizmaları paylaşabildiği diğer bozukluklar ile sıklıkla birlikte bulunmaktadır. Hastalığın teşhisi için genetik ve çevrenin uzun süre etkileşimi söz

konusudur. Gen-gen ve gen-çevre arasında oldukça karmaşık bir etkileşim vardır ve tam olarak çözümlenmesi oldukça zorlayıcıdır. T2DM genlerinin keşfinin ilk basamağında, araştırıcılar diyabet ile ilişkili olabilecek genleri tanımlamak için bağlantı analizi temeline dayalı teknikleri kullanmışlardır. Bu yaklaşım göreceli olarak küçük aile çalışmalarında güçlü etkileri olan genleri keşfetmek için uygundur.

Glukoz taşınımı, β-hücre işlevi, insülin salgılanması ve insülin işlevi ile ilişkili genlerin diyabet gelişiminde aday genler olabileceği düşünülmüştür (Şekil 1.3). Her bir aday genin allel sıklıkları diyabetik olgu ve kontrol gruplarında kıyaslanarak, fazla ifade edilip edilmedikleri araştırılmıştır. Bu çalışmalar kullanılarak günümüze kadar diyabet ile güçlü ilişkili olduğu saptanan birkaç gen bulunmaktadır. Bunlardan PPARγ geni, kodon 12 de prolin-alanin değişimi (Pro12Ala), T2DM ile ilişkisi kesin olarak gösterilmiş ilk polimorfizmlerden biridir (Malecki 2005, Grant ve ark 2009). Sonrasında KCNJ11 genindeki E23K polimorfizmi (Gloyn ve ark 2003) ve Calpain 10 (CAPN10) (Weedon ve ark 2003) gen polimorfizmlerinin de T2DM riski ile ilişkili olduklarına dair çalışma sonuçları rapor edilmiştir. Bağlantı analiz çalışmalarını, bugün devam etmekte olan büyük genom çalışmaları izlemiş ve diyabet ile ilişkili farklı genler ortaya çıkarılmıştır. Aday genler arasında; pankreas β-hücresi ile kas, yağ dokusu ve glukoz metabolizmasında yer alan proteinleri kodlayan genler de sayılabilir (Malecki 2005) (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Biyolojik fonksiyonlarına göre T2DM gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen aday genler (Freeman ve Cox 2006).

1.8.1. Monogenik kökenli Diyabet

Tek bir gende nadiren görülen mutasyonların bir sonucudur. Mutasyonlar gen yapısını ve dolayısıyla bir proteinin ya da nadiren bir tRNA'nın fonksiyonunu değiştirebilir. Bazı durumlarda bunlar, genlerin düzenleyici kısımlarında yerleşebilir ve gen ifadesini değiştirebilirler. Monogenik formlar, yüksek fenotipik penetrans ile karakterizedirler. Mutasyonun varlığı hastalık gelişiminin kesin olarak ortaya çıkması anlamındadır. Erken yaşta tanı konulur, her zaman olmasa da sıklıkla şiddetli klinik görünüm ve bazen de ekstra-pankreatik özelliklerin varlığı söz konusudur. Bunların patogenezinde çevre klinik görünümü yalnızca hafif bir şekilde etkilerken genetik zemin oldukça kritik bir rol oynar (Malecki ve Klupa 2005).

T2DM'nin sadece küçük bir kısmını kapsayan monogenik formların diyabet ile ilgili risk etkileri çok başarılı bir şekilde belirlenebilmiştir. Bu durum monogenik formların, oldukça net tanımlanmış kalıtım modellerinin olması ve erken yaşta tanı dolayısıyla çok jenerasyonlu ailelerde çalışmanın net kolaylığının bir sonucu olarak oluşmuştur. Monogenik T2DM nin bilinen formları, ya insülin salgılanmasında

şiddetli defekt ya da insülin duyarlılığında oldukça büyük bir azalma ile karakterizedir. Diğer Mendeliyen kalıtım özelliklerinde olduğu gibi, bazı bireyler ve ailelerin sağlığı üzerindeki büyük ve derin etkiye rağmen populasyon genelinde rolleri oldukça sınırlıdır (Malecki ve Klupa 2005).

1.8.2. Çok Genli Kalıtım Gösteren Diyabet

Poligenik ya da multifaktöriyel olarak da adlandırılan kompleks T2DM'nin klinik tablosu, birçok farklı genin birlikte etkin olduğu genetik zemin ve çevre arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Olası birçok geni işaret eden, kalıtım düzeni gösteren çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte net sayı ve bu genlerin göreceli iştirakleri kesin değildir. Aynı ya da farklı nedensel yolaklara ait farklı genler T2DM gelişimine iştirak edebilir (Malecki ve Klupa 2005, Das ve Elbein 2006). Bazı genler bir populasyonda diyabet gelişiminde oldukça etkili olabilirken bir başka etnik grupta sınırlı etkili olabilir ya da hiç etkili olmayabilir. T2DM'nin kompleks formlarına yatkınlık, ekzonlarda aminoasit varyantlarına neden olan ya da düzenleyici bölgelerde (promotor ve intronlarda olabilir) genlerin ifadesini etkileyen yaygın polimorfizmler ile ilişkilidir. Bu polimorfizmlerin allelleri hem sağlıklı bireylerde hem de T2DM hastalarında fakat farklı sıklıklarda bulunur. Bu dizi farklılıkları hastalığın gelişme riskini yalnızca sınırlı biçimde artıracak kadar ilişkilidirler. Dolayısıyla, bu polimorfizmler hastalığa yatkınlık oluşturan varyantlar olarak düşünülebilirler, fakat net bir şekilde hastalığı oluşturan etkin nedensel faktörler değildirler (Malecki ve Klupa 2005).

Son yıllarda birçok bilim adamı ve/veya çalışma grupları tarafından, gerek insülin salınımında gerekse insülinin işlevinde rol oynayan çok sayıdaki proteinlerin genlerindeki mutasyonların ve/veya polimorfizmlerin Tip 2 diyabet ile ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar rapor edilmiştir (Barraso ve ark 2003, Das ve Elbein 2006)

Lipoliz ve serbest yağ asidi metabolizmasını düzenleyen β adrenerjik reseptör ve hormon duyarlı lipazı kodlayan genlerdeki mutasyonlar, TNF-α, PPAR-γ, adiponektin, rezistin, calpain 10, glikoprotein PC-1, insülin reseptör substratları ve glikojen sentaz gibi insülin duyarlılığını etkileyen genlerdeki mutasyonlar, Kir6.2, SUR1 ve insülin geninin transkripsiyon başlama noktasının -0,5 kb yukarısında yerleşik VNTR ilişkili mutasyonlar T2DM gelişiminden sorumlu tutulan başlıca

değişikliklerdir (Mueckler ve ark 1994, Pugliese ve Miceli 2002, Eftychi ve ark 2004).

İnsülin salgılama mekanizmasının düzenlenmesinde görev alan proteinleri kodlayan genler üzerinde yapılan çalışmalarda, özellikle glukoz taşıyıcı protein 2 (GLUT2) ve ATP bağımlı potasyum kanal (K_{ATP}) proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların insülin salgılanması açısından önemli olduğu ortaya konmuştur (Mueckler ve ark, 1994, Eftychi ve ark, 2004, Gönen ve ark 2012). İnsüline karşı hedef hücrelerde direncin artmasına pek çok mekanizma neden olabilir. Vücut ağırlığı ve yağ dağılımını etkileyen genler, lipoliz, oksidasyon veya iskelet kası glukoz metabolizmasını metabolik sendroma ve T2DM'ye yatkın hale getirebilir.

Farklı populasyonlarda yapılan metaanaliz çalışmalarında (Saxena ve ark 2006, Luo ve ark 2009, Tong ve ark 2009) pankreatik β-hücrelerinde ve perifer hedef hücrelerde tespit edilen aday genlerin ve bu genlerdeki mutasyon ve/veya tek nükleotid değişimlerinin tek tek olmasından ziyade risk allellerinin birarada haplotip olarak taşınmasının hastalığın ortaya çıkmasında daha güçlü etkisinin olduğunu ortaya konmuştur.

Barraso ve ark (2003), diyabet ve ilişkili fenotipleri 71 aday gende 152 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) üzerinde araştırmış ve bu genlerin T2DM oluşumunda farklı mekanizmalar aracılığıyla rol aldıklarını rapor etmişlerdir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Tip 2 Diyabet için aday genlerin bilinen veya muhtemel biyolojik etki mekanizmalarına göre gruplandırılması (Barroso ve ark 2003).

Grup	Altgrup (etki mekanizması)	Gen sembol (Yaygın sembol)
Pankreatik β-hücre fonksiyonu		CDX (CDX3), NEUROD1, PAX4 PAX6, HNF4A TCF1 (HNF1A), TCF2 (HNF1B) **TCF7L2,** ABCC8 (SUR1) ADCYAP1R1 (PACAPR) , CPE GCK, GLP1R, INS KCNJ11 (KİR6.2), SLC2A2 (GLUT2)
İnsülin aktivitesi	İNSR sinyal yolağı aracılığıyla etki	AKT1(PKB), AKT2, CAV3, FOXO3A (FKHRL1), FYN,GRB10, GRB14 GRB2, GRB7, INSR (IR), IRS1 PDE3B, PIK3CA PIK3R1(p85α), RPS6KA2 SLC2A4 (GLUT4) SOS1, SOS2
	İnsülin aktivitesin negatif düzenleyicileri olarak	AHSG, ENPP1(PC-1) GH1, INPPL1(SHIP2)
	Karbohidrat metabolizması aracılığıyla etki	FBP1, GPD1, HK1, HK2, PFKM SLC2A5 (GLUT5), G6PT1 GYS1, GYS2, PPP1CC, PPP1R3A PP2R1A , PCK1(PEPCK)
Diğerleri	Lipid metabolizması	CETP, FABP2, FABP4 (aP2) LIPC (HL) , LIPE (HSL), PLCG1 PPARG
	Beslenme davranışı/enerji homeostazı	GAL (GALN), PPARGC1(PGC1) ADRB3, PYY
	Diğerleri	USF1, KCNJ6 (Kir3.2) STXBP3 (UNC-18c), SGNE1 NCOA1, RXRG, ABCC9 (SUR2) ENPP2 (PDNP2), GC (VDBP) NOS3 (eNOS), PTPN1, PKLR CASQ1, CAPN10, APM1 TCF7L2, PPARγ

1.9. Wnt Sinyal Yolağı

Organizmalardaki çeşitli hücre içi sinyal ileti yolakları, hem embriyonik hem de ergin dönemde hücrenin tüm biyolojik süreçlerinde önemli görevler üstlenirler. Hücre içi ve hücreler arası etkin iletişimin sağlanması, büyüme ve gelişmenin normal olarak gerçekleşmesi ve hücre homeostazisinin sağlanması için bu yolakların işlevselliği gereklidir. Bu sinyal yolaklarında meydana gelebilecek işlevsel

bozukluklar, hücrelerde normal olmayan değişikliklere neden olmaktadır. Evrimsel açıdan hayli korunmuş olan Wnt sinyal yolu bu yolaklardan biridir.

Wnt sinyalizasyon yolağı ilk olarak kolon kanser araştırmalarında ve meyve sineği (Drosophila), kurbağa ve diğer organizmaların embriyonik gelişim çalışmalarında tanımlanmıştır (Moon ve ark 1997, Peifer ve Polakis 2000).

Wnt geni, farenin tümörlü meme dokusundan, int-1 adı ile klonlanmışdır. Sonraki yıllarda, Drosophilanın gelişimi sırasında segment kutuplaşmasından sorumlu bulunan wingless geninin, int-1 geni ile dizi ve işlev benzerliği gösterdiğinin saptanması üzerine, bu iki gen ismi birleştirilmiş ve bu gen "Wnt geni" olarak isimlendirilmiştir. Günümüze kadar, C.elegans'ta 5, Drosophila'da 7, insanda ve farede ise evrimsel açıdan oldukça korunmuş olan 19 adet Wnt geni tanımlanmıştır (Nusse ve Varmus 1992, Nusse 2005). Bu genlerden, insanda bulunan Wnt1 geni tarafından kodlanan proteinin, farelerde kodlanan protein ile %98 oranında aminoasit benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Miller 2002).

Farklı hücre içi sinyal yolaklarını aktive eden bilinen üç çeşit Wnt sinyal yolu bulunmaktadır (Şekil 1.4). Bunlar;

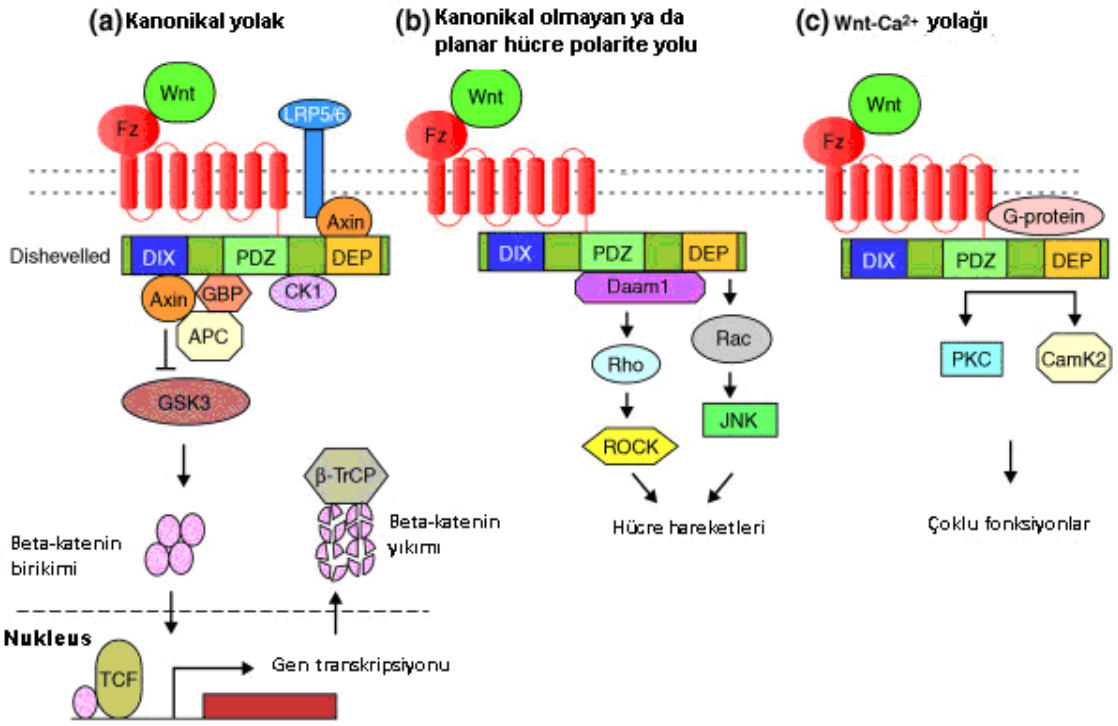
1.Wnt/β-katenin sinyal yolağı (kanonikal sinyal yolu-standart ya da klasik yol),

2.Wnt/polarite yolağı (PCP yolu); embriyonik dönemde hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan yolak,

3.Wnt/kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolağı; kalsiyum metabolizmasında görev alan biyomolekülleri uyararak hücre içindeki Ca^{+2} miktarını artıran yolaktır (Welters ve Kulkarni 2008).

Bazı araştırıcılar PCP yolu ve Wnt/kalsiyum sinyal yolunu birlikte değerlendirerek, "standart olmayan (non-canonical pathway)" ya da" β-katenin bağımsız sinyal yolu" olarak da tanımlamaktadırlar (Kikuchi ve Yamamoto 2008, van Amerongen ve Nusse 2009).

Wnt sinyal yolları, ergin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, çoğalmasının sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol oynamaktadır. Bu sinyal yolunda görev yapan moleküllerde meydana gelebilecek mutasyonlar birçok kanser türünün ortaya çıkmasına da neden olabilmektedir.



Şekil 1.4. Wnt sinyal yolları. Habas ve Dawid (2005)'den alınarak Türkçeleştirilmiştir.

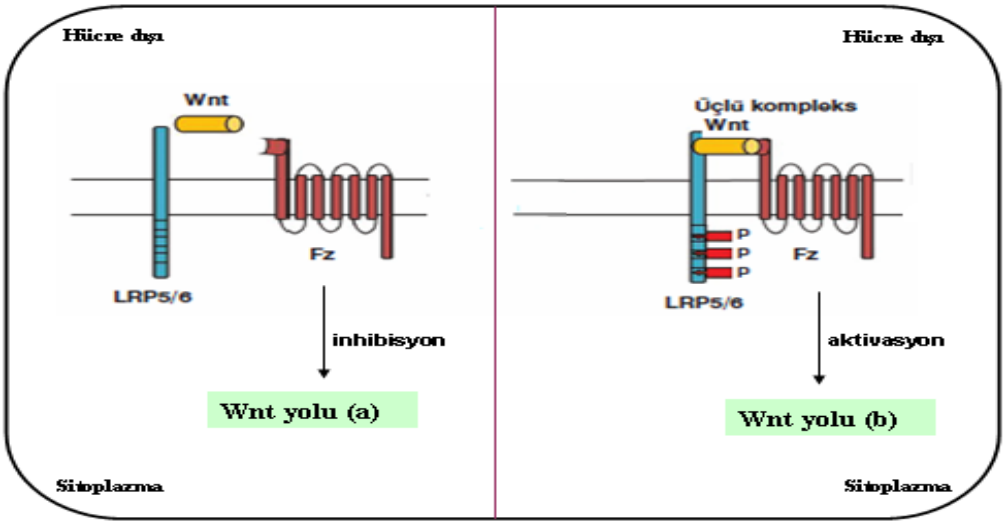
Wnt/β-katenin sinyal yolağı, başta kolorektal (CRC) ve servikal kanserler olmak üzere çeşitli kanser türleri ve birçok ciddi hastalıklar ile olan sıkı ilişkisi nedeniyle en çok çalışılan Wnt sinyal yoludur (Polakis 2000, Moon ve ark 2004, Donma ve Donma 2010).

Wnt genleri tarafından kodlanan Wnt protein ailesi üyelerinden her biri, yaklaşık 350 aminoasitten meydana gelmiştir ve 23-25 adet sistein rezidüsüne sahiptir. Sahip oldukları bu sistein rezidüleri, Wnt proteinin hedef hücre zarı ile etkileşimini sağladığından, sölenterlerden insana kadar evrimsel açıdan oldukça iyi korunmuştur (Mikels ve Nusse 2006, Coudreuse ve Korswagen 2007).

Wnt proteini, ergin dönemde hematopoietik hücreler, epitelyum dokusunun en alt tabakasındaki bazal hücreler, kan damarları, beyin, karaciğer, akciğer, prostat gibi doku ve organlarda bulunan erişkin kök hücreler tarafından sentezlenir (Nusse ve Varmus 1992, Donma ve Donma 2010). Wnt polipeptid zinciri sentezlendikten sonra, N-terminalinde bulunan hidrofobik sinyal dizileri ile endoplazmik retikulum (ER)'a hedeflenir. Wnt, ER'de glikozilasyon ve lipid modifikasyonları işlemlerinden geçerek son halini alır (Coudreuse ve Korswagen 2007) ve bu hücreler tarafından hücre dışı matrikse salınır (Bradley ve Brown 1990). Hücre dışı matrikste difüzyon

ile hedef hücre zarına gelen Wnt proteininin, hedef hücrenin zarında bulunan Frizzled (Fz) ve LRP5/6 isimli reseptörlerine bağlanmasıyla, sinyal yolunun başlaması için gerekli olan Wnt-Fz-LRP5/6 üçlü bileşeni (şekil 1.5) oluşmuş olur (Cadigan ve Liu 2006, Lorenowicz ve Korswagen 2009). Salgılanan Wnt proteinleri, Fz protinleri üzerinden, hücrede parakrin/otokrin sinyal iletisini tetiklerler (Polakis 2000, Logan ve Nusse 2004).

Wnt proteinleri "kanonikal" (Wnt 1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8) ve kanonikal olmayan yolak (Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 4, Wnt 11) etkinleştiricileri olarak gruplandırılırlar. Bu proteinler arasında örtüşmeler olabilmekte ve bazı wnt proteinleri hem kanonikal hem de kanonikal olmayan yolağı etkinleştirebilmektedir (Polakis 2000, Logan ve Nusse 2004).



Şekil 1.5. Wnt-Fz-LRP5/6 üçlü kompleksi. Wnt proteinlerinin hedef hücre zarındaki reseptörlerine bağlanmadığı (a) ve bağlandığı (b) durumda Wnt/β-katenin sinyal yolu (Tanır ve ark (2012)'den değiştirilerek alınmıştır).

APC[3]/β-katenin/TCF yolağı olarak da bilinen Wnt/β-katenin sinyal yolağı; hücrede gelişimsel ve büyüme düzenleyici olan anahtar mekanizmalardan biridir. TCF-4, TCF7L2/LEF ailesinin kolonik epiteliumda en yüksek ifade edilen üyesidir. Hedef genlerin transkripsiyonunun modüle edilmesinde; TCF/LEF proteinleri çoklu protein güçlendirici (multiprotein enhancer) komplekslerinin bir araya gelmesini kolaylaştıran faktörler olarak düşünülmektedirler (Duval ve ark 2000).

Wnt sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu, motilite ve normal embriyogenez (hücre farklılaşması) için kritiktir. Miyogenez ve adipogenezisi regüle ettiği (Ross ve ark 2000, Etheridge 2004) ve embriyonik gelişim sürecinde pankreas ve adacıkların

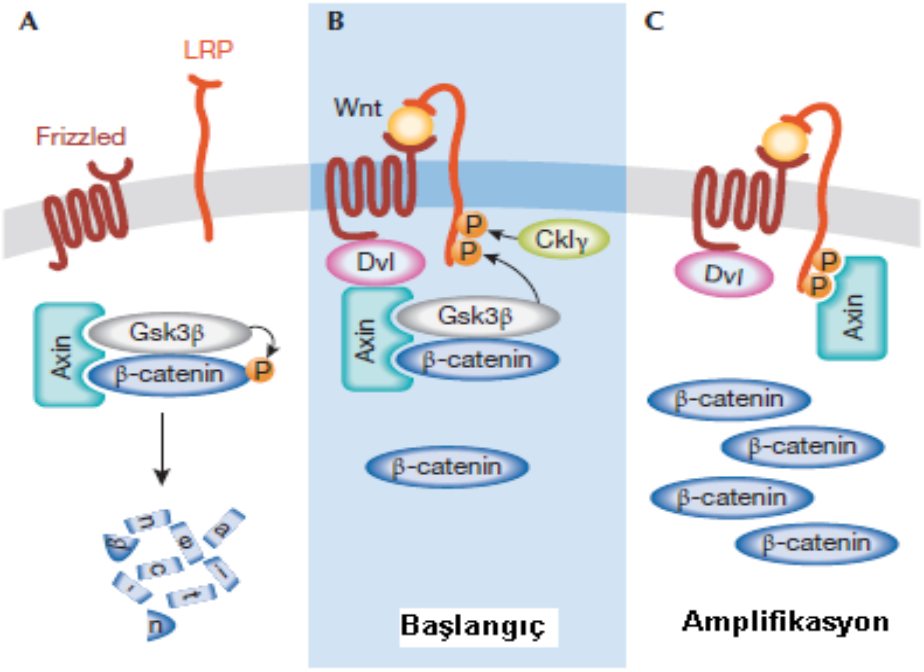
gelişimi için de kritik öneminin olduğu gösterilmiştir (Papadopoulou ve Edlund 2005, Weedon 2007). Wnt sinyal yolunun kronik aktivasyonu; kolorektal karsinomalar, hepatosellüler karsinomalar, melanomalar ile uterus ve ovaryum karsinomaları gibi birçok farklı insan malignansilerinin gelişiminde de tespit edilmiştir (Lyssenko 2008).

1.9.1. Wnt/β-katenin Sinyal Mekanizması

Wnt sentezlenip ekzositozla hücre dışı matrikse verildikten sonra, hedef hücre zarına ulaşır. Wnt, hedef hücre zarında bulunan, Frizzled (Fz) (kıvrımlanmış) ve LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) reseptörlerine bağlanır. Fz reseptörleri, G protein ailesinin üyesidirler ve sisteince zengin rezidünün (cystein-rich domain (CRD)) bulunduğu uzun amino terminal uca, yedi membran geçici α helikse, üç sitoplazmik hücre içi ilmiğe ve bir protein fosforilasyon bölgesi içeren C-terminal kuyruğa sahip bir membran geçici (transmembran) proteinidir (Nusse 2005). Bu proteinin rezidü içeren kısmı hücre dışında bulunur. Wnt proteini sistein rezidülerinin bulunduğu uç kısmı ile Fz proteininin CRD bölgesine yüksek afinite ile bağlanırken, diğer ucu ile de, LRP5/6 proteinine bağlanır. LRP5/6 düşük yoğunluklu lipoprotein ailesinin üyesi olan bir transmembran proteinidir ve Fz'nin ko-reseptörü olarak iş görmektedir.

Wnt proteinlerinin varlığında, Wnt'nin hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine (Fz ve LRP5/6) bağlanmasıyla Wnt sinyal iletimi tetiklenir ve sinyal hücre içine aktarılır. Sinyal iletimi hücredeki iki önemli fosforillenme reaksiyonunun uyarılması ile gerçekleşir. İlk olarak LRP5/6'nın sitozol içinde kalan kısmı glikojen sentaz kinaz (GSK3β) ve kazein kinaz Iα (CKIα) enzimleri tarafından fosforillenir. Bu kısmın fosforillenmesiyle, sitozol icerisinde bulunan ve normalde β-katenin'i yıkım için hedefleyen ve aksin, GSK3β ve APC (adenomatoz poliposis koli)'den meydana gelen yıkıcı kompleks baskılanır. Fosforillenmenin etkisiyle bu kompleksi bir arada tutan Aksin ile ona bağlı bulunan GSK3β bu kompleksten ayrılır ve LRP5/6'nın sitozol içindeki fosforillenmiş kısmına bağlanır (Chen ve ark 2008, Zeng ve ark 2008). İkinci fosforilleme işlevi ise, sitozolde bulunan ve bu süreçte anahtar role sahip Dishevelled (Dsh/Dvl) proteininin CK1α tarafından fosforillenmesidir. Aktive olan Dvl, bir ucu ile zarda bulunan Fz'nin hücre içi kısmına bağlanırken, diğer ucu ile fosforillenmiş LRP5/6'ya bağlı halde bulunan Aksin'e bağlanır. Bu

bağlanma ile Aksin proteininde konformasyonel bir değişim olur. Bu değişim, GSK3β'nın Aksin'den ayrılmasını sağlar. Aksin'den ayrılan GSK3β hücredeki bir inhibitor protein tarafından inhibe edilir ve bu sayede GSK3β'nın β-katenini fosforilleme etkisi ortadan kaldırılmış olur (Peifer ve Polakis 2000, Chen ve ark 2008). β-katenin, bu sinyal yolunda anahtar rol oynayan sitozolik bir proteindir (Willert ve Nusse 1998). Fosforillenmeyen β-katenin, proteozomlar tarafından tanınıp parçalanamaz ve sitoplazmada birikir (Şekil 1.6B,C). Biriken β-kateninin bir kısmı, çekirdek zarından çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini (TCF/LEF-1) aktive eder ve Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır (Şekil1.7b).

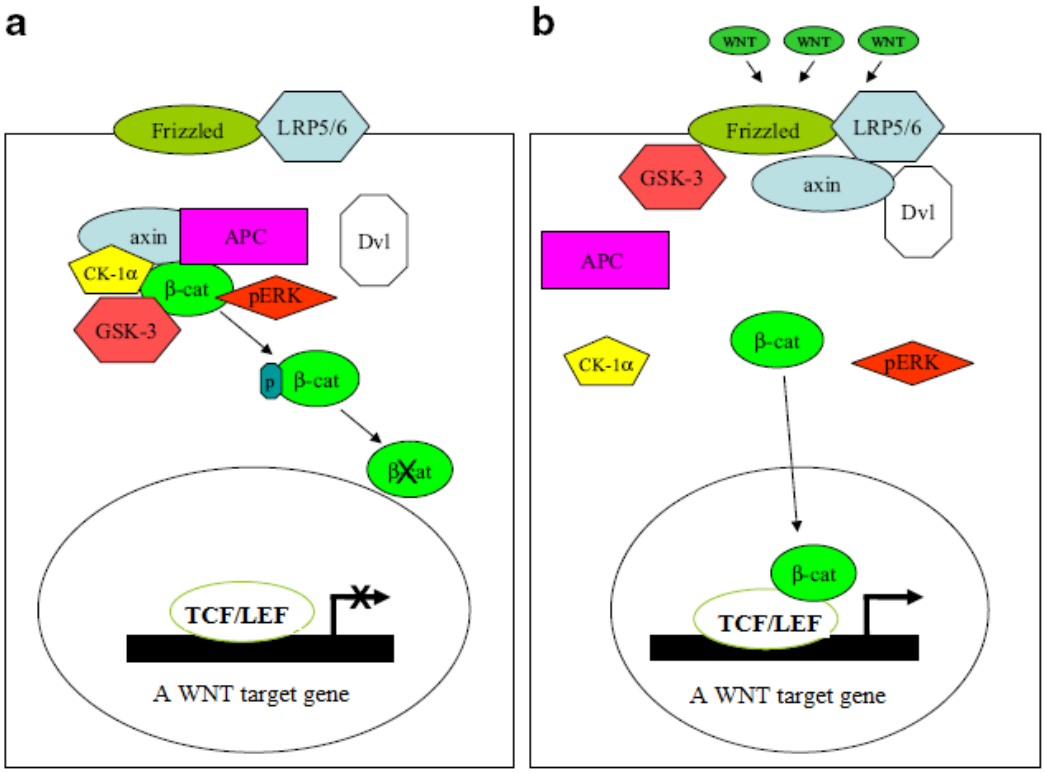


Şekil 1.6. Wnt/β-katenin yolağının aktivasyon modeli. A. Wnt sinyali yokluğunda β-katenin fosforillenir ve proteozom aracılı yıkım için yıkım kompleksi tarafından hedeflenir. B.Wnt proteinlerinin reseptörlerine bağlanması ile Dvl, Fz ye bağlanır ve aksin ile etkileşime girerek yıkım kompleksini dağıtır. Ardından Gsk3β, LRP üzerindeki kritik bölgeleri fosforilleyerek aksin için tutunma bölgeleri oluşturur. C.Aksinin LRP'ye bağlanması yıkım kompleksinin inhibisyonuna ve β-kateninin sitoplazmada birikimine neden olur (Fuerer ve ark 2008'den alınmıştır).

Bu aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir, hem de proliferasyonda, hücre döngüsünde, farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur (Willert ve Nusse 1998, Miller 2002, Mikels ve Nusse 2006).

Sitozolde biriken β-kateninin diğer bir kısmı ise hücreler arası bağlantıda önemli rol oynayan E-kadherinin sitozol içindeki kısmına bağlanır (Sönmez ve Ergür 2002).

Wnt sinyal yolağı inaktif iken ise, Wnt hücre zarındaki Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanamaz. Dolayısıyla, sinyal mekanizmasının aktivasyonunda önemli rol oynayan LRP5/6 ve Dvl proteinlerinin fosforillenme işlemi gercekleşemez. Fosforillenme reaksiyonları gercekleşmediği için Dvl inaktif, yıkıcı kompleks ise aktif durumdadır. Bu yıkıcı komplekse, sitozolde bulunan β-katenin bağlanır ve aktif halde bulunan GSK3β tarafından fosforillenir. Fosforilize β-katenin, β-TrCP tarafından bağlanır. β-TrCP fosforillenmiş β-katenini yıkıcı kompleksten ayırarak proteazomlar tarafından tanınmasını sağlar ve β-katenin proteazomlarda parçalanır (Şekil1.6A). Çekirdeğe girecek β-katenin ortamda bulunmadığından Wnt sinyal yolu inaktif hale gelmiş ve sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonu baskılanmış olur. (Şekil 1.7a) (Miller 2002, Sönmez ve Ergür 2002).



Şekil 1.7. Kanonikal Wnt yolağının özeti. **a.**Wnt uyarımının yokluğunda, β-katenin "yıkıcı kompleks" içinde yeralır. GSK-3β, CK-1α ve pERK tarafından fosforillenir, ve hemen ardından proteozom aracılığıyla yıkılır. **b**.Wnt uyarımını takiben, yıkıcı kompleks ayrılır. Bu durum, çekirdeğe girerek iki parçalı transkripsiyon faktörü β-kat/TCF'yi oluşturan serbest β-katenin birikimi ile sonuçlanır ve Wnt hedef genlerininin transkripsiyonu gerçekleşir (Jin 2008).

Dickkopf (Dkk) proteinleri LRP ko-reseptörleine bağlanıp, Wnt proteinlerinin LRP'lerle etkileşimini engeleyerek potansiyel olarak Wnt sinyalini inhibe eder ve başlamadan bu yola engel olabilirler (He ve ark 2004).

Wnt sinyal yolu, her dokuda farklı bir mekanizma bozukluğu ile başta kolorektal kanser (CRC) olmak üzere, şizofreni, retinal anjiyogenezis defekti, Alzheimer, tetra-amelia, polikistik böbrek hastalıkları, lösemi, akciğer kanseri, osteoporozis ve son yıllarda diyabet gibi birçok hastalığın meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır (Nusse ve Varmus 1992, Polakis 2000, Moon ve ark 2004, Chong ve ark 2005, Aguilera ve Munoz 2007). Moleküler çalışmalarla, CRC olgularının yaklaşık %90'nında Wnt sinyal yolu ile ilgili genlerde mutasyonlar tespit edilmiştir (Giles ve ark 2003).

Sitozol içindeki yıkıcı komplekste veya β-kateninin N-terminalinde meydana gelen mutasyonlar, Wnt sinyal yolundan bağımsız olarak (inaktif durumdayken) β-kateninin sitozolik miktarında artışa neden olmaktadır. β-kateninin birikimi, hedef genlerin kontrolsuz ifade edilmesine yol açar. Bu anormal ifade ile ceşitli hastalıklara ve kansere neden olan genlerin transkripsiyonu sağlanmış olur (Polakis 2000, Moon ve ark 2004, Nusse 2005). İnsan kanserlerinin birçoğu, APC ve Aksin proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle Wnt sinyal yolağının kontrolünün kaybı ile ilişkilendirilmektedir (Schlange ve ark 2007).

Birçok hastalığın, sadece sinyal yolunun inaktif olduğu durumlarda meydana gelen mutasyonlarla değil, sinyal yolunun aktif olduğu durumda görev alan ve bu mekanizmayı kontrol eden biyomoleküllerde meydana gelen bozulmalarla oluştuğu da bilinmektedir (Nusse 2005). Yapılan bir çalışmada, araştırıcılar hücre zarında bulunan ve sinyal yolunun aktivasyonunda önemli bir role sahip olan LRP5/6 reseptöründe meydana gelen bir mutasyon sonucu kemik dansitesinde azalma olduğunu göstererek, Wnt sinyal yolunun kemik yoğunluğu üzerindeki önemli etkisini ortaya koymuşlardır (Moon ve ark 2004, Nusse 2005). Bir başka çalışmada ise, plazma hücrelerinde Wnt sinyal yolunun inhibisyonunda rol oynayan Dickopff (Dkk) glikoproteinin aşırı ifade edilmesine neden olan bir mutasyon sonucu multipl myelomanın oluşabileceği düşüncesi bildirilmiştir (Aguilera ve Munoz 2007).

1.9.2. Wnt Sinyal Yolu ve Diabetes Mellitus

Birçok in vitro ve in vivo çalışmalarla Wnt yolağının birçok bileşenlerinin pankreatik β-hücre çoğalmasında (Rulifson ve ark 2007, Liu ve Habener 2008, Shu ve ark 2008) normal kolesterol metabolizması ve glukozla indüklenmiş insülin salgılanmasında (Fujino ve ark 2003) ve inkretin hormon glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1)'in üretiminde (Yi ve ark 2005) yer aldığı gösterilmiştir.

Wnt/β-katenin (kanonikal) yolağının temel efektörü, iki parçalı transkripsiyon faktörü β-katenin/T hücre faktör (β-cat/TCF)'üdür. Bu bileşik serbest β-katenin ve TCF ailesi üyelerinden birinin heterodimerizasyonu ile oluşur (Şekil 1.8).

Bugüne kadar çalışılmış polimorfizmler içerisinde Wnt sinyal yolağının temel efektörlerinden olan TCF7L2 polimorfizmlerinin, T2DM gelişimi riski açısından açık farkla en büyük etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Grant ve ark 2006, Elbein 2007, Grarup ve Andersen 2007, Owen ve McCarthy 2007, Weedon 2007). Ek olarak, insan LRP5 geni kromozom 11q13'te yeralan ve Tip 1 diyabetle ilişkili olan IDDM4 bölgesinde haritalanmıştır (Twells ve ark 2003). LRP5 genindeki polimorfizmlerin obezite fenotipleriyle ve LRP6'daki yanlış anlamlı mutasyonların ise kemik kaybı, erken koroner hastalık ve metabolik sendrom ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jin 2008). Bundan başka, Wnt5B'deki polimorfizmler de T2DM riski ile ilişkilendirilmiştir (Kanazawa ve ark 2004).

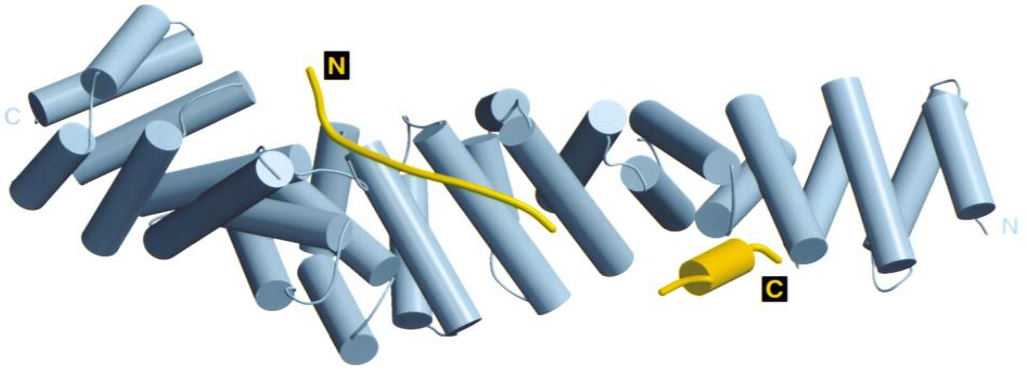
Wnt yolağının ko-reseptörleri (LRP5/6), bir Wnt ligandı (WNT5B) ve Wnt sinyal yolağı efektörünün temel bileşeni TCF7L2 diğer metabolik hastalıklarda olduğu gibi tip 2 diyabet hastalığının gelişiminin önlenmesinde de açık bir şekilde yer alır (Jin 2008).

1.10. TCF7L2 (TCF4) proteini

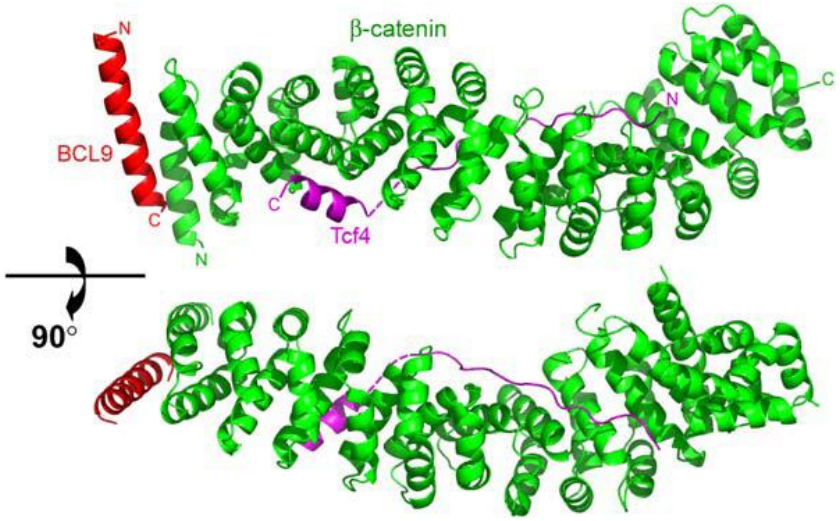
TCF7L2 (TCF4, İnsan T-hücre transkripsiyon faktörü-4) geni, bir transkripsiyon faktörü olan TCF-4'ü kodlar. TCF proteinleri, bir DNA-bağlanma bölgesi olan yüksek mobiliteli grup (high mobility group-box- HMG-box) içeren bir transkripsiyon faktörleri ailesinin üyesidirler (Florez 2007, Tong ve ark 2009, Weedon 2007) ve beta-kateninin Arm tekrarlarına bağlanırlar (Şekil1.8) (Willert ve Jones 2006). TCF ve LEF-1 ilk olarak T-hücre genlerini aktive eden transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmışlardır (Behrens ve ark 1996), Memelilerde 4 tane T hücre transkripsiyon faktörü bulunmaktadır (Jin 2008).

1. TCF7 [TCF-1],
2. Lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü [LEF-1],
3. TCF7L1 [TCF-3] ve
4. TCF7L2 [TCF-4]

Bu proteinler HMG bölgeleri ile doğrudan DNA'ya bağlanırlar ancak gen ifadesini aktive edemezler, DNA sarmalını bükülmeye yönlendiren yapısal transkripsiyon faktörleri olarak iş görürler (Kikuchi ve ark 2006) (Şekil 1.9).



Şekil 1.8. β-catenin/Tcf4 kompleksinin yapısı. Tcf4 peptidi (sarı), β-cateninin armadillo tekrar bölgesi (mavi) ile etkileşimde olan 2 alana sahiptir (Poy ve ark 2001).



Şekil 1.9. β-Catenin/Tcf-4/BCL9 kompleksinin yapısı. B-katenin (yeşil); Tcf-4(mor) ve BCL9 (kırmızı) (Sampietro J ve ark 2006).

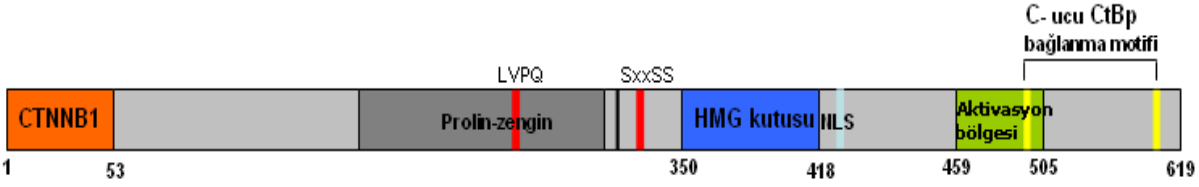
Şekil 1.10'da TCF4 proteininin en yaygın izoformunun aminoasit (aa) dizisi görülmektedir. TCF7L2 mRNA'sı, proteinin farklı sayıdaki izoformlarını oluşturan ve alternatif kesim sonucu ekspresyon durumuna göre protein aktivitesini değiştiren farklı effektörlerin bağlanabildiği bölgeler içerir (Şekil 1.11) (Gostner ve ark 2011).

TCF4 proteini, β-katenin bağlama bölgesi (CTNNB1), DNA-bağlanma bölgesi (HMG kutusu) ve birçok izoformda değişken olan bir C-terminal bölgesi olmak üzere 3 temel bölgeye bölünebilir. Sadece uzun uzun okuma çerçeveli form COOH-terminal bağlanma proteini (CtPB)'ne bağlanabilir, bu bakımdan C-terminal önemli bir düzenleyici fonksiyona sahiptir. CtBP motifinin varlığı TCF7L2'nin olası repressor fonksiyonu için gereklidir (Shiina ve ark 2003, Shulewitz ve ark 2006).

MPQLNGGGGDDLGANDELISFKDEGEQEEKSSENSSAERDLADVKSSLVNESETNQN
SSSDSEAERRPPPRSESFRDKSRESLEEAAKRQDGGLFKGPPYPGYPFIMIPDLTSP
YLPNGSLSPTARTYLQMKWPLLDVQAGSLQSRQALKDARSPSPAHIVSNKVPVVQHP
HHVHPLTPLITYSNEHFTPGNPPPHLPADVDPKTGIPRPPHPPDISPYYPLSPGTVG
QIPHPLGWLVPQQGQPVYPITTGGFRHPYPTALTVNASMSRFPPHMVPPHHTLHTTG
IPHPAIVTPTVKQESSQSDVGSLHSSKHQDSKKEEEKKKPHIKKPLNAFMLYMKEMR
AKVVAECTLKESAAINQILGRRWHALSREEQAKYYELARKERQLHMQLYPGWSARDN
YGKKKKRKRDKQPGETNEHSECFLNPCLSLPPITDLSAPKKCRARFGLDQQNNWCGP
CRRKKKCVRYIQGEGSCLSPPSSDGSLLDSPPPSPNLLGSPPRDAKSQTEQTQPLSL
SLKPDPLAHLSMMPPPPALLLAEATHKASALCPNGALDLPPAALQPAAPSSSIAQPS
TSSLHSHSSLAGTQPQPLSLVTKSLE

Şekil 1.10. TCF4 proteininin aminoasit dizisi (NCBI Ref. dizi: NP_110383.2)

Wnt ligandlarının yokluğunda TCF4, Groucho/TLE, karboksi uca bağlanan protein (CtBP) ve HMG-kutusu transkripsiyon faktörü-1 (HBP1) gibi korepresörler ile direkt ilişkiye girerek hedef genlerin transkripsiyonunu baskılayan bir represör gibi iş görür. Wnt sinyalizasyonu aktive olduğunda ise β-katenin TCF/LEF'e N-terminal ucundan bağlanarak baskılayıcıların yerine geçer ve TCF7L2'yi bir transkripsiyonel aktivatöre dönüştürür (Widelitz 2005, Kikuchi ve ark 2006).

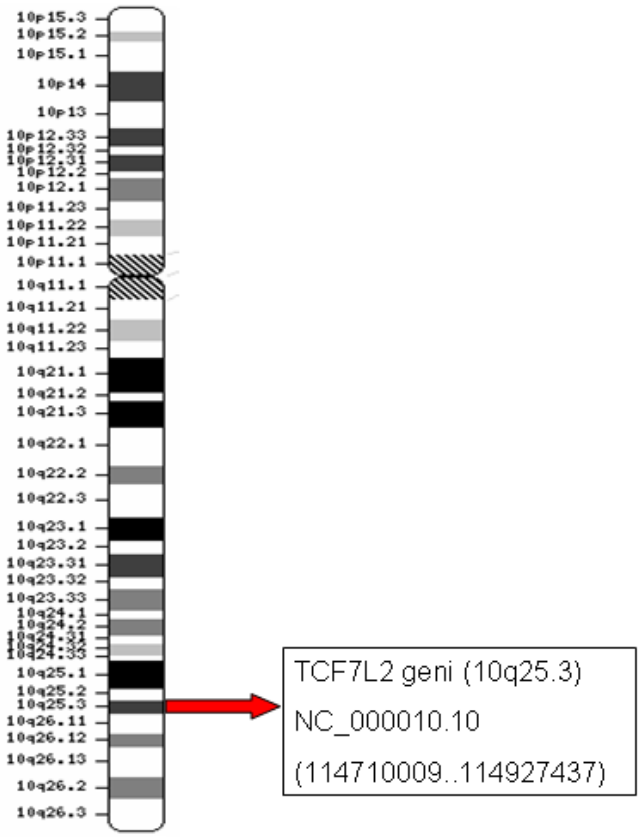


Şekil 1.11. TCF7L2 protein yapısının şematik gösterimi (Gostner ve ark 2011'den alınarak Türkçeleştirilmiştir.).

Promotorlarında TCF/LEF bağlanma bölgeleri bulunan ve transkripsiyonu β-katenin-TCF/LEF tarafından aktive edilen 75 farklı gen bulunmaktadır. Bu genler arasında c-myc, Siklin D1, siamois, twin, MMP7, gastrin, fra1, c-jun, PPARγ, matrilysin, CD44 ve ürokinaz-tip plasminojen aktivator reseptör gibi genler bulunmaktadır (Polakis 2000, Kolligs ve ark 2002, Widelitz 2005).

1.11. TCF7L2 geni

TCF7L2 geni 10. kromozomun q25.3 bölgesinde yerleşiktir ve 215.9 kb (Damcott ve ark 2006) büyüklüğünde geniş bir alanı kaplar (114700201–114916063, NCBI build 36.2) (Şekil.1.12). İnsan TCF7L2 geni 14 ekzon ve 13 intron bölgesi içermektedir (NCBI build 36.2). Bununla birlikte, Duval ve ark (2000) insan T hücre transkripsiyon faktörü 4 (hTCF4-human TCF4) geninin genomik yapısını ortaya koymak için kolorektal kanser hücre hattında yaptıkları çalışmada TCF7L2 geninin 5'i alternatif olmak üzere toplam 17 ekzonun bulunduğunu belirlediler (Şekil 1.13).



Şekil 1.12. TCF7L2 geninin 10 nolu kromozom üzerindeki yerleşimi (NCBI Map viewer build 37.3).

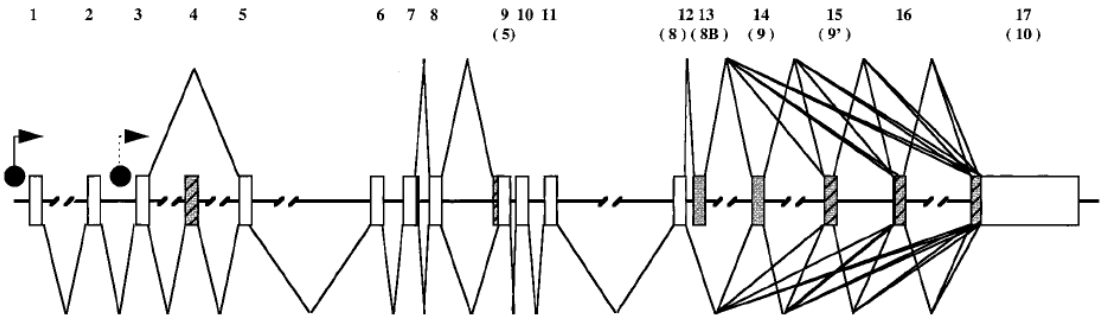
Bu çalışmalarında, genin 3' ucundaki COOH- terminal uçlarında farklılaşan birçok hTCF4 protein izoformu yaratan çok fazla sayıda alternatif kesip-eklemeler

olduğunu ve her bir hücrenin birden fazla alternatif varyantları ifade ettiğini tespit ettiler. Bu mekanizma proteinin fonksiyonel öneminden dolayı beklenen bir sonuçtur çünkü TCF faktörleri, TCF ailesi üyelerinin aktivitesinin transkripsiyonel baskılanmasına aracılık eden gerekli bir korepreresör protein olan CtBP ile fonksiyonel olarak COOH- terminal bağlanma bölgeleri yoluyla etkileşirler (Duval ve ark 2000).



Şekil 1.13. TCF7L2 geninin yapısı ve alternatif olanlar dahil tüm ekzonlarının şematik gösterimi (Osmark ve ark 2009).

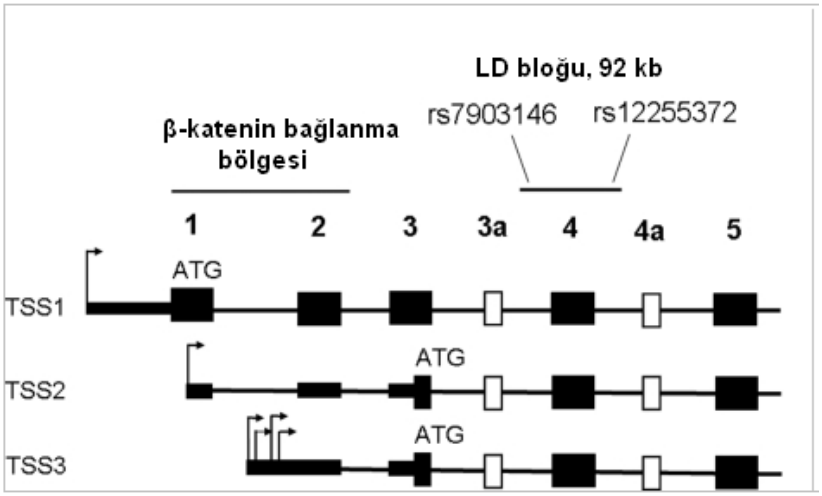
Duval ve ark (2000), çalışma sonuçlarına göre TCF7L2 geninin belirlenen 17 ekzonundan 5'i olan ekzon 4, 13, 14, 15 ve 16'nın alternatif ekzonlar olduğunu ve ekzon 9, 16 ve 17'de kullanılan 3 alternatif kesim alıcı bölgesinin TCF4 mRNA transkriptlerini oldukça karmaşık bir hale getiren teorik olarak 256 farklı kesim ürününün oluşmasına neden olduğunu rapor ettiler (Şekil 1.14). Osmark ve ark (2009)'da insan pankreatik adacıklarında yaptıkları çalışmalarıyla gen yapısına ilişkin bu bilgileri destekleyen sonuçlar elde etmişlerdir.



Şekil 1.14. *hTCF-4'ün* genomik organizasyonu ve alternatif kesimleri. Çift yönlü oklar primer walking ile dizilenen ekzon/intron bağlantılarını, gri renkli çubuklar alternatif ekzonları, çizgili çubuklar bilinmeyen *hTCF-4* dizileriyle ilişkili ekzonları göstermektedir. *hTCF-4'*ün bilinen promotoru ve varsayılan diğer ikincisi (noktalı-çizgiyle gösterilen) ok ve siyah nokta ile gösterilmiştir (Duval ve ark 2000).

Diyabetik olmayan bireylerden elde edilen oldukça geniş farklı doku örneklerinde yapılan bir başka ifade çalışmasında, TCF7L2'nin 5′ucunda ekzon 4′ün varlığı ya da yokluğu durumuna göre dokuya bağımlı bir değişiklik olduğu, alternatif kesiminde dokuya özgü farklılıklar gösterdiği, çalışmada belirlenen spesifik bir kesim formunun sadece pankreatik adacıklar, pankreas ve bağırsakta ifade edildiği ve diğer dokularda bulunmadığı tespit edilmiştir (Prokunina-Olsson ve ark 2009). Osmark ve ark (2009), çalışmalarında alternatif ekzonlar, ekzon 15'in kan dokuya, ekzon 13 ve 14'ün yağ ve kas dokuya özgün eklendiğini, ekzon 15 ve özellikle ekzon 4'ün yüksek katılımının ise diğer dokularla kıyaslandığında adacıklarda oldukça karakteristik olduğunu göstermişlerdir.

TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ailesi fonksiyonel olarak farklı proteinler üretebilmek için alternatif transkripsiyon başlama bölgeleri (TSSs-Transcription start sites) kullanırlar (van de Wetering ve ark1996, Hovanes ve ark 2000). Prokunina-Olsson ve ark (2009)' da çalışmalarında TCF7L2 geninde birçok TSS olduğunu göstermişlerdir (Şeki l.15).

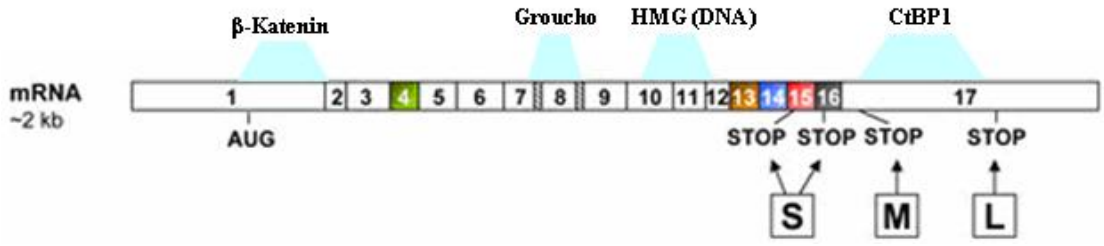


Şekil 1.15. TCF7L2 geni N-terminal kısmının yapısı: ekzon 1 ve 2 tarafından kodlanan β-katenin bağlanma bölgesinin yerleşimi ve rs7903146 ve rs12255372 SNP'lerinin bulunduğu T2DM ilişkili LD bloğu. Esas ekzonlar- siyah dikdötgenler ile, alternatif ekzonlar beyaz dikdörtgenler ile; alternatif transkripsiyon başlama bölgeleri TSS1, TSS2, TSS3-oklar ile ve potansiyel translasyon başlangıçları– "ATG" ile gösterilmiştir (Prokunina-Olsson ve ark 2009'dan alınmıştır).

TSS1, ilk translasyon başlama bölgesinden -536bp yukarıda yerleşik, TSS2, exon 1'de +83 bp de yerleşik ve toplu halde TSS3 olarak ifade edilen bir dizi, genin ilk intronunda (+200, +239, +302, +338bp) yerleşiktir (şekil 1.15). Sadece esas başlama bölgesinden (ekzon1) TSS1 den başlayan transkriptler, ekzon 1 deki

başlama kodonuna transle edilir ve ekzon 1 ve ekzon 2 tarafından kodlanan β-katenin bağlanma bölgesini içerirler.

Alternatif başlama bölgeleri TSS2 ve TSS3'den başlayan transkriptlerde ise β-katenin bağlanma bölgesi bulunmaz. TCF7L2'nin alternatif promotorları ekzon 1 ve ekzon 2 tarafından kodlanan β-katenin bağlanma bölgesinin varlığına bağlı olarak Wnt yolunu aktive eden ya da baskılayan protein izoformları oluştururlar (Korinek ve ark 1997). Alternatif ekzonlar 3a ve 4a, Groucho represör proteini ile etkileşimden sorumlu bir protein bölgesinde yerleşiktir (Brantjes ve ark 2001)). Alternatif C-terminal ekzonlar 12,13,13a ve 13b'nin mRNA'da kombinasyonel doku-özgü bir araya gelişleri, 3′uçtaki ardışık ekzonlar; ekzon 13a, 13b ya da 14 deki alternatif stop kodonları aktive edebilir ve kısa, orta ve uzun okuma çerçeveli protein izoformları yaratabilir (Şekil 1.16) (Duval ve ark 2000, Shiina ve ark 2003). Bu protein izoformlarının işlevleri net değildir, bununla birlikte, sadece uzun izoformlarda, WNT yolunun negatif düzenleyicisi olan ekzon 17 tarafından kodlanan C-terminal bağlanma proteini (CtBp) için bağlanma bölgesi bulunur (Fang ve ark 2006, Tang ve ark 2008). CtBp bir korepressör olduğu için, bağlanma bölgesi içermeyen daha kısa formların azalmış represör aktivitesi göstermesi beklenebilir (Osmark 2009). Bu nedenle TCF7L2 nin tüm alternatif formları fonksiyonel olarak önemlidir (Fang ve ark 2006, Tang ve ark 2008).



Şekil 1.16. TCF7L2 gen yapısının şematik gösterimi (Osmark ve ark 2009'dan uyarlanmıştır). Alternatif ekzonlar farklı renklerde gösterilmiştir. Önemli bağlanma bölgelerini kodlayan alanlar mavi ile renklendirilmiştir. TCF7L2 proteininin kısa orta ve uzun izoformları da kutucuk içinde sırasıyla S, M ve L harfleri ile gösterilmiştir.

TCF4 ve diğer TCF/LEF ailesi üyeleri işlevsel bölgeler ile ilişkili korunmuş sekanslara sahiptirler. İnsan TCF4 geninin β-katenin bağlanma bölgesi (ekzon 1'de) ve DNA-bağlanma HMG kutusu (ekzon 10 ve 11); diğer TCF/LEF üyeleriyle birlikte

insanlarda ve Drosophila (Pangolin), Xenopus (XTcf-3), tavuk (chTCF) ve fare (mTCFs) yi de içeren diğer türlerde de oldukça korunmuştur (Duval ve ark 2000).

Bu transkripsiyon faktörlerinin HMG kutusu A/T A/T CAAAG konsensusuna bağlanan DNA bağlanma bölgesidir. β-katenin bağlanma bölgesi genin yukarı (upstream) tarafında kodlayan bölgenin başlangıcında yerleşiktir (van de Wetering ve ark 1996). Bu bölgeler dışında, sondaki ekzon 17'de de yüksek bir korunum gözlemlenmiştir (Duval ve ark 2000).

TCF/LEF mRNA'ları 3′ uçlarından alernatif kesip-ekleme için hedeftirler ki bunun mütekabil protein izoformlarının transaktivasyonel özelliklerinin düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (Mayer ve ark 1995). Duval ve ark (2000), hTCF-4 geninin 3′ucundaki farklı okuma çerçevelerinin alternatif kullanımının zıt ve benzer transaktivasyon etkinlikleri olan farklı protein izoformlarının oluşmasına yol açtığını ortaya koymuşlardır.

TCF7L2 tarafından kodlanan TCF4 proteini, CTNNB1 (β-katenin) için bir nükleer reseptör gibi davranarak, Wnt sinyal yolağında anahtar bir rol oynar (Florez 2007, Weedon 2007). Kolorektal epitelyum hücreler daha baskın olarak TCF4 ifade ederler. TCF4; kript kök hücre çoğalması ve farklılaşmasında temel bir düzenleyici olarak iş görür (Poy 2001).

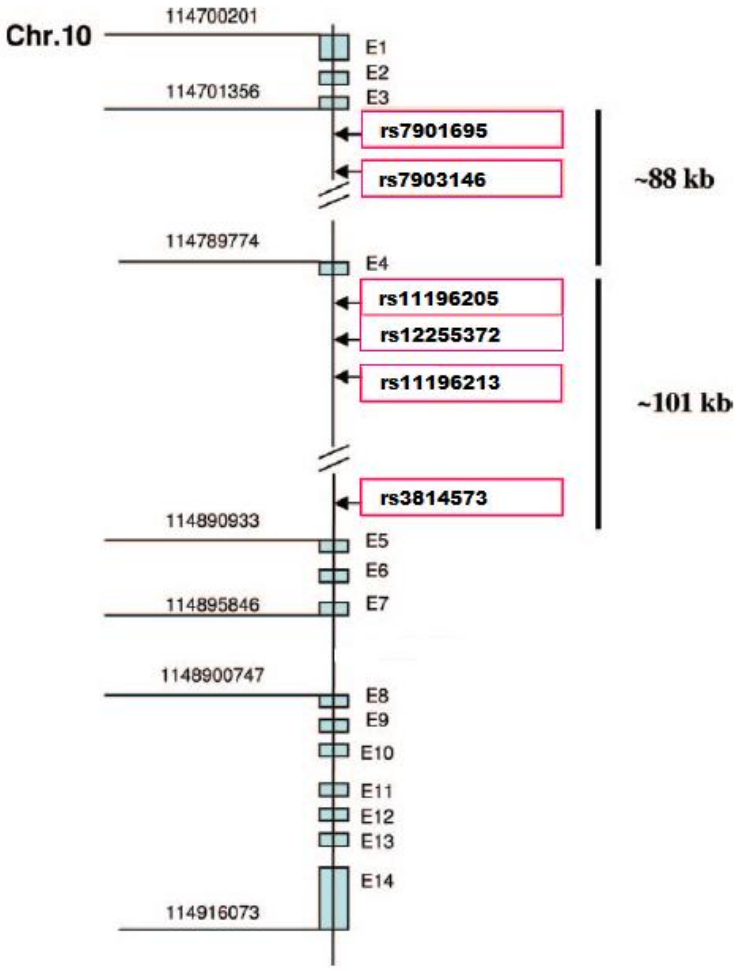
Wnt sinyalizasyonu, hücre çoğalması, motilite ve normal embriyogenez (hücre farklılaşması) için kritiktir. Miyogenez ve adipogenezisi düzenlediği (Ross ve ark 2000, Etheridge ve ark 2004) ve embriyonik gelişim sürecinde pankreas ve adacıkların gelişimi için de kritik öneminin olduğu gösterilmiştir (Papadopoulou ve Edlund 2005, Weedon 2007). Nukleusta TCF7L2'nin β-katenine bağlanması, siklin D1 gibi β-hücre çoğalmasında iş gören bazı hedef genlerin transkripsiyonunu indükler. Siklin D1, β-hücre proliferasyonunun anahtar belirleyicilerindendir (Lyssenko 2008). TCF7L2 geni, insan pankreatik adacıklarında, β-hücre nukleusunda ifade edilir. Lyssenko ve ark (2008) çalışmalarında, T2DM'li hastaların adacık hücrelerinde TCF7L2 gen ifadesinin diyabetik olmayanların adacık hücrelerindekine kıyasla 5 kat daha yüksek olduğunu göstermişledir. Diyabetik olmayan ancak rs7903146 polimorfizmini TT genotipinde taşıyanların adacıklarında ise TCF7L2 geninin en yüksek miktarda ifade edildiğini gösremişlerdir.

T2DM ile ilişkili risk allellerini taşıyanlar; β-hücrelerinde glukoz uyarımına cevapta kan dolaşımına insülin salınımında azalma ile sonuçlanan insülin salgı

siteminde kusurlar (Schäfer ve ark 2007), proinsülinden insüline dönüşüm oranında azalma (Kirchhoff ve ark 2008) ve periferal dokuların insüline cevabında azalma ile ilişkili inaktif prohormon (proinsülin) birikimi gibi bozukluklar (Potapov ve ark 2010) ile de yüz yüzedirler.

İnsan adacık hücre kültürlerinde, küçük inerferans RNA (siRNAs)'lar kullanılarak yapılan TCF7L2 gen ifadesini baskılama çalışmaları (Shu ve ark 2008), bu transkripsiyonel düzenleyicinin β-hücre fonksiyonu için anahtar bir rol oynadığını açıkça göstermiştir. siRNA ile TCF7L2 geninin baskılanması β-hücre apoptozisinde dramatik bir artış, proliferasyonunda azalma ve glukoz-bağımlı insülin salgılanmasında keskin bir azalma ile sonuçlanmıştır (Shu ve ark 2008). Ek olarak, sessiz TCF7L2 geni taşıyan adacık hücreleri, insülin salgısının boşalması sırasında, salgılanmış granüllerin dış hücre membranı ile birleşmesinde bozukluklar göstermiştir. Ürünleri bu işlemin düzenlenmesinde yeralan genlerin ifadesinde de değişiklikler ortaya çıkmıştır (da Silva Xavier ve ark 2009). Bu sonuçlar göstermektedir ki; TCF7L2 geninin risk alleli taşıyıcılarında bu transkripsiyon faktörünün (TCF4) ifadesindeki bozukluklar; β-hücrelerinin gelişiminde, yaşamının devamında ve insülin salgılanmasında kusurlar içeren birçok bozukluğu indükleyebilir ve böylece hızlı bir biçimde T2DM gelişimine neden olabilir (Potapov ve ark 2010).

TCF7L2 geninin intron 3 ve intron 4 bölgeleri, pek çok farklı toplumda T2DM ile güçlü ilişkisi oraya konulmuş özellikle rs7903146 ve rs12255372 ve benzeri tek nükleotid polimorfizmleri içerirler (Potapov ve ark 2010) (Şekil1.12). TCF7L2 genindeki SNP'lerden bu tez projesinde çalışılanların kromozom 10'da gen üzerindeki şematik yerleşimi Şekil 1.17.'de, içinde yeraldıkları intronik diziler ise Şekil 1.18 ve Şekil 1.19'da görülmektedir.



Şekil 1.17. TCF7L2 geninin yapısının ve tezin konusunu oluşturan SNP'lerin 10.kromozomda gen içerisindeki yerleşiminin şematik gösterimi (Jin ve Liu 2008'den uyarlanmıştır.)

AAAAAAAAGAAAGTAGCAGCTCTACTGAGATATTTAGAAACCATAAAATCCACCTATTTGAGGTGTAC
AATTGAGTGATTTTCTGTATAGTCACAGATCTGTGCAGTCATCCACACCCTCTAACTCCAGGACATTT
TCCTCACCCCCGAGGAGAAACCTCCCTTACCCATTAGCAGTCACTCCTCATTTCCTCTCCCCCCAGCC
CCTGGCAATCACTGTGGATTTGCCTGTTCTTGACATTTCATATAAATGGTATCATAAAATCTATGGGC
TTTTGTGTCTGTCTGCTTTTCACTTAGCATACGGTTCTCAAGGTTCATCCAGTATTGTAGCATCTATCA
GTATGTCATTCCTTTTTATGGCCAAATAATATTTTATTGTATGGATAGACATTTTGTTTATTCATTTA
TCTGTTTTTGGTTATTATGAGTAACACTACTATGAACATTTTGCACAAATTTTTGTATTGACATGTTT
TCATTTCTCCTGGGTATAGTCCTATGAGTGGAATTGCTGGGTCATATAATAAATAACTGTTTAACATT
TTGGGGAGCTGCCAAACTTTTAAAACCTTGGGTTCTGTGATGTACCAGTTGTGTTAGGCAGCACAGCA
AAATGTGACTTTTGATTGCCAGAAACAATATTTAAAAAGTGGTTATAAAAAGTGGTTTGGGAGGCTGA
GGCAGGAGGATCACTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAACATAGTGAGACCCTGTTAAAA
AAAAAGAAGGCCAGGCACAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGACTGAGGCGAGCAGA
TCACCTAAGGTCAGGAGTTCCAGACCAGCCTGGCCAACATGGCGAAACCCCATCTCTACTAAAAATAC
AAAAATTAGCCAGGCCTGGTGGTGGGCGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTTGAGGCAGGAGAA
.....

TTTTTGCCTGCAACCTTGCATTGTAATCCAGTGACACCTGACGTATCTGTAAATTTCTTCAAATTTCT
AAGTGTATTACAACCCCGTGTGCAAAAGATGATTAATTAATTGCCTTGACAGTAAAACAAAAAACAAA
AAAAAGGTGTGGGGGTATATGGTATCCCTGATTTACTATAGAAGATGCAGAGAGTGAAGGGAGATGAG
GTGGGGAGGAGGGGCCCAGGTTCTGGTCCTACTTTTTTTTTTTTTTTCTAAAGAGATGGAGTCTTAC
CATGTTGGCCAGTCTAGGCTTGAACTCCTGGCCTCAAGAGGTGCTCTCACCTCAGCCTCCCAAAGTGC
TGGGATTATAGGCGTGAGCCACCGAGTTTAGCCCAGGTTCTGTTTCTTGCTTAGTCACTTTCTGTTTG
AACAAAATTGGAATTTCCTTTTTGGATCTGTTTCTTTAATTGTAAATTGAATCGGACTAAAACCTTTC
CAATTTTTTCACATGTGAAGACATACACAAAAGTTTTATTGGAGGGTTGCACATGTGAAAGAAAAAGG
GAGAAAGCAGGATTGAGCAGGGGGAGCCGTCAGATGGTAATGCAGATGTGATGAGATCTCTGCCGGAC
CAAAGAGAAGATTCCTTTTTAAATGGTGACAAATTCATGGGCTTTCTCTGCCTCAAAACCTAGCACAG
CTGTTATTTACTGAACAATTAGAGAGCTAAGCACTTTTTAGATACTATATAATTTAATTGCCGTATGA
GGCACCCTTAGTTTTCAGACGAGAAACCACAGTTACAGGGAAGGCAAGTAACTTAGTCAATGTCAGAT
AACTAGGAAAAGGTTAGAGGGGCCCTGGACACAGGCCTGTGTGACTGAGAAGCTTGGGCACTTCACTG
CTACATTTCATCTCTTCGCTATAAACATTTTAGCTTTTTGTGTTTGCTGACTGGCAACAATACATAGT
GAAAGTTCTAATAATTTGTAATGCTTTTGCATGTCTTTGTATTTTTCTTGGTTATCACATCACATCAA
ATTAAGATACTGATCAGCAGTGTGAGAGGTTATTTTTCCATTCCTCTTCATTAGTGTTAGCTTGTGGA
TGGATTTGAGGCTCTCTGTGCTTTCCCCCCAGCAAAGTGAATACCAGACTTTCCTATTAAAAAAAGTA
TTTTATTTTTCAGAGACAGGGTCTCATTCTGTCTCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCATAGCCC

Şekil 1.18. TCF7L2 geni Intron 3 kısmi dizisi (PubMed NCBI Gen Bankası (tüm gen Erişim No: NT_030059.13). İşaretli kısımlar ve SNP rs7901695 ve rs7903146 (sırasıyla)'a aittir. Altı çizili kısımlar PZR için tasarlanan ileri ve geri primerleri ifade etmektedir.

ATGTCATTAAAATGCTTAAGGATTTTTAATGACCACATAACAGTCCATAATATGATTAAACCCCAATT
TACTGAATCAATGCCATATTGTTGGGTCTTTAGATTGTCTCCTTTTGTTTCTGCTACTGTGAATGATC
CTGTGATGATCATCTTTGTGTGTAAATCTTTGTCCCCTCGCCCCCTCCCCTTTTATTATTTTCTTGGG
ATAGACCCCAGGACAAAAGGTAGAAAAGAACAAAGTGTTAAAAAATTTCTTGATACATAGCCACAGAT
TATTTTCCTGAAAGTTCTCAACATTTATAACTACGAGCAGTATGTAAGAGAGTTATGGTTGGAATGAT
TTTAATGTCTCTGGGGAATTTAACAACAAAAAAACTTTAGGCTTCTTTGGAGAGAGACATGCCCTTAA
CTCCACCCCGCCCTAGAACAGAGACCCAGCCCATCCAAGTCAGCCTCCCCAGGTCCTCCACCTTCAAA
ACAGGCAAACGAAATCATTTCTTGAATAATTGGTAGGCTTCAAGGTCAGATGTTTATTTTAGATAATT
CACAGCATAAATTTATATGTTTTAGGTACCTTAGCCCCTGAATATACTCAGTTCATTTAGGACTATTT
TAGAGGTCTTGAGTTTACTCTTATAACCTCACATTTTTTTGTGAATTTTTAGTTCTATTATCTTTGTT
TTCATGGCATATTATTGGGCAAAGATACTATTTATTCGATGCTATGTGTGAGCTGGGTCAGGATTATG
ACCCTGAGTTATGTTTCTGGGAAAATGTACCCACTTGTCAAAGATGCCGTTGGCTCCTGTGATTAAGG
TCAGCCCACAATGAATGTGGGGAGGGCTGGCAGCCTCTCAAATCAGCTCTTGACCATTTCTCAAGCTG
GGGCCTGTTGTGCTTGGGGGAAGAGTCTTTGGCAGCTCAGCTCGGGGCTAGCGTTTCCTGACATTTGT
TTCGCTGAATGTTAACAAGGTTACTGGAAAAAAGGGTTCTCTCCTAAAATAGGTTTAGGGAAGCACTG
GGATATGCGAAGTGAATGAGTTTCTTTAGGGCAGGATCTTGACTCTGCAGGGGGCTTGGAGGCCTTCC
CTAGAGTGGGGCTTCCTAACACTGCAGAGCTCTTCCCAGGACGAGGGGCAAGATTGGGACCTACTTTG
GAAGGTTGTTTTTGTTTCGGCACCTGCTCTGTTTACGAAGCGTGGGAGCCTGTTTTAAATTAATGTGC
GCCTACTTAGAGCTACACTCATGGTTTTGACTATGTTTATCTTTCCAGTAAATAAAACAAAATTGTTC
ATTTGGCACCCAGCCTGTCCTGCTTGTCATTTCTTGTCTTGCTGATTAACTCTATGGATGGGGCATGT
TTCTCCAACCAGATTGTAAGTTTCTTGAAGCCAAGGAGCCCTGTGGTTGATTTCTTCACATGTGGCTC
TCTCTCCTCCCACAATGGTGCTTCGTTAATTAAGCAGAAAACCCATCTCTGGTTAGGGACTGGAGTTG
ATTTCGTTTGGAATGAGTGTGACTTCATCATGACCTGAAAGTGTTCAGAACCATCTTGGTTAGCACAA
GGGCGTGGACGTGTGTCTACTTTCTACCTGATGGGATAGCATGTTTAATTTGGGGTTATGACACTGAA
TGGTTTGCCAGTAACTTGCTAATCCAACCTTATACATTCCAGCTCACAGTGGAGCGTGTCTAATTGCC
ACAGCAGCATTTATGTGGAACGTGGTTGCACAAAAGCTCCAGAAAGTCAGGCTGAGGGCTCCTATCTC
TCCTCAATCTTGGTTTACGATGTCTGTTTCTGAGGAATCCTGGGATGGGGCCACTGGCTCTTTAAGAG
AGAGCCCGATTTGGAAATCTAGGACTTGATTGTTGATTATGGGCAATAGATACATTTTAAGAATGATG
TTGTAGGCTGTATGAAGTCATTTGATGATTGTTTTGTTAATGGCTTGCAGGTCAGATTTTCATCTTTT
TAAATTAATTATCATAGAAGGAGAAAACAACTGGATTTCAGAATTGTCCCTTGAGGTGTACTGGAAAC
TAAGGCGTGAGGGACTCATAGGGGTCTGGCTTGGAAAGTGTATTGCTATGTCCAGTTTACACATAAGG
ATGTGCAAATCCAGCAGGTTAGCTGAGCTGCCCAGGAATATCCAGGCAAGAATGACCATATTCTGATA
ATTACTCAGGCCTCTGCCTCATCTCCGCTGCCCCCCCGCCCCCTGACTCTCTTCTGAGTGCCAGATTC
AGCCTCCATTTGAATGCCAAATAGACAGGAAATTAGCATGCCCAGAATCCACGTCTTTAGTGCACT
CTCTCCCCAGCTCCAAACCTGTTACTGCTTGTGTTCAACATCTCAGTAAAGCTCAACAACATCGACCC
ATTACTTAGGCCTCAAACCTTGGGTGGCATCGTCGATTGCTCTTTTCTTTCATACCCCACATTCAACC
CATCAGCCCATCCCACAGGCCCAAGTGTGTCCTCTCTACCTTCAAAGCGTGTGTGGCATCCACCGCTT
.....

ACTTTCCTATACATTTCCTTAATTTAAGGGAACAGCGTAAACTCAGCCCAGGTGGATTAATCTCTCCA
GTGACTTTTGAAACTTCAATTTCCAATTTCCCTCTTATGTCTAGGTGTGAGTGAGGATACGTGTAGTA

ATTGTCGCAGGTATTAGTGAGAAAGGGTGCAGATCACACAAATATTTCACACGTTATTAGTTGGACCA
GACTTTGGAGGCAAGGGAGGGCCGTGTCACCTAGGAAATTTGCTCTTCCGTGGAGATGAAAGGGCAGT
GAATTAAGTGCCTGCTTTTTCTCCCTTTTTCCCTCTGACGGTTATTGATCCTCCCCTGGAACTGTACA
GTTCACGTTCTGATCTTTTTCTTGACAAAGGGAATTCCCAGTTTGTTCGCTGGCGAACGCACTAGCAG
GTGAGGAGTTAAAAGTTGGCAACGCCTGCCCTCTCGAGAGTGTCAGGATTTTTAGTCTCTTCCTTGAG
AGCTAGAAGATGTTTCTAAAAGAATCTCTTTGGTGACTTAGAAGTGGAGAGAGCTTTAGAAGCATGGC
ACAAATAAAAGGAAAGAGGCAAACACCGTCATTCTACATCTGTTTATTTTGTTATTAACAAAAGGCAA
GGCGATTTTCATTAAAGTTTTGCTGGGGTTGGGGTTGAGGGTGTAGAGAGCAAAAGTGTGAGTTGTAC
ACCATGACTGGAATCGCTTGGACATACTCTTCAGCAGACATCGTGTGACTGTGGAAGAAATGAGTTTC
ATGAAGATGACTGATAGAAGGAAGCCACTGAACCAGTCCTCTATCACCTCTTCCAAGGCTAAAGTTTG
GAGCCACTTGCAGAAGGCTCTCCTCAAACCCCTGTGTTCTTTGCCTACCCCTGCTGTTGCCACATCAT

.....

GGGCATCGTGTGATGTAGGAAGAAAGGGTTCTGGGGTCTGAGGCCGGAGAGACATAGGCATTTGTAAG
AAGAAAATCCCTCCATCATAGAGGATTCCAGGTAGAGGCAGGTTGGCTGGAGTGGCAATTAGTCCCTG
GTTTTGGCAGGTATGACCACAGAGTTCTCCTCTCTTGCAAGGGAACCCATGAGCTTGGACAGAGAGGA
AGTTCTGTTCTTTCACAGGGACCTGCCTGGCATGCAGTTGAGGTCAGAGGGAGTAAGGCTAGTCCTAG
TACAGGTCCCATTTTTTCCCCCTAAAGCCAGGCAGTACCTAAAACTTCCAGTTCCCTGCCACCCCCTC
CACCCCACCCCCACCCCCATGGTATAGTTTTGACTGAACAGGAAAAAACTAGTTGGCTAGGCTCAGGT
GTGCAAAATAATACTTGGGAGAGGTGTTAGTAGCCAGAACACAGGGCTCCACCTTTTGTTGGAATCGCC
TTCATATGTATATCTAAGAAGATGGAGACTTAATTTTTAAATCTCACACTCAGTTAACTCCATTATTG
CCCAAACGCTATCTTCCTCTTTTGTTGTAAAGTAGAGAAAGAGGGTTTTCCCCACATCTCCCCTTAGT
CCTGCTTAGAAGATGGCTGTGGGATTTGTGCTTCTTTACTGTAGACAGATCATGTCATCTGGACAGCT
TCTTCCTAACAATAAAAATAATATTAATAATAAACCACTGTAATAGATAATAAATAACAAACTTATCA
TGTGCTAGGTTCTGTGCTAAGCCTTTTCCTGGGTTCCTTAAGAACTAGGATTTGATTCATGATCAGAA
CCCATGGCTCTTTGCCTCTGTGCTTGCCTGTGTGCGTGTGGTCCTCATGGCGGAACACAAGAACCACC

Şekil 1.19. TCF7L2 geni İntron 4 kısmi dizisi (PubMed NCBI Gen Bankası (tüm gen Erişim No: NT_030059.13). İşaretli kısımlar SNP rs11196205, rs12255372, rs11196213, rs3814573 (sırasıyla)'e aittir. Altı çizili kısımlar PZR için tasarlanan ileri ve geri primerleri ifade etmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya ADA Kriterlerine göre Tip 2 Diabetes Mellitus tanısı konmuş 169 hasta alındı. Hastalar, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı ile Konya Diyabet Cemiyetinden seçildi. Hastaların seçiminde insülin kullanılmaması, vücut kitle indekslerinin (VKİ) 30'un altında olması kriterleri dikkate alındı. Kontrol grubunun oluşturulmasında ise, ailesinde diyabet hikayesi olmayan, oral glukoz tolerans testi (OGTT) normal olan 119 birey alındı.

OGTT uygulaması, 8-12 saatlik açlıktan sonra sabah saat 8:00 da yapıldı. 300 ml suda 75 gr glukoz çözülerek bir limon sıkıldı ve limonata şeklinde içirildi. Açlık c-peptid ve HbA1c değerleri ile, glukoz içirilmeden önce ve içirildikten 2 saat sonra alınan kan örneklerinde glukoz ve insülin değerlerine bakıldı.

Hasta ve sağlıklı bireylerden DNA eldesi için EDTA içeren tüplere ve serum insülin, c-peptid, glukoz ve HbA1c değerlerini analiz etmek için pıhtılaşma engelleyici içermeyen tüplere 10'ar ml kan alındı. EDTA'lı tüpler çalışılıncaya kadar -20^0C de saklandı.

HOMA-IR (Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance) hesaplaması; açlık insülin (µIU/ml) x açlık glukoz (mmol/ml) / 22.5 formülüne göre yapıldı ve 2.5 üzerinde değerlere sahip bireyler insüline dirençli kabul edildi.

HbA1c düzeyleri HPLC yöntemi ile, insülin ve c-peptid değerleri ise kemilimünesans yöntemi ile analiz edildi.

2.2.DNA İzolasyonu, PZR, SSCP, RFLP ve Agaroz Jel Elektroforezi İçin Gerekli Olan Gereçler

Santrifüj (NF 100R, İstanbul, Türkiye), derin dondurucu (-80 C), buzdolabı (Arçelik, İstanbul, Türkiye), mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul, Türkiye), su banyosu (Nüve, İstanbul, Türkiye), güç kaynağı (E-C Apparatus corparation, Petersburg, Florida), pH-metre (İnolab), manyetik karıştırıcı (Elektro-mag), vorteks (Nüve, İstanbul, Türkiye), Termal cycler (Quanta biotech, İngiltere), mikropipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya), hassas terazi (Kern, Almanya), yatay elektroforez tankı (Themo scientific, NH, ABD), dikey elektroforez tankı (Biolab, Ankara,

Türkiye), biyolojik emniyet kabini (Metisafe, Ankara, Türkiye), UV görüntüleme cihazı (Vilber-Lourmat, İngiltere).

2.3. DNA izolasyonu, PZR, SSCP, RFLP ve agaroz jel elektroforezi için gerekli olan kimyasal maddeler

EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), Tris-Hcl, NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), KCI (Merck, Darmstadt, Almanya), Üre (Merck, Darmstadt, Almanya), SDS, Proteinaz-K (Sigma, St Louis, Amerika), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Etil alkol, Akrilamid (Applichem, Darmstdt, Almanya), Bisakriland (Applichem, Darmstdt, Almanya), Amonyum persülfat (Sigma, St Louis, Amerika), TEMED (Sigma, St Louis, Amerika), Formaldehit, Asetik asit, borik asit (Sigma, St Louis, Amerika), Na2HCO3 (Merck, Darmstadt, Almanya), Sodyum tiyosülfat (Merck, Darmstadt, Almanya), Ksilen siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), Taq polimeraz, 100 bç ve 20 bç DNA ladder, dNTP karışımı (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10xAmonyum sülfatlı PZR tamponu, yükleme boyası, (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Kesim enzimleri *Rsa*I enzimi, *Bsr*I enzimi, *Tsp*509I restriksiyon enzimi (Fermentas, Vilnius, Litvanya), *Cac*8I restriksiyon enzimi, 6 çift primer (Biomers, Singapur).

2.4. DNA izolasyonu

2.4.1. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması

0.5 M EDTA (pH 8)

$EDTAH_20$……18.6 gr

dH_2O …….. 80 ml

1N NaOH ile pH 8'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml ye tamamlanarak otoklavlandı.

4M NaCl

NaCl ……23.97 gr

dH_2O……100 ml'ye tamamlandı.

5M NaCl

NaCl ……. 29.22 gr

dH_2O …… 100 ml'ye tamamlandı.

1 M Tris HCl (pH8)

TrisHCL ……1576 gr

dH2O …… 83 ml

1 N NaOH ile pH 8'e ayarlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlanıp otoklavlandı.

Parçalama Çözeltisi (5X)

NaCl …….. 4M

EDTA …… 0.5 M

TrisHCl ……. 1M

100 ml'ye tamamlanıp pH 7.5'e ayarlandı ve otoklavlandı.

Üreli Parçalama Çözeltisi

Üre ……. 4.2 gr

dH_2O ……. 1 ml

Parçalama çözeltisi …… 2 ml

%20 SDS

SDS ……. 20 gr

dH_2O ……... 80 ml

SDS iyice çözününceye kadar karıştırıcıda tutuldu. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

%70 Etanol

%96 etanol …….. 72 ml

dH_2O …….. 100 ml'ye tamamlandı.

2.4.2. DNA Eldesi

1- EDTA'lı tüpler oda ısısına alındı ve üzerine hacmi kadar soğuk saf su eklendi.

2- Nazikçe altüst edildikten sonra 20 dk. 4000 devir/dk santrifüj edildi.

3- Üstteki sıvı kısım atıldı. 2 ve 3. basamak 3 kez tekrarlandı.

4- Tüplere 3 ml. üreli parçalama çözeltisi ilave edildi ve tüpler altüst edildi.

5- Üzerine 400 µl %20 SDS ve 100 µl 10 mg/ml proteinazK ilave edildi.

6- Tüpler 37^0C de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

7- İkinci gün inkübasyondan çıkarılan tüplere 2 ml 5M NaCl eklendi ve 10-15 dk altüst edildi.

8- Üzerine 8 ml kloroform konularak 15 dk 4000 devir/dk santrifüj edildi.

9- Santrifüj sonunda oluşan 3 fazlık kısımdan üstteki beyaz faz temiz bir tüpe alındı ve üzerine hacmi kadar soğuk %96'lık etilalkol eklendi.

10- Alkol ilavesiyle yumak şeklini alan DNA'lar pipet yardımıyla 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve üzerlerine 1000 µl %70'lik alkol eklendi.

11- Tüpler 13000 devir/dk da10 dk santrifüj edildi.

12- Santrifüj sonrasında dibe yapışan DNA pelletinin üstündeki alkol dikkatlice döküldü.

13- 12. basamak 3 kez tekrarlandı.

13- DNA pelleti içeren tüpler oda sıcaklığında ağzı açık bir şekilde kurmaya bırakıldı.

14- Alkolün tamamen uçtuğundan emin olunduktan sonra pelletin üzerine uygun miktarda deiyonize steril su eklendi.

15. $+4^0$C de çözünmesi için bir gün bekletilen DNA'lar -20^0C de saklandı.

2. 5. Hedef Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

TCF7L2 geninin nükleotid dizisi Gen Bankasından NCBI (National Center for Biotechnology Information) aracılığı ile NT_030059.13 erişim numarasından temin edildi. TCF7L2 geninin literatürde özellikle hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilen intron 3 bölgesindeki 2 SNP ve intron 4 bölgesindeki 4 SNP nin bulunduğu bölgeyi tarayacak şekilde çalışılması planlandı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. TCF7L2 genindeki taranan SNP'ler ve ilgili özellikleri

SNP (rs numarası)	*TCF7L2 Lokasyon*	*Genomik pozisyon*	*Risk alleli*	*Analiz Yöntemi*
rs7901695	Intron3	114744078	C	SSCP
rs7903146	Intron3	114748339	T	RFLP (*RsaI*)
rs11196205	Intron4	114797037	C	SSCP
rs12255372	Intron4	114798892	T	RFLP (*Tsp509I*)
rs11196213	Intron4	114811544	T	RFLP (*Cac8I*)
rs3814573	Intron4	114888150	T	RFLP(*BsrI*)

Hedeflenen bölgelere uygun primerler, www.idtdna.com adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlandı (Çizelge 2.2). Sadece SNP rs7903146 için kullanılan primer dizileri Moczulski ve ark (2007)'den alındı. Hazırlanan primerler ticari olarak sipariş edildi. Liyofilize formda gelen primerler 50 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı.

Çizelge 2.2. TCF7L2 geninin hedef bölgelerine uygun tasarlanan primer dizileri

	Primer Dizisi (5'→3') (İ:ileri) (G:geri)	**Bölge Adı**	**Ürün Büyüklüğü (baz çifti)**	**Erime Sıcaklığı (^{0}C)**
1	**İ:** GAGGAGAAACCTCCCTTACCCATT **G:**GGATGAACCTTGAGAACCGTATGC	İntron 3-1 (rs7901695)	174	65
2	**İ:** GAGAGCTAAGCACTT TTTAGG TA **G:** CTGACATTGACTAAGTTACTT GC	İntron 3-2 (rs7903146)	113	58,2
3	**İ:** TCTGCTACTGTGAATGATCCTGTG **G:** GCATGTCTCTCTCCAAAGAAGCCT	İntron 4-1 (rs11196205)	285	63,4
4	**İ:** TGTTAATGGCTTGCAGGTCAGA **G:**CACCCAAGGTTTGAGGCCTAAGTA	İntron 4-2 (rs12255372)	466	62,7
5	**İ:** AGTTGGACCAGACTTTGGAGGCAA **G:** TCCAAGCGATTCCAGTCATGGTGT	İntron 4-3 (rs11196213)	508	63,1
6	**İ:** AACTAGTTGGCTAGGCTCAGGTGT **G:**AGCACAAATCCCACAGCCATCTTC	İntron 4-4 (rs3814573)	258	63,8

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

2.6.1. Gradient PZR

Çalışmada kullanılacak 6 çift primerin her bir çifti için uygun erime sıcaklığının tespit edilebilmesi amacıyla gardient PZR uygulandı. Her bir tüpde 10µl PZR karışımı olacak şekilde tüpler hazırlandı ve farklı sıcaklık aralıklarına programlanan ısı döngü (thermal cycler) cihazlarına yerleştirildi. Çalışmada Biorad ve PeqLab thermal cycler cihazları kullanıldı. PZR karışımının hazırlanması ve cihazların programlanması Çizelge 2.3 ve 2.4'de gösterildiği gibi yapıldı.

Çizelge 2.3. Gradient PZR karışımının Hazırlanması.

dH_2O	6.235
10X Tampon	1
$MgCl_2$ (25 mM)	0.6
dNTP (10 mM)	0.7
İleri primer	0.08
Geri primer	0.08
Taq polimeraz enzimi (5u / µl, 500 u)	0.055
DNA	1.2

Çizelge 2.4. Gradient PZR Reaksiyon Koşulları

Reaksiyon	**Sıcaklık (^{0}C)**	**Süre**
İlk denatürasyon	94	5 dk
Denatürasyon	94	30 sn
Bağlanma	Her primer çifti için değişen aralıklarda	30 sn
Uzama	72 Toplam 35 döngü	30 sn
Son uzama	72	2 dk

2.6.2. PZR uygulamaları

Her primer çifti için gradient PZR'da belirlenen sıcaklıklar dikkate alınarak örnekler çoğaltıldı. PZR karışımı Çizelge 2.2 de verildiği gibi toplamı 20 µl olacak şekilde hazırlandı. PZR koşulları Çizelge 2.3'de verildiği gibi programlandı. Her bir bölge için bağlanma sıcaklığı gradient PZR sonucuna göre uygulandı. PZR sonuçları Agaroz Jel Elektroforez yöntemi ile incelendi. Sonuç alınamayan örnekler, PZR karışım oranları ya da koşulları değiştirilerek yeniden çoğaltıldı. Gerektiğinde farklı sıcaklık aralıkları denenerek yeniden gradient PZR yapıldı.

2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Gradient PZR ve PZR sonucunda elde edilen hedef DNA bölgeleri % 1.5'luk agaroz jel elektroforezde yürütüldü ve görüntüleme cihazında değerlendirilerek fotoğraflandı.

2.7.1. Jelin Hazırlanması

Agaroz …….. 1.5 gr
1XTAE…….. 100 ml

Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyinceye kadar tutuldu. Daha sonra jelin sıcaklığı 60^0C'ye kadar düşünce çeker ocakta 8 µl ethidium bromür eklendi ve jel havuzuna döküldü. 30 dk polimerizasyona bırakıldı.

2.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi

6X yükleme boyası ……. 3 µl
DNA …… 4 µl

Jel donduktan sonra kuyucuklara yükleme boyasıyla birlikte DNA (PZR ürünü) karıştırılarak yüklendi. Örneklerle aynı sıraya bir kuyucuğa da bant büyüklükleri bilinen bir belirteç yüklendi.

2.7.3. Örneklerin Jelde Yürütülmesi

Örnekler jelde 150 volt (V)'da 20-30 dk yürütüldü.

2.7.4. Görüntüleme

Jel, ultraviyole görüntüleme cihazında görüntülendi ve fotoğraflandı.

2.7.5. Agaroz Jel Elektroforezde kullanılan çözeltilerin Hazırlanması

50X TAE tamponu

Tris baz ……. 24.2 gr
Glasiyel asetik asit …… 5.71 ml
0.5 M EDTA ……. 10 ml
dH_2O ……. 100 ml'ye tamamlandı.

1X TAE tamponu

50X TAE tamponu …… 100 ml
dH2O ……. 900 ml

2.8. DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Kesim enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki parçalara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism - Kesim parçası uzunluk polimorfizmi) olarak adlandırılır. RFLP; DNA'da, mutasyonlar/polimorfizmler sonucu oluşan nükleotid değişimleriyle kesim enziminin kesim bölgesinin yok olması ya da yeniden oluşması ve buna bağlı olarak DNA enzimle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşması temeline dayanan bir yöntemdir. Polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde çoğalma kontrolü yapıldıktan sonra geriye kalan PZR ürününde belirlenen 4 bölge için restriksiyon enzim kesimi işlemi yapıldı. Kesim yapılmış PCR ürünlerinde kesim olup olmadığının kontrolü % 2.5'lik agaroz jelde yapıldı. Bunun için 5 µl yükleme boyası ve 15 µl kesim ürünü karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi ve jel 85 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bç'lik ve 20 bç'lik belirteç kullanıldı. Yürüyüş panellerine göre UV ışık altında görüntülenerek değerlendirildi.

2.8.1. *RsaI* enzim kesimi reaksiyonu

***RsaI* enzim tanıma bölgesi** 5'...G T^A C...3'
3'...C A^T G...5'

Reaksiyon karışımının hazırlanması

PCR ürünü……. 13 µl
Buffer...……..…… 2 µl
RsaI Enzim……. 0,5 µl
dH_2O…..……..13,5µl içeren karışım tüpleri su banyosunda 37ºC'de 16 saat inkübe edildi.

RsaI enziminin rs7903146 için tasarlanan 113 bç'lik gen bölgesinde C allelinin varlığı tek bir kesim bçlgsei oluşturmaktadır. Kesim sonucunda 91 ve 22 bç büyüklüğünde bantlar oluşması beklenmektedir.

2.8.2. *Tsp509I* (*TasI*) enzim kesimi reaksiyonu

***Tsp509I* (*TasI*) enzim tanıma bölgesi** 5'...^A A T T ...3'
3'... T T A A^...5'

Reaksiyon karışımının hazırlanması

PCR ürünü……. 13 µl
Buffer...……..…… 2 µl
Tsp509I Enzim……0,5 µl
dH_2O…..……..13,5µl içeren karışım tüpleri su banyosunda 37ºC'de 16 saat inkübe edildi.

Tsp509I enziminin rs12255372 için tasarlanan 466 bç'lik gen bölgesinde T allelinin varlığı 4 kesim bölgesi oluşturmaktadır. Kesim sonucunda 145, 132, 116, 92 ve 31 bç büyüklüğünde bantlar oluşması beklenmektedir.

2.8.3. *Cac8I* (*R0579*) enzim kesimi reaksiyonu

***Cac8I* (*R0579*) enzim tanıma bölgesi** 5'... G C N^N G C ...3'
3'... C G N^N C G ...5'

Reaksiyon karışımının hazırlanması

PCR ürünü……. 13 µl
Buffer...……..…… 2 µl
Cac8I Enzim……0,5 µl
dH_2O…..……..13,5µl içeren karışım tüpleri su banyosunda 37ºC'de 16 saat inkübe edildi.

Cac8I enziminin rs11196213 için tasarlanan 508 bç'lik gen bölgesinde C allelinin varlığı 3 kesim bölgesi oluşturmaktadır. Kesim sonucunda 268, 107, 90 ve 43 bç büyüklüğünde bantlar oluşması beklenmektedir.

2.8.4. *BseNI (BsrI)* enzim kesimi reaksiyonu

***BseNI (BsrI)* enzim tanıma bölgesi** 5'...A C T G G N^...3'
3'...T G A C^C N ...5'

Reaksiyon karışımının hazırlanması

PCR ürünü……. 13 µl
Buffer...……..…… 2 µl
BsrI Enzim……. 0,5 µl
dH_2O…..…….13,5µl içeren karışım tüpleri su banyosunda 37ºC'de 16 saat inkübe edildi.

BsrI enziminin rs3814573 için tasarlanan 258 bç'lik gen bölgesinde T allelinin varlığı tek bir kesim bölgesi oluşturmaktadır. Kesim sonucunda 218 ve 40 bç büyüklüğünde bantlar oluşması beklenmektedir.

2.9. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) Yöntemi ve Uygulaması

DNA'nın denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmesi ve denatüre olmayan poliakrilamid jelde yürütülmesi esasına dayalı bir tekniktir. Tek iplikli DNA sahip olduğu ikincil yapısı nedeniyle kendi üzerinde katlanarak yeni bir konformasyona sahip olur ve molekül ağırlığından bağımsız dizilimine özgü bir şekilde elektromanyetik alanda hareket eder. Bu konformasyon, esas olarak zincir içi baz eşleşmelerine bağlı olarak oluşan ikincil yapıdır. Böylece iki iplik arasında tek bir nükleotid farkı dahi olsa ikincil yapı değişeceğinden yürümede farklılık oluşur. Bu farklılıklar gümüş boyama ile farklı bantlar ya da farklı konumdaki bantlar olarak gözlenir. Bu nedenle mutasyon ve/veya polimorfizm taramalarında tercih edilen bir tekniktir. SSCP için ideal ürün büyüklüğü 150-250 bç dir. Ürün büyüklüğü arttıkça farklılıkları yakalama şansı azalır. 150 bç'nin altındaki parçalarda SSCP analizinin duyarlılığı küçük DNA parçalarının ikincil yapı oluşturmalarındaki güçlükler nedeniyle azalmaktadır. 250 bç nin üzerindeki büyüklüğe sahip DNA larda da tek baz değişikliği ile daha az konformasyonal değişiklik oluşmaktadır ve bunun jelde ayırt edilmesi güçleşmektedir. Ayrıca ortam sıcaklığı ve jelin özellikleri gibi faktörler de sonucu etkiler. Bu nedenle yeni bir bölge çalışılırken önce şartların optimizasyonu sağlanır. Optimal koşullar altında mutasyon saptama oranı %80-90dır.

2.9.1. SSCP Tekniğinde Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

10X TBE tamponu (pH 8.3)

EDTA …….. 9.37 gr

Tris baz …… 108 gr

Borik asit ……. 55 gr

dH_2O …….. 1000 ml'ye tamamlandı.

1X TBE tamponu

10X TBE ……. 100 ml

dH_2O …… 900 ml

%10 Asetik asit (Durdurma çözeltisi)

Asetik asit …… 10 ml

dH2O …… 90 ml

%0.1 Gümüş nitrat (Boyama çözeltisi)

Gümüş nitrat …… 0.25 gr

dH_2O …… 250 ml

0.3 ml formaldehit eklenir.

%0.75 Sodyum Karbonat (Renk geliştirme çözeltisi) (taze hazırlanmalı)

Sodyum karbonat …….. 0.75 gr

dH2O …… 250 ml

Derin dondurucuda 20-30 dk soğumaya bırakıldı. Kullanmadan hemen önce;

Sodyum tiyosülfat ……. 52.5 µl

Formaldehit …….. 0.3 ml eklendi.

%10 APS (Amonyum persülfat)

APS ……. 1 gr

dH_2O ……... 10 ml

%50 Akrilamid : bisakrilamid stok (29:1)

Akrilamid …….. 29 gr

Bisakrilamid ……. 1 gr

dH_2O ……. 100 ml'ye tamamlandı.

3 MM filtre kullanılarak süzüldü.

% 7 Akrilamid

%50 akrilamid : bisakrilamid stok ……. 5.6 ml

dH2O ……. 32 ml

1X TBE ……. 2.4 ml

Kullanımdan önce;

TEMED ……. 20 µl

%10 APS ……... 200µl eklendi.

Yürüme boyası

Ksilen siyanol …… 0.025 gr

Bromofenol mavisi …… 0.025 gr

Formamid …….. 8 ml

dH_2O ……. 2 ml

2.9.2. SSCP'nin yapılışı

1- Camların hazırlanması

Camlar deterjan ile yıkandıktan sonra iyice kurulandı. Camların her iki yüzeyi de önce %70 etilalkol ile 3 kez daha sonra %96 etilalkol ile 1 kez temizlendi ve iyice kurulandı. Camların kenar kısımlarına aralık oluşturması için aralık çubukları (spacer) yerleştirildi. Aralık çubuklarının düzgün durduğundan ve camların tam birbiri üzerine geldiğinden emin olununca camlar dikkatlice alınarak elektroforez kıskaçları içine yerleştirildi ve camlar vidalarla iyice sıkıştırıldı. Daha sona jel dökme aparatına yerleştirildi. Camlar arasına dH_2O dökülerek akıp akmadığı kontrol edildi. Eğer dH_2O camlar arasından akarsa camlar aparattan çıkartılıp düzenek yeniden hazırlandı ve yine su ile test edildi.

2- Jelin hazırlanması

Jel, 250 ml beher içinde DNA'nın büyüklüğüne göre tespit edilen oranda hazırlandı. Bu çalışmada kullanılan jeller, ürün büyüklükleri birbirine yakın olduğu için genellikle 29:1 oranında hazırlandı. Manyetik karıştırıcıda, 15 ml %50 stok akrilamid:bisakrilamid çözeltisi, 5 ml 1XTBE ve 30 ml dH_2O karıştırıldı. İyice karıştıktan sonra 350 µl %10 APS ve 35 µl TEMED ilave edildi ve 15 sn daha karıştırıcıda tutuldu. Hazırlanan jel 50 ml'lik enjektör yardımıyla dikkatlice ve hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek iki cam arasına döküldü. Kuyucukları oluşturmak için tarak takıldı ve jel 45-60 dk polimerizasyona bırakıldı.

3-Örneklerin hazırlanması

Jel, polimerize olduktan sonra jel dökme aparatından çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforezin orta kısmına 1X TBE konuldu ve tarak çıkartıldı.

Tarak çıktıktan sonra kuyucuklarda oluşan bozukluklar düzeltildi ve jel parçacıkları temizlendi. pH dengesini sağlamak amacıyla elektroforez, 88 voltda 30 dk çalıştırılarak ön yürütme yapıldı.

Örnekler, 4 µl PCR ürünü ve 20 µl yürütme boyası olacak şekilde 0.2 ml'lik tüplerde hazırlandı. Tüpler 95 ^{0}C'de 10 dk denatürasyona bırakıldı ve denatürasyon sonrasında hızlıca buza alındı. Tek iplik haline gelen DNA'nın tekrar birleşmesini önlemek amacıyla 4-5 dk buzda bekletilen örneklerden 10-12 µl kuyucuklara yüklendi. Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra tankın içine 1X TBE ilave edilerek 130 volt 2 amper 2 wat hızda 15-18 saat yürütüldü.

4- Örneklerin görüntülenmesi

Yürüme tamamlandıktan sonra tanktan alınan camlar bisturi yardımıyla birbirinden ayrıldı. Jel camla birlikte %10 asetik asit bulunan kaba alındı. Çalkalama cihazında 15 dk tutuldu. Bu aşamada camdan ayrılan jel önce dH2O'da yıkandı sonra %0.1 gümüş nitrat çözeltisine alındı ve 30 dk çalkalama cihazında çalkalandı. Gümüş nitrat sonrasında jel, %0.75 soğuk sodyum karbonat çözeltisinin bulunduğu kaba alındı. Bantlar görününceye kadar elde nazikçe çalkalandı. Bantlar görününce jel dH_2O'ya alındı ve birkaç dk yıkandı. Daha sonra %10 asetik asit ve ardından dH_2O'da 5 dk tutuldu. Boyama işlemi tamamlanan jel iki asetat kağıdının arasına alındı ve tarayıcıdan geçirilerek fotoğraflandı.

2.10. Dizi Analizi

RFLP ve SSCP tekniklerinde farklılık gösteren bantlardan birer örnek dizi analizi yapılmak üzere seçildi. Örneklerin dizi analizleri özel laboratuarlarda (İontek, Türkiye ve Macrogen, Kore) yapıldı. Dizi analizi sonuçları Java programı ile değerlendirildi. NCBI blast programı ile gen bankasındaki dizilerle eşleştirildi. Blast sonuçları ve pik görüntüleri dikkatli bir biçimde karşılaştırılarak değişiklikler değerlendirildi.

2.11. İstatistiki Analizler

Tüm istatistik analizler R 2.11.1 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Klinik ve biyokimyasal özelliklerin değerlendirilmesi için tanımlayıcı istatistik yapıldı, veriler ± standart sapma olarak hesaplandı. İlk karşılaştırma hasta ve kontrol

grupları arasında t-testi kullanılarak, hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg (HW) dengesi bakımından analizi ise ki kare testi ile yapıldı. Analizler dominant, eklemeli (additif) ve resesif modeller altında ayrı ayrı değerlendirildi. Hasta ve kontrol bireylerinde SNP'lerin allel frekansları ise Odds oranları hesaplanarak tespit edildi.

Açlık insülin ve HOMA-IR değerleri normal dağılıma uymadığı için istatistik analiz öncesi açlık insülin değerleri karekök transformasyon, HOMA-IR değerleri ise log-transformasyon ile normalize edilerek tek yönlü (tek SNP) ve 2 yönlü (2 SNP) regresyon analizi modeli uygulandı.

Bireylerin açlık glukoz değerleri <100, 101-125, 126-200 ve >200 şeklinde gruplandı. Açlık glukoz ile SNP genotipleri ilişkisi ki-kare, açlık insülin-SNP genotipleri ilişkisi F testi, HbA1c- genotip ilişkisi Kruskal-Wallis testi ve HOMA-IR ile genotip ilişkisi one-way ANOVA testi kullanılarak hesaplandı. Tüm analizler için, P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Gruplarının Klinik Özellikleri

Çalışmaya, S.Ü. İç Hastalıkları AD Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyeti polikliniklerinden 169 diabetik ve 119 sağlıklı birey dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı 56 idi. Hastalar 30 VKI'den küçük (obez olmayan) ve hiperglisemikti. Hastaların ve sağlıklı kontrol grubunun klinik ve biyokimyasal özellikleri Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Hasta ve kontrol gruplarının klinik ve biyokimyasal özellikleri

	Hasta	**Kontrol**	***P***
Cinsiyet (E/K)	169 (107/62)	119 (63/56)	0.08
Yaş (yıl)*	56 (39 – 78)	40 (26 – 80)	0.00
VKI (kg/m2)*	26.7 (18.6 – 35)	26 (17.6 – 34.9)	0.20
Açlık glukoz (mg/dL)*	139 (77 – 526)	91(58 – 129)	0.00
Açlık insulin (µU/mL)**	8.2 (7.6 – 8.9)	7.3 (6.6 – 8.0)	0.04
HbA1c (%)*	6.9 (1.6 – 19.5)	5.4 (4 – 6.6)	0.00
c-peptid (ng/mL)*	1.9 (0.5 – 7.2)	2.1 (0.4 – 15.7)	0.02
HOMA-IR***	2.9 (2.6 – 3.2)	1.5 (1.4 – 1.7)	0.00

*Medyan (minimum – maksimum) ** Geri dönüştürülmüş ortalama ve 95% CI
*** Geometrik ortalama 95% CI

Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, Tip 2 diyabetik bireylerin açlık glukoz, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR düzeyleri anlamlı şekilde farklı bulundu ($p<0.05$). OGTT sonuçlarına göre yapılan değerlendirmede, 2. saat açlık plazma glukoz düzeyi >200 olan bireyler diyabetik olarak düşünüldü, 140-200 aralığında açlık glukozu olan diğerleri ise bozulmuş glukoz toleransına sahip oldukları düşünülerek kontrol grubuna alınmadı.

3.2. TCF7L2 Genindeki SNP'lerin belirlenmesi

Hasta ve kontrol bireylerinde TCF7L2 geninde yeralan 6 SNP'nin bulunduğu intronlar 6 primer çifti kullanılarak PZR-SSCP ve PZR-RFLP yöntemleri ile taranmıştır. Çizelge 3.2'de bu SNP'ler ile ilgili bilgiler ve Çizelge 3.3'de bu SNP'lere ait genotiplerin hasta ve kontrol bireylerde görülme sıklıkları verilmiştir.

Çizelge 3.2. TCF7L2 geninde bulunan SNP'lerin yerleri ve özellikleri

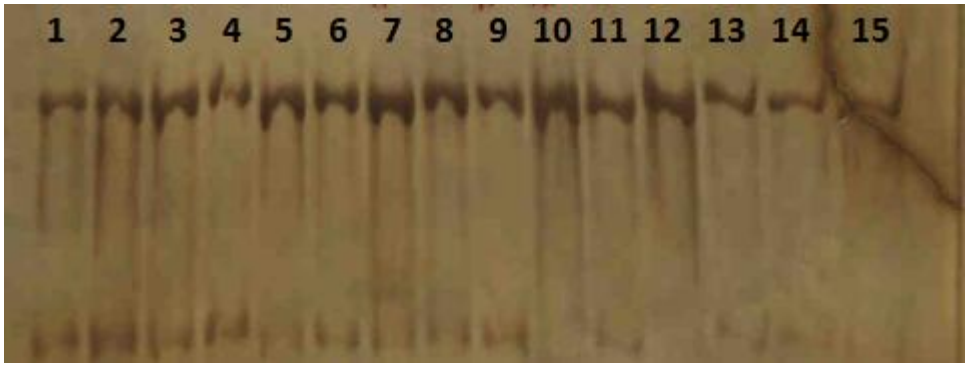
SNP	rs numarası	Yeri	Değişiklik (baz)
1	rs7901695	İntron 3	T→C
2	rs7903146	İntron 3	C→T
3	rs11196205	İntron 4	G→C
4	rs12255372	İntron 4	G→T
5	rs11196213	İntron 4	C→T
6	rs3814573	İntron 4	C→T

Çizelge 3.3. TCF7L2 genindeki SNP'lerin genotiplerinin hasta ile kontrollerdeki görülme sıklıkları

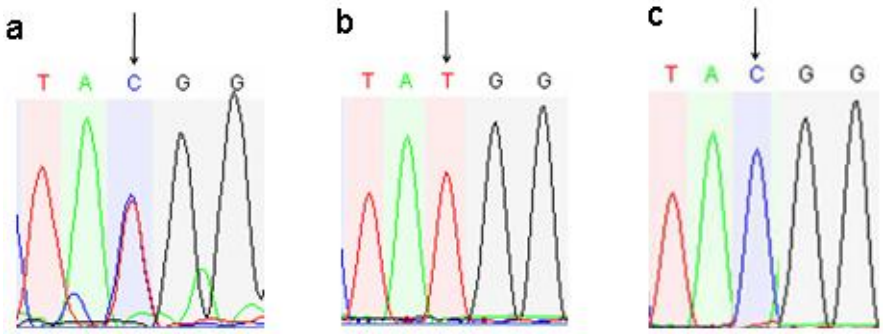
	SNP	Genotip	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	Additif *P*	Dominant *P*	Resesif *P*
1	rs7901695	T/T	50 (29,76)	27 (24,11)			
		C/T	82 (48,80)	62 (55,33)	>0,05	>0,05	>0,05
		C/C	36 (21,43)	23 (20,53)			
2	rs7903146	C/C	58 (34,52)	57 (47,5)			
		C/T	95 (54,76)	47 (39,16)	<0,05	<0,05	<0,05
		T/T	18 (10,71)	16 (13,33)			
3	rs11196205	G/G	18 (11,25)	16 (14,68)			
		G/C	89 (55,62)	54 (49,54)	>0,05	>0,05	>0,05
		C/C	53 (33,12)	39 (35,77)			
4	rs12255372	G/G	72 (42,85)	30 (27,5)			
		G/T	65 (38,69)	51 (46,78)	<0,05	<0,05	>0,05
		T/T	31 (18,45)	28 (25,68)			

5	rs11196213	C/C	50 (35,21)	22 (20,95)			
		C/T	73 (51,40)	69 (65,71)	>0,05	>0,05	>0,05
		T/T	19 (13,38)	14 (13,3)			
6	rs3814573	C/C	59 (38,31)	51 (46,36)			
		C/T	67 (43,5)	43 (39,09)	>0,05	>0,05	>0,05
		T/T	28 (18,18)	16 (14,54)			

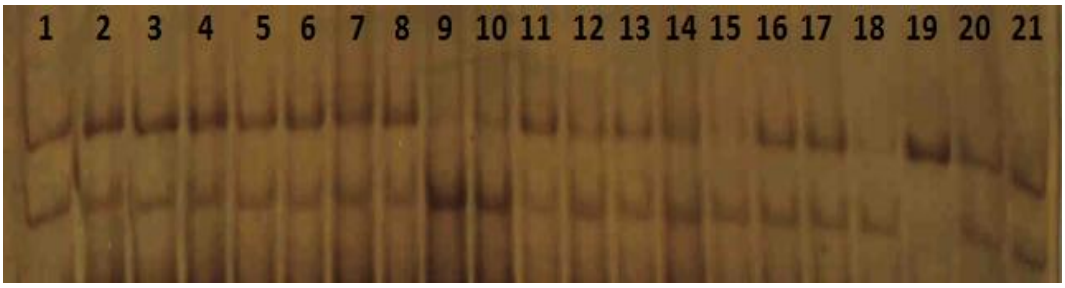
rs7901695 ve rs11196205 SSCP yöntemi ile analiz edilmiştir. SNP'lere ait SSCP jel görüntüleri Resim 3.1 ve Resim 3.2'de gösterilmiştir (sırasıyla). SSCP analizi sonucunda Jel üzerinde farklı yürüme profilleri gösteren örnekler gruplanarak, seçilen örnekler dizi analizi ile değerlendirilmiştir. SNP'lere ait dizi analizi sonuçları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir (sırasıyla).



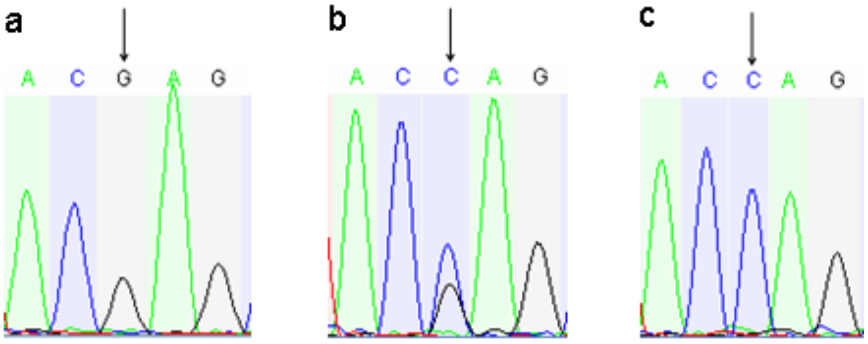
Resim 3.1. rs7901695 (intron 3)'in SSCP jel resmi. 1,2,6,8,9,11 nolu örnekler TT genotipini; 3,5,7,10,12 nolu örnekler TC genotipini; 4,13,14,15 nolu örnekler CC genotipini göstermektedir.



Şekil 3.1. rs7901695 (intron 3), T→C dönüşümü dizileme sonuçları. a) heterozigot TC genotipi, b) homozigot TT ve c) homozigot CC genotipleri

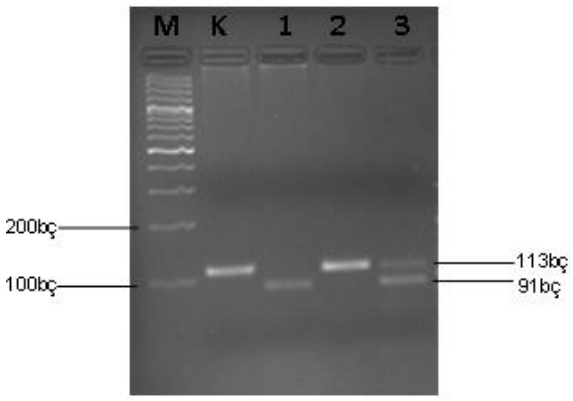


Resim 3.2. rs11196205 (intron 4)'in SSCP jel görüntüsü. 1,12,13,14,15,18,20,21 nolu örnekler CC genotipini; 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,16,17 nolu örnekler CG genotipini; 19 nolu örnek ise GG genotipini göstermektedir.

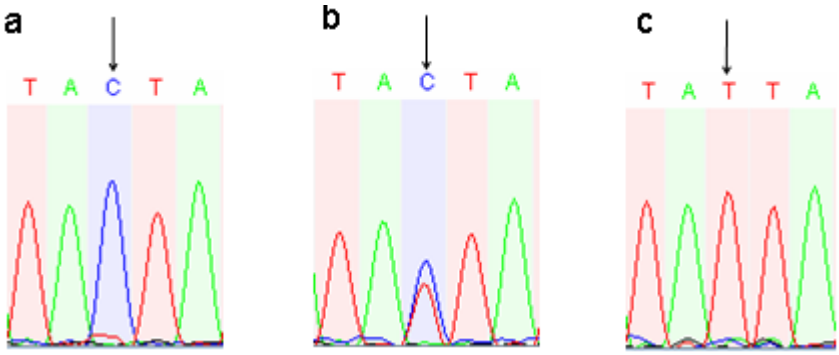


Şekil 3.2. rs11196205 (intron4) G→C dönüşümü dizileme sonuçları. a) homozigot GG b) heterozigot GC ve c) homozigot CC genotipleri

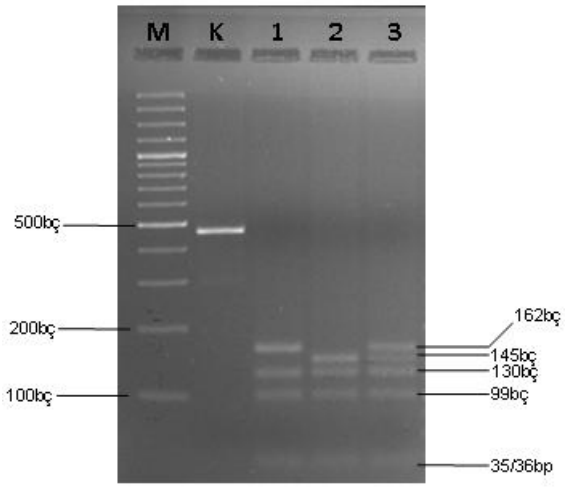
rs7903146, rs12255372, rs11196213 ve rs3814573 polimorfizmleri RFLP analizi ile çalışılmıştır. SNP'lere ait RFLP jel görüntüleri Resim 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da gösterilmiştir (sırasıyla). RFLP analizi sonucunda jel üzerinde farklı bant profilleri gösteren örneklerden seçilen örnekler dizi analizi ile değerlendirilmiştir. SNP'lere ait dizi analizi sonuçları Şekil 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da gösterilmiştir (sırasıyla).



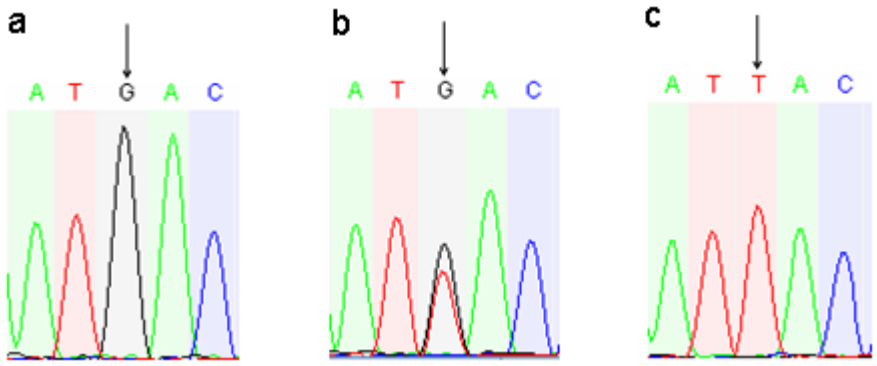
Resim 3.3. *RsaI* enzim kesimi sonuçları. M: molekül ağırlığı belirleyici K: kesilmemiş PZR ürünü 1no'lu kuyucuk; kesime uğramış ürünler (CC) 2 no'lu kuyucuk; kesime uğramamış ürün (TT) 3 no'lu kuyucuk; heterozigot kesilmiş ürün (CT) *22 bç'lik diğer kesim ürünü oldukça küçük olduğu için jelde seçilememiştir.



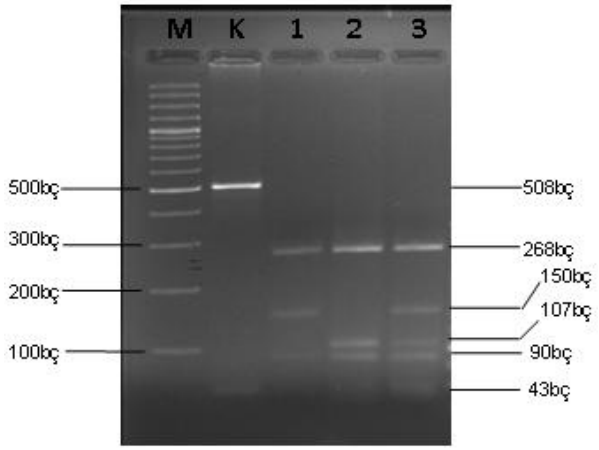
Şekil 3.3. rs7903146 (intron 3) C→T dönüşümü dizileme sonuçları. a) homozigot CC b) heterozigot CT ve c) homozigot TT genotipleri



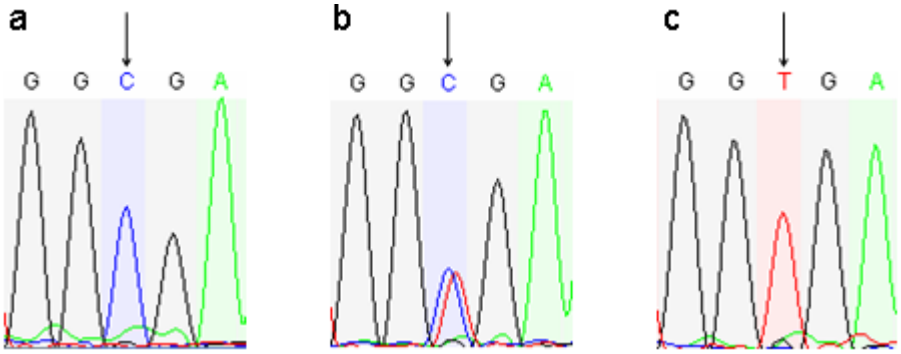
Resim 3.4. *Tsp509I* (*TasI*) enzim kesimi sonuçları. M: molekül ağırlığı belirleyici K: kesilmemiş PZR ürünü 1no'lu kuyucuk; kesime uğramış ürünler (TT) 2 no'lu kuyucuk; kesime uğramamış ürün (GG) 3 no'lu kuyucuk; heterozigot kesilmiş ürün (GT) *17 ve 4 bç'lik diğer kesim ürünleri jelde seçilememiştir



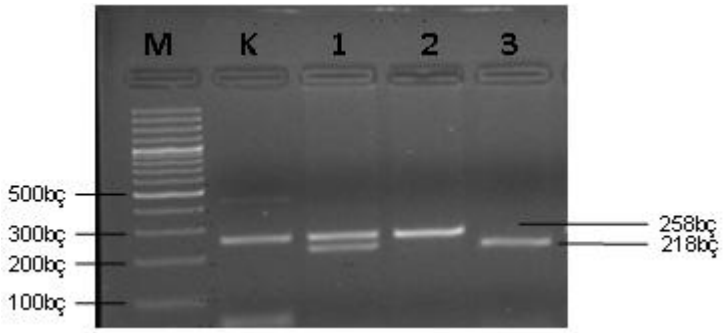
Şekil 3.4. rs12255372 (intron 4) G→T dönüşümü dizileme sonuçları. a) homozigot GG b) heterozigot GT ve c) homozigot TT genotipleri



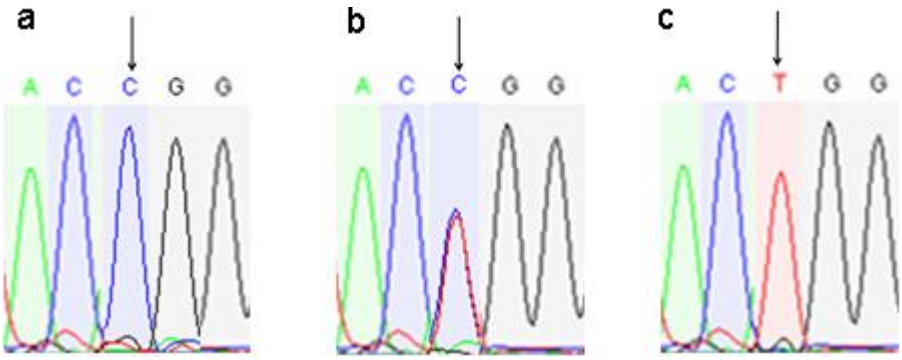
Resim 3.5. *Cac8I* (*R0579*) enzim kesimi sonuçları. M: molekül ağırlığı belirleyici K: kesilmemiş PZR ürünü 1no'lu kuyucuk; kesime uğramamış ürünler 2 no'lu kuyucuk; kesime uğramış ürün 3 no'lu kuyucuk; heterozigot kesilmiş ürün * diğer kesim ürünleri jelde seçilememiştir



Şekil 3.5. rs11196213 (intron 4) C→T dönüşümü dizileme sonuçları.
a) homozigot CC
b) heterozigot CT ve c) homozigot TT genotipleri



Resim 3.6. *BseNI* (*BsrI*) enzim kesimi sonuçları. M: molekül ağırlığı belirleyici K: kesilmemiş PZR ürünü 1no'lu kuyucuk; heterozigot kesilmiş ürün 2 no'lu kuyucuk; kesime uğramamış ürün 3 no'lu kuyucuk; kesime uğramış ürün



Şekil 3.6. rs3814573 (intron 4) C→T dönüşümü dizileme sonuçları. a) homozigot CC b) heterozigot CT ve c) homozigot TT genotipleri

3.3. İlişki çalışması

Analiz edilen tüm SNP'lerin genotip dağılımları Hardy-Weinberg eşitliği bakımından dengedeydi (P>0,05). Yapılan ki-kare analizi ve odds hesaplaması sonucunda rs7901695 T→C, rs11196205 G→C, 11196213 C→T ve rs3814573 C→T dönüşümlerinin hastalıkla anlamlı bir ilişkisi saptanmadı (P>0.05).

rs7903146 (intron3) C→T dönüşümü dominant (OR:1.71 [95% CI:1.06-2.77] P=0,01) ve eklemeli (OR:1.9 [95% CI:1.15-3.19] P=0.005) modeller altında; rs12255372 (intron 4) G→T dönüşümü de eklemeli (OR:1.99 [95% CI:1.14-3.48] P=0.007) ve dominant (OR:2.1 [95% CI: 1.25-3.55] P=0.002) modeller altında, Tip 2 diyabet ile oldukça anlamlı ilişkili bulundu. rs7903146 ve rs122255372 SNP'lerinin her ikisi için de risk alleli T olarak belirlendi.

3.4. Genotip-fenotip ilişkisi

Açlık glukoz düzeyleri ki-kare testi ile değerlendirildi. rs7901695 T→C, rs11196205 G→C, 11196213 C→T, rs3814573 C→T ve rs12255372 G→T dönüşümlerinin açlık glukoz ile ilişkili bulunmazken (P>0.05), rs7903146 C→T dönüşümü açlık glukoz ile oldukça anlamlı şekilde ilişkili bulundu (P= 0.003).

Açlık insülin düzeyleri varyans analizi ile değerlendirildi ve tüm SNP'ler ile açlık insülin düzeyleri ve HOMA-IR değerleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. HbA1C değerleri için yapılan kruskal–wallis testi sonuçları da SNP'lerin HbA1C düzeyleri ile ilişkili olmadığı yönündeydi (P>0.05).

3.5. SNP'lerin epistatik etkisi

Tip 2 diyabet, açlık insülin ve HOMA-IR düzeyleri üzerinde SNP-SNP etkileşimi ve bu fenotipler üzerine birlikte etkilerinin analizi 2 yönlü regresyon modeli kullanılarak yapıldı. SNP kombinasyonları ve fenotipler ile arasında anlamlı bir etkileşim bulunmadı.

4.TARTIŞMA

Tip 2 diyabetin oldukça güçlü bir genetik temelinin olduğu aşikar olmasına rağmen, yakın zamanlara kadar, T2DM için risk oluşturdukları öngörüsüyle çalışılan aday genlerin birçoğunun öne sürülen etkisi beklenenden daha hafif bulunmuş ve farklı populayonlardan gelen benzer ilişki çalışmalarının sonuçlarının birbiriyle uyumsuz olduğu görülmüştür (Florez ve ark 2003, Malecki ve Klupa 2005). Grant ve ark (2006)'nın yaptıkları çalışmada beklenmedik bir şekilde karşılaştıkları TCF7L2 (Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2) gen varyantlarının T2DM ile oldukça güçlü ilişkisini rapor etmeleri ve İzlandalı grupta elde ettikleri bu sonucu, tamamen tutarlı bir biçimde Danimarka ve Amerika'daki farklı vaka-kontrol örnekleriyle de elde etmelerinden sonra bu yeni keşif tüm dünyada oldukça dikkat çekmiş ve kısa sürede farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlar tekrarlanmıştır (Damcott ve ark 2006, Groves ve ark 2006, Humphries ve ark 2006, Scott ve ark 2006, Cauchi ve ark 2007, Chandak ve ark 2007, Hayashi ve ark 2007, Helgason ve ark 2007, Lehman ve ark 2007, Marzi ve ark 2007, Mayans ve ark 2007, Sladek ve ark 2007).

TCF7L2 (TCF4), Wnt sinyal yolunun bir parçası olan ve β-katenin (CTNNB1) için nükleer reseptör olarak iş gören bir transkripsiyon faktörüdür (Smith 2007). Wnt sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu, motilite ve normal embriyogenez (hücre farklılaşması) için kritiktir. Miyogenez ve adipogenezisi regüle ettiği (Ross ve ark 2000, Etheridge 2004) ve embriyonik gelişim sürecinde pankreas ve adacıkların gelişimi için de kritik öneminin olduğu gösterilmiştir (Papadopoulou ve Edlund 2005, Weedon 2007). Wnt sinyal yolu önceleri kanser gelişimi (başta kolorektal kanserler olmak üzere) ile olan güçlü ilişkisi ile bilinirken, TCF7L2'nin T2DM ile olan çarpıcı ilişkisinin ortaya çıkmasından sonra, T2DM gelişimindeki önemi ve yeri bakımından da ilgi konusu olmuştur.

Beş geniş ölçekli genom boyu ilişki (GWA) taramasının (DGIBIH 2007, Scott ve ark 2007, Sladek ve ark 2007, Steinthorsdottir 2007, Zeggini ve ark 2007) sonuçları, TCF7L2'nin bugüne kadar tanımlanmış olanlar içinde en önemli Tip 2 diyabet geni (yatkınlık oluşturma anlamında) olduğunu açık bir şekilde ortaya koymuştur.

Farklı etnik gruplardan gelen analiz sonuçları ve bunların birçoğunun verileri kullanılarak yapılan kapsamlı meta analiz çalışmalarının sonuçları TCF7L2'nin T2DM gelişimindeki yerini oldukça güçlendirmekte ve rs7903146 T allelini T2DM

gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak belirtmektedir (Saxena ve ark 2006, Luo ve ark 2009, Tong ve ark 2009).

TCF7L2 geninin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri T2DM ile ilişkisi bakımından çalışılmış, ancak hastalık ile ilişkili herhangi bir kodlayan bölge varyantı tespit edilememiştir (Ji ve ark 2008, Ren ve ark 2008). Hastalıkla ilişkili olduğu literatüre kaydedilen tüm varyantlar intronik bölge değişiklikleridir.

TCF7L2 geni ile ilgili olarak çalışılan SNP'lerden en çok dikkat çekenleri; intron 3'deki rs7903146 C>T, rs7901695 T>C ile intron 4'deki rs12255372 G>T ve rs11196205 G>C değişiklikleridir. Bu dört polimorfizm arasındaki güçlü bağlantı pek çok şekilde ortaya konulmuştur (Tong ve ark 2009).

Farklı etnik gruplarda TCF7L2 genindeki polimorfizmlerin T2DM ile ilişkilerinin çalışıldığı 36 bağımsız populasyon çalışmasının verilerin değerlendirildiği kapsamlı bir metaanaliz çalışmasında (Tong ve ark 2009), bizim de sunulan doktora tez projesinde çalıştığımız rs12255372 G>T, rs7903146 C>T, rs7901695 T>C ve rs11196205 G>C dönüşümlerinin hastalık gelişimine etkileri saptanmıştır. Çalışmada toplamda 35 843 T2DM'li ve 39 123 sağlıklı bireyin verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; TCF7L2 geni rs7903146 için T allelinin homozigot (TT) ve heterozigot (CT) taşıyıcılarında T2DM riskinin yaygın alleli homozigot (CC) taşıyanlara oranla 1.9 kat arttığını ve populasyon atfolunabilir riskinin TT/TC genotipleri bakımından tüm populasyon için %16.9 olduğunu tespit etmişlerdir. rs12255372 G>T için ise TT homozigot ve TG heterozigot genotiplerini taşıyanların GG homozigot olanlara oranla 1.8 kat artmış T2DM riski taşıdıklarını da göstermişlerdir. Bu meta analiz çalışmasında, TCF7L2'nin söz konusu 4 varyantının da T2DM riski ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve rs7903146 T allelinin T2DM gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Tong ve ark 2009).

On ayrı çalışmanın verileri kullanılarak toplam 10 124 Tip 2 diyabetik hasta ve 9 330 kontrol ile yapılan Doğu Asya toplumlarında TCF7L2 tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) T2DM riski ile ilişkilerinin araştırıldığı başka bir metaanaliz çalışmasında ise rs7903146 T alleli, rs12255372 T alleli, rs11196205 C alleli, rs290487 C alleli ve rs11196218 G allellerinin hastalık ile ilişkileri değerlendirilmiş ve rs7903146 risk allelinin (T) varlığı, T2DM oluşumunu 1.4 kat arttıran bağımsız bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (Luo ve ark 2009).

rs7903146 C>T'nin T alleli, rs7901695 T>C'nin C alleli; rs12255372 G>T'nin T alleli ve rs11196205 G>C'nin C alleli'nin Kafkas ırkında, kuzey Afrikalılarda, Afrika ve Hindistan populasyonlarında Doğu Asya populasyonlarına nazaran daha yüksek frekansa sahip olduğu görülmüştür. Bir çalışma sonucuna göre TCF7L2'nin yaygın varyantı rs7903146'nın risk allelinin bir bireyde 2 kopya halinde bulunması, T2DM riskini 2 kat artırmaktadır (Tong ve ark 2009).

Kuzey İsveçli 872 diyabetik ve 857 kontrol bireyinin bulunduğu populasyon temelli ve 59 aile (149 etkilenmiş, ve 83 etkilenmemiş bireyden oluşan) temelli bir araştırmada rs12255372, rs7903146, rs7901695 ve rs11196205 genotiplenmiş ve vaka kontrol grubunda rs7901695 (P=0.003), rs7903146 (P=0.00002) ve rs12255372 (P=0.000004) SNP'lerini; aile temelli örneklerde ise rs7901695 (P=0.01) ve rs7903146 (P=0.04) SNP'lerinin ilişkili olduğunu gözleyerek ve T2DM gelişiminde TCF7L2 gen polimorfizmlerinin yerini güçlendiren sonuçlar elde etmişlerdir (Mayans ve ark 2007).

Bir başka çalışmada, araştırıcılar 545 Meksika Amerikalısı SAFAD (San Antonio Family Diabetes Study) bireyinde (178'i diyabetik), 9 haplotip bloğundan 11 SNP'yi diyabet patogenezindeki rollerini araştırmak üzere genotipleyerek; 3 haplotip bloğundaki 4 SNP (rs10885390, rs7903146, rs12255372 ve rs3814573) ile Tip 2 diyabet, tanı yaşı ve 2.saat glukoz düzeyleri arasında nominal ilişki olduğunu saptamışlar (P=0.001-0.005) ve rs7903146 ve rs12255372 polimorfizmlerinin T2DM ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (P=0.03 ve 0.033). Aynı çalışmada, TCF7L2 ekzon 1'in yukarısında başka bir geniş haplotip bloğunda yerleşik SNP rs10885390, T2DM (P=0.002), tanı yaşı (P=0.014) ve 2.saat glukoz düzeyi (P=0.002) ile güçlü ilişkili bulunmuştur. İntron 4'de yerleşik diğer SNP de, T2DM (P=0.012), tanı yaşı (P=0.0003) ve 2.saat glukoz düzeyi (P=0.01) ile ilişkili bulunmuştur. Tanı yaşı analizi için sadece Tip 2 diyabetikler (n=178) değerlendirildiğinde ise SNP rs3814573'ün tanı yaşı ile ilişkili (P=0.005) olduğu görülmüştür (Lehman ve ark 2007).

Miyake ve ark (2008) 2 214 vaka ve 1 873 konrol Japon bireyde TCF7L2 genindeki 5 SNP'yi analiz ederek rs7903146, rs12255372 ve rs11196205'in risk allelleri ile hastalık arasındaki ilişkiyi teyit eden sonuçlar bildirmişlerdir. Yaş, cinsiyet ve vücut kitle indeksi de göz önüne alındığında da ilişkinin hala anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Bir başka Japon populasyonda da, Avrupa toplumuyla kıyaslandığında risk alleli frekansı daha düşük saptanmasına rağmen, rs122553372

en güçlü ilişkili olmak üzere rs7903146, rs7901695 ve rs11196205 polimorfizmleri de hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Hayashi ve ark 2007)

Duan ve ark (2007), iki ayrı gruptan toplam 1 080 Fransız Kanadalısı koroner arter hastası bireylerde obezite ve rs12255372'nin T2DM'ye yatkınlık oluşturmada birlikte etkisini araştırdıkları çalışmalarında; TCF7L2 genindeki polimorfizmlerin ($P<0.0001$) ve obezitenin ($P<0.001$) her ikisinin de artmış T2DM riskiyle ilişkili olduğunu göstermişler ve obez olmayan bireylerdeki genetik ilişkinin çok daha güçlü olduğunu ve rs12255372 TT genotipinin azalmış VKİ ($P<0.0481$) ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Parra ve ark (2007), atasal, cinsiyet, yaş, vücut kitle indeksi ve eğitimi kapsayan bir lojistik regresyon modeli kullanarak Meksikalı Tip 2 diyabet ve kontrol bireylerinde yaptıkları çalışmada, TCF7L2 geninin 3.intronundaki DG10S478 mikrosatelliti ve sırasıyla intron 4 ve 3'deki 2 SNP (rs12255372, rs7903146)'yi analiz etmişler ve rs12255372 ile DG10S478 arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu fakat rs7903146 ile hastalık riski arasında ilişkinin anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir.

Moczulski ve ark (2007), Polonyalı 290 Tip 2 diyabetik ve 195 sağlıklı bireyde rs7903146'nın TT homozigot olması durumunda T2DM ile ilişkili olduğunu tespit emişlerdir.

Chandak ve ark (2007), Güney Asya Hintlilerinden 955 T2DM'li ve 399 kontrolde yaptıkları çalışmalarında TCF7L2 gen polimorfizmlerinin T2DM riski ile çok güçlü ilişkili olduğunu ve TCF7L2 varyantının Hindistan populasyonunda bugüne kadar T2DM ile ilişkilendirilen en önemli ve en güçlü genetik faktör olduğunu belirtmişlerdir.

Rees ve ark (2008), Güney Asyalı 831 T2DM'li kişi ve 437 T2DM'li olmayan bireyde TCF7L2 geni rs7901695, rs7903146, rs11196205 ve rs12255372 SNP'lerini genotiplemişler ve tüm SNP'lerin risk allellerinin Tip 2 diyabetle ilişkili olduğunu, rs7903146 varyantının ise diğer varyantlardan daha kuvvetli bir etki göstererek hastalık oluşumunu 1.3 (OR) kat arttırdığını (95 % CI: 1.11-1.56, $P=1.96 \times 10^{-3}$) saptamışlardır.

Ezzidi ve ark (2009) Tunusdan Arap bireylerin oluşturduğu bir populasyonda rs7903146 risk alelinin T2DM'ye yatkınlığı artırdığını (OR=1.25 [1.06-1.47], P=0.006) ve TT genotipi taşıyıcılarında riskin, CC homozigotlarla kıyaslandığında 56% daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Potapov ve ark (2010) ise 588 diyabetik 597 sağlıklı Rus bireyde yaptıkları analizde rs12255372 T allelinin yüksek T2DM riski ile ilişkili (OR:1.37) olduğunu rapor etmişlerdir.

Cruz ve ark (2010), Meksika populasyonunda çalışmışlar ve TCF7L2 rs12255372 ve rs7903146 gentotiplerinin T allellerinin (OR=1.78, P=0.002 ve OR=1.76, P=0.001, sırasıyla) T2DM ile çok güçlü ilişkili olduklarını göstermişlerdir. Farklı iki bölgeden Meksikalılarla yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Martınez-Gomez ve ark 2011).

TCF7L2 varyantları ve T2DM arasındaki anlamlı ilişki Hindistan orijinli Asyalılar (Humpries ve ark 2006, Bodhini ve ark 2007) ve Pakistanlı (Rees ve ark 2011) populasyonlarda da gösterilmiştir.

İran populasyonundaki iki çalışmada da (Amoli ve ark 2010, Palizban ve ark 2012), Arap populasyonunda yapılan önceki çalışmaların (Alsmadi ve ark 2008, Saadi ve ark 2008) aksine rs7903146'nın İran populasyonunda da T2DM yatkınlığını belirleyen önemli bir varyant olduğu gösterilmiştir. Palizban ve ark (2012)'nın çalışmalarında İranlılarda risk allelini homozigot taşıyanlarda T2DM riskinin, hiç risk alleli taşımayanlara kıyasla 4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Chang ve ark (2007), 1 520 Han Çinlisi populasyonunda TCF7L2 genindeki 20 SNP'yi genotipleyerek, rs290487 dışındaki diğer varyantlar ile T2DM arasında herhangi bir ilişki bulmadıklarını rapor etmişlerdir.

Ng ve ark (2007), T2DM'li Hong Kong Çinlilerinde TCF7L2 genindeki yerleşik 22 SNP'nin analizini yaptıkları vaka kontrol çalışmalarında; daha önce Hayashi ve ark (2007)'nın bir Japon populasyonunda tanımladıkları rs11196205'in C risk alleli ile hastalık arasında bir ilişki olduğunu tekrarlamışlar ve rs7903146 ile ise anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

Ren ve ark (2008), 100 Çinli T2DM hastasında yeni varyantlar bulmak amacıyla TCF7L2 geninin tüm ekzonları ve intron ekzon bağlantılarını direk sekanslama yoluyla analiz ettikleri çalışmada, yeni buldukları bir SNP (c.1,637 C>A) ile bilinen 4 SNP'yi (rs7903146, rs12255372 ve rs290487 ve rs3814573) 1.000 Çinli bireyde genotiplemişlerdir. TCF7L2'nin kodlanan (ekzon) bölgelerindeki SNP'ler ile T2DM arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır. Diğer populasyonlarda anlamlı ilişkili rapor edilen intronik SNP'ler ise Çinli kadınların bir alt grubunda gözlenmiştir.

Kuzeydoğu Çin (Harbin Çinlileri) populasyonundan bir grupta yapılan çalışmada rs290487 T alleli hastalığa yatkınlıkla ilgili anlamlı şekilde ilişkili bulunurken (P=0.039), rs11196218 and T2DM arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (Qiao ve ark 2012).

rs12255372, rs7903146, rs7901695 ve rs11196205 SNP'lerin risk allellerinin Kafkas (beyaz ırk) ırkında, kuzey Afrikalılarda, Afrika ve Hindistan populasyonlarında Doğu Asya populasyonlarına nazaran daha yüksek frekansa sahip olduğu görülmüştür (Tong ve ark 2009).

Avrupa toplumunda oldukça yaygın ve T2DM ile ilişkili olduğu bildirilen SNP'lerin aksine ve 2 Japon grupta bu ilişki bildirilmesine rağmen; Asya populasyonlarında farklı SNP'ler özellikle rs290487, rs1196218 ve rs3814573 ilişkili olarak göze çarpmaktadır. Bu durum olasılıkla, Asya ve Çin populasyonları üzerinde etkili olan farklı evrimsel güçler nedeniyle diğer yaygın risk allellerinin, Asya ve Çin populasyonlarına özgü olmasından dolayıdır.

TCF7L2 gen polimorfizmlerinin, T2DM ile herhangi bir ilişkisinin olmadığını belirten yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır. Bunlardan, Tayvanlı 425 diyabetik ve 500 sağlıklı kontrolün bulunduğu grupta yapılan analizde rs12255372 ve rs7903146 polimorfizmlerinin oldukça nadir olduğu bildirilirken (Tsao ve ark 2009), Avrupalı olmayan 4 grupta Çinliler (Chang ve ark 2007); Pima yerlileri (Guo ve ark 2007) ve Suudi bireylerde (Alsmadi ve ark 2008) TCF7L2 varyantları (rs12255372 ve rs7903146) ve önceki iki çalışmanın (Horikoshi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2007) aksine bir Japon populasyonda (Iwata ve ark 2012) rs7903146 ile T2DM arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı gösterilmiştir.

TCF7L2 geninin T2DM ile ilişkisinde risk allelleri bakımından özellikle Asya populasyonlarında farklılıklar görülmesi; T2DM'nin heterojen bir hastalık olması, ırksal ve çevresel farklılıklar göstermesi nedeniyle farklı gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, ilişkili olduğu bildirilen diğer SNP'lerin de çalışılması bu populasyonlarda da farklı sonuçlar elde edilmesine neden olabilir.

Çalışmamızda TCF7L2 genindeki SNP'lerden tüm populasyon ve metaanaliz çalışmalarında hastalık gelişimine etkileri bakımından en çok çalışılan intron 3'deki rs7901695 ve rs7903146 ile intron 4'deki rs11196205 ve rs12255372, rs11196213 ve rs3814573 varyantlarını 169 diyabetik ve 119 sağlıklı kontrol bireyinde genotipledik. Bizim populasyonumuzda, bu konuda yapılan çalışmaların büyük kısmıyla uyumlu

olarak rs12255372 G>T (OR:2.1 [95% CI: 1.25-3.55] P=0.002) ve rs7903146 C>T (OR:1.9 [95% CI: 1.15-3.19] P=0.005) dönüşümlerinin Tip 2 diyabet ile güçlü şekilde ilişkili olduğu tespit edildi. Odds oranlarının da (1.9 ve 2.1) literatüre kıyasla daha yüksek olduğu, 36 farklı gruptan gelen populasyon verilerinin değerlendirildiği metaanaliz çalışmasının rs7903146 ve rs12255372 (1.9 ve 1.8 sırasıyla) için hesaplanan odds oranları ile ise benzer olduğu görülmüştür.

Çalışma sonuçlarımız, en çok beyaz Avrupalılarda, ayrıca Batı Afrikalılar, Meksika ve Afrika kökenli Amerikalılar, Hintliler ve Japon populasyonlarında yapılan ilişki çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Bu populasyonlarda bildirildiği gibi bizim populasyonumuzda da; rs7903146 ve rs12255372 SNP'leri için "T" alleli bağımsız bir risk faktörü olarak tespit edilmiştir.

İlişki çalışmalarının yanı sıra, TCF7L2 polimorfizmleri, T2DM'nin önemli fenotipik belirteçleri olan açlık insülin ve açlık glukoz düzeyleri ile HbA1C ve İnsülin direnci (HOMA-IR) üzerine etkileri bakımından da analiz edilmiştir.

Melzer ve ark (2006), 65 yaş altı 944 bireyde yaptıkları çalışmada, TCF7L2 rs7903146 varyantının yüksek açlık glukozu T alleli varlığına göre artan şekilde [ortalama açlık glukozu; TT grubunda 5.31 mmol/L, CT grubunda 5.19 mmol/L ve CC grubunda 5.08 mmol/L]), daha düşük insülin ve HOMA-IR düzeyleri ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada ilginç şekilde rs7903146'nın T allelinin lipid risk profili açısından koruyucu olduğunu ve T alleli taşıyan diyabetik hastaların daha az düzeyde metabolik sendrom özelliklerine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda; rs7901695, rs11196205, rs12255372,rs11196213 ve rs3814573 risk allellerinin ise açlık insulin, açlık glukoz, HbA1c ve HOMA-IR düzeyleri ile ilişkili olmadığı gözlendi. rs7903146 C>T dönüşümü ise yüksek açlık glukoz düzeyleri ile oldukça anlamlı şekilde ilişkili bulundu (P= 0.003).

Freathy ve ark (2007), doğum ağırlıklarını değerlendirerek yaptıkları farklı çalışmalarında TCF7L2'nin insülin salgılanmasının düzenlenmesindeki rollerine dair literatüre katkı yapmıştır. Bu retrospektif araştırmada, 6 çalışmadan 15 709 birey ve 3 çalışmadan 8 344 annede rs7903146 varyantını genotiplemişler ve T2DM risk allellerinin her bir fetal kopyasının doğum ağırlığında 18 g'lık artışla (P=0.001) ilişkili olduğunu ve her bir maternal kopyanın da bebek doğum ağırlığındaki 30g'lık artışla ($P=2.8x10^{-5}$) ilişkili olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 10 314 diyabetik olmayan bireyde, diyabetle ilişkili fenotipleri de analiz etmişler ve doğum ağırlığı

artışındaki mekanizmanın, T risk allelinin varlığının maternal insülin salgılanmasını azaltması olduğunu ve bu durumun gebelikte maternal kan glukoz seviyelerinde artışa ve dolayısıyla bebek doğum ağırlığında artışa neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Shaat ve ark (2007) İskandinav bireylerden oluşan populasyonlarında Tip 2 diyabet ile ile ilişkili olduğu gösterilen farklı polimorfizmlerin GDM (Gestayonel Diabetes Mellitus) riskine etkilerini araştırmışlar ve yalnızca rs7903146 polimorfizminin GDM ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu ve T/T genotipini taşıyan kadınlarda riski 2 kat daha artırdığını göstermişlerdir. Freathy ve ark (2010) da rs7903146 polimorfizminin, Avrupa kökenli gebe kadınlarda (birleşik krallık ve Avustralya) ve Güneydoğu Asya kökenli (Tayland) gebe kadınlarda GDM ile ilişkili olduğunu destekleyen benzer sonuçlar bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine; Klein ve ark (2012) 24 - 28 haftalık gebe, GDM'li ve normal glukoz toleransına sahip 1800 beyaz kadında, rs12255372 ve rs7903146 değişimlerini genotipleyerek yaptıkları çalışmalarında; rs12255372 risk allellinin homozigot genotipinin (T/T) beyaz ırk kadınlarında GDM için bağımsız bir risk faktörü (OR=7.7, 95% CI:1.71–34.60) olduğunu, rs7903146 (T/T)'nın ise herhangi bir ilişkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

TCF7L2 polimorfizmlerinin T2DM ile ilişkisi tartışmasız birçok şekilde ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, farklı populasyonlarda TCF7L2 risk varyantının, toplum sağlığı üzerindeki önemini etkileyecek olan allel frekansında farklılıklar da bulunmuştur (Weedon 2007).

Marquezine ve ark (2008), koroner kalp hastası olduğu bilinen 560 Brezilyalı bireyde rs7903146'nın T alleli varlığının, bu bireylerde 1.5 kat artmış T2DM riski ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada Güneydoğu Brezilya'dan 144 bireyi içeren genel populasyonda da TCF7L2 rs7903146 varyantının risk etkisini araştırmışlar ve genotip prevelansını CC için %43.4 (n=614), CT genotipi için %46.6 (n=660) ve TT genotipi için %10.0 (n=142) olarak gözlemişlerdir. Gruptaki diyabetik (%12.1) ve diyabetik olmayan (%9.9) bireylerde genotip prevalansında çok az bir farklılık bulunduğunu ancak bunun istatistiksel önemde olmadığını saptamışlardır.

Melzer ve ark (2006), 65 yaş üstü genel poulasyonda yaptıkları çalışmada, rs7903146 gentip sıklıklarını tüm bireylerde CC için %42, CT için %47 ve TT için %12, diyabetli grupta ise sırasıyla %39, %57 ve %17 olarak gözlemişlerdir. Marquezine ve ark (2008) Breziyalda gerçekleştirilen MASS II çalışmasında CC, CT

ve TT genotip sıklıklarını T2DM'li grupta sırasıyla %22, %61.3 ve %16.8, T2DM'li olmayan grupta ise sırasıyla %31.1, %59.6 ve %9.3 olarak bildirmişler ve gruplar arasında istatistiksel farklılık (P=0.0034) olduğunu saptamışlardır.

Hayashi ve ark (2007)'nın çalışmasında rs12255372 GG, GT ve TT genotip sıklıkları T2DM'li grupta sırasıyla %92.9, %6.9 ve %0.2 ve kontrol grubunda sırasıyla %95.7, %4.3 ve %0.0 olarak; rs7903146 için ise CC, CT ve TT genotiplerini T2DM'li grupta sırasıyla % 89.6, %10.2 ve %0.2 ve kontrol grubunda sırasıyla %91.8, %8.0 ve %0.2 olarak bildirilirken; Mayans ve ark (2007) rs12255372 GG, GT ve TT genotip sıklıklarını T2DM'li grupta sırasıyla %55.2, %40.2 ve %4.6 ve kontrol grubunda sırasıyla %64.4, %30.0 ve %3.6 ve rs7903146 CC, CT ve TT genotip sıklıklarını T2DM'li grupta sırasıyla %54.9, %38.6 ve %6.6 ve Kontrol grubunda sırasıyla %64.9, %30.9 ve %4 olarak gözlemişler ve rs790316 ve rs12255372 varyantlarının her ikisinin de risk allellerinin T2DM'li grupta kontrol grubuna kıyasla (sırasıyla $P=3.10^{-5}$ ve $P=2.10^{-5}$) daha yüksek oranda izlendiğini bildirmişlerdir.

Potapov ve ark (2010)'nın Rus populasyonundaki çalışmalarında rs12255372 GG, GT ve TT genotiplerinin görülme sıklığı ise sırasıyla T2DM'li grupta %62.4, %33.5 ve %4.1 ve kontrol grubunda ise %70.5, %26.8 ve %2.7 olarak gözlenmiştir.

Bizim populasyonumuzda ise; rs7903146 CC, CT ve TT genotip sıklıkları T2DM'li grupta %34,2, %54,76 ve %10,71 ve kontrol grubunda %47,5, %39,16 ve %13,33; rs 12255372 için ise GG, GT ve TT genotip sıklıkları T2DM'li grupta %42,85, %38,69 ve %18,45 ve kontrol grubunda %27,5, %46,78 ve %25,68 olarak belirlenmiştir.

Diğer SNP'ler değerlendirildiğinde ise; rs7901695 TT, CT ve CC genotipleri T2DM'li grupta %29,76, %48,8 ve %21,43 kontrol grubunda ise %24,11, %55,33 ve % 20,53; rs11196205 GG, GC ve CC genotipleri T2DM'li grupta %11,25, %55,62 ve %33,12 kontrol grubunda %14,68 %49,54 ve %35,77 olarak gözlenirken; rs11196213 CC, CT ve TT genotipleri T2DM'li grupta %35,21, %51,40 ve %13,38 ve kontrol grubunda %20,95, %65,71 ve %13,3 ve rs3814573 CC, CT ve TT genotipleri T2DM'li grupta %38,31, %43,5 ve %18,18 ve kontrol grubunda ise %46,36, %39,09 ve %14,54 olarak belirlenmiştir.

Literatürde, çalıştığımız SNP'lerle ilgili yaygın allellerin görülme sıklıklarının genel olarak heterozigot ve homozigot nadir allellere kıyasla dikkat çekici bir biçimde yüksek olduğu izlenmiştir. Bizim çalışmamızda, hem diyabetik hem de

kontrol gruplarında nadir ve özellikle heterozigot allel sıklığı, yaygın allellere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak buna rağmen rs7901695, rs11196205, rs1196213 ve rs 3814573 genotiplerinin sıklığı bakımından çalışma grupları arasında bir farklılık bulunmamıştır. Heterozigot allel sıklıklarının bizim populasyonumuzda daha yüksek frekansta görülüyor olmasının, coğrafi konumumuzun tarihsel önemi ve göç yolları bakımından merkezi bir konumda bulunmasının neden olduğu genetik çeşitlilikten kaynaklanıyor olabileceğini ve bu nedenle izole toplumlarla kıyaslandığında heterozigot genotip sıklıklarının farklılık gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Günümüze kadar gerçekleştirilen GWA ve ilişki çalışmaları sonucunda, T2DM genetiğinde rolü olduğu düşüncesiyle değerlendirilen genlerin büyük çoğunluğu, ayrıntıları hala net olarak bilinmeyen moleküler mekanizmalar yoluyla β-hücre fonksiyonunu etkilemektedirler. Bununla birlikte, birçok çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; bu genlerin bir grubunun glukoz-uyarıcılı insülin salınımını, bir grubunun inkretin-uyarıcılı insülin salınımını (inkretin duyarlılığı ya da salınımı) ve bir grubunun da proinsülinden insüline dönüşümü etkileyerek T2DM'ye neden olduğu gösterilmiştir (Schäfer ve ark 2011).

Tanımlanmış olanlar içindeki en önemli Tip 2 diyabet risk geni olan TCF7L2 ise, bu üç mekanizma ile de çakışmaktadır (Schäfer ve ark 2011). Ancak, TCF7L2 geninin T2DM gelişim sürecindeki rolü henüz net değildir.

Yapılan kapsamlı çalışmalarda, TCF7L2 gen polimorfizmlerinin farklı etnik gruplarda T2DM ile olan ilişkisinin belirlenmesinin yanı sıra Wnt sinyal yolunun bir bileşeni olarak pankreatik ve intestinal endokrin hücrelerdeki fizyolojik fonksiyonlarının moleküler mekanizmalarının da ortaya koyulması hedeflenmiştir (Lyssenko ve ark 2007, Liu ve Habener 2008, Shu ve ark 2008).

TCF7L2 varyantlarının T2DM riskini hangi yolla artırdığını açıklayabilmek için birçok hipotez ileri sürülmektedir. Mevcut çalışmalar ise, TCF7L2 gen varyasyonlarının insülin salgılanması ve insülin duyarlılığı üzerine etkileri ile ilgili çelişen sonuçlar ortaya koymaktadır.

Florez ve ark (2006), "Diyabet Korunma Programı"na dahil olmuş bozulmuş glukoz toleransına (BGT) sahip bireylerde; rs12255372 ve rs7903146'nın BGT'den T2DM'ye ilerleyişindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, rs7903146 T allellinin homozigot taşıyıcılarının, C allelini homozigot taşıyanlardan daha yüksek oranda BGT'den T2DM'ye dönüşüm ile ilşikili olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı

araştırıcılar, rs7903146 T alleli taşıcılarının CC homozigotlara kıyasla anlamlı şekilde daha düşük insülin salgılanmasına sahip olduklarını göstermişler ve buna göre TCF7L2 risk genotiplerini; insülin cevabından ziyade, azalmış insülin salgılanması ile ilişkilendirmişlerdir.

Saxena ve ark (2006) ise rs7903146'nın risk alleli için homozigot bireylerin insülinojenik indeksinde (P=0.003) ve insülin dispozisyon indeksinde (P=0.004) yaklaşık %50 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer çalışmalarda her bir allel için eklemeli (additif) etkinin genel olarak, insülin direnci ölçümlerinden ziyade insülin salgılanması ölçümlerinde görüldüğünü bildiren benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Cauchi ve ark 2006, Loos ve ark 2007, Marzi ve ark 2007).

Lyssenko ve ark (2007), 22 yıl takip edilmiş olan İskandinav bireylerde yaptıkları aile–temelli ve populasyon-temelli çalışmada rs7903146'nın CT/TT genotiplerinin gelecekte ortaya çıkacak T2DM riskinin belirteçleri olduğunu rapor ettiler. Yine bu gruptan İsveçli ve Finlandiyalı bireylerde yapılan kapsamlı metabolik çalışmalar ile; T risk alenin bozulmuş insülin salgısı ve hepatik glukoz üretimindeki artış ile ilişkili olduğunu gösterdiler. Tip 2 diyabette, özellikle TT genotipi taşıyıcılarında, insan pankreas adacıklarında TCF7L2'nin ifadesinin 5 kat arttığını gözlemlediler ki bu durum insan adacıklarında TCF7L2 ifadesinin aşırı artması sonucu, glukoz-uyarıcılı insülin salgılanmasının azalması ile sonuçlanmaktadır.

TCF7L2, Wnt sinyal yolunun içinde bir transkripsiyon faktörüdür ve her dokuda ifade edilir. Lyssenko ve ark (2007); önceki çalışmaları (Florez ve ark 2006, Saxena ve ark 2006, Freathy ve ark 2007 ve Loos ve ark 2007) teyit ederek; T2DM'ye gidişin azalmış insülin aktivitesinden ziyade, azalmış insülin salgılanmasının sonucu olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu, pankreatik beta hücrelerini, TCF7L2'nin değişmiş aktivitesinin neredeyse en önemli hücre hedefi haline getirmiştir. Bununla birlikte bu sonuç, oldukça fazla tekrarlanmış olan önceki hipoteze zıttır. Bu hipoteze göre, risk genotipi, intestinal TCF7L2 aktivitesini değiştirerek indirekt yolla insülin salgılanmasını değiştirmektedir. İntestinal TCF7L2 aktivitesinin değişmesi, inkretinlerin, glukagon intestinal peptidin (GIP) ve glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1)'in salgılanmasını azaltmaktadır. Bu azalma da insülin salgılanmasını değiştirmektedir.

Yi ve ark (2005), TCF7L2'nin intestinal proglukagon gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ve intestinal endokrin L hücrelerde GLP-1'in üretiminde iş gördüğünü göstermişlerdir. Grant ve ark (2006), TCF7L2 varyantlarının T2DM ile güçlü

ilişkisini buldukları çalışmalarında bu gen polimorfizmlerinin, inkretin hormon GLP-1'in üretimini ve dolayısıyla buna bağlı insülin salgılanmasını etkilemek yoluyla T2DM riskini artırabileceğini öne sürmüşlerdir. Birkaç çalışmada da; TCF7L2'nin insan pankreatik adacıkları ve rat pankreatik adacık β-hücre hattı Ins-1'de de insan adipositlerinde olduğu kadar ifade edildiği gösterilmiştir (Lyssenko ve ark 2007, Ahlzen ve ark 2008, Shu ve ark 2008).

TCF7L2'nin insülin salgılanmasının azalması ile olan ilişkisi henüz tam anlaşılabilmiş değildir. TCF7L2 kolorektal kanser gelişminde önemli bir faktördür ve TCF7L2 homozigot knock-out farelerde epitelyal kök hücre kompartımanında kayıp olduğu ve farelerin doğumdan yaklaşık 24 saat sonra öldüğü gözlenmiştir. Bu defektin, enteroendokrin hücrelerden GLP-1 salgılanmasının azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Alternatif olarak ise; Wnt sinyal yolunun bir parçası olan TCF7L2'nin, pankreas ve adacıkların embriyonik gelişimi, beta hücre kütlesi üzerine etkisi, pankreatik beta hücre gelişimi ve/veya beta hücre fonksiyonu için de kritik olan Wnt yolunun bir efektörü olarak da insülin salınımını etkiliyor olabileceği düşünülmektedir (Weedon 2007).

Lyssenko ve ark (2007), Tip 2 diyabetik ve diyabetik olmayan insan kadavralarından dikkatlice pürifiye ettikleri pankreatik adacıklarında yaptıkları ifade çalışmasında, daha önceki ifade çalışmalarının aksine diyabetik adacıklarda TCF7L2 ifadesinin azalmasından ziyade 5 kat daha fazla artmış olduğunu gözlemişlerdir. Bu bulgulara göre; risk allelinin varlığı, pankreatik β-hücresinde TCF7L2 geninin ekspresyonunda aşırı artışa neden olarak pek çok farklı uyarana karşı cevap olan insülin salınımını azaltmaktadır. Azalmış insülin salınımı artmış hepatik glukoz üretimini açıklamaktadır (Damcott ve ark 2006, Saxena ve ark 2006, Chandak ve ark 2007, Hattersley 2007, Lyssenko ve ark 2007).

Öte yandan Elbein ve ark (2007) TCF7L2 gen varyasyonunun insülin salgılanması ile değil, azalmış glukoz toleransı ve insülin duyarlılığı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

TCF7L2 risk varyantlarının, periferal dokularda trigliserid depozisyonuna öncülük eden adiposit disfonksiyonu ile ilişkili olabileceği ve bu ilişkinin insülin direncine neden olabileceği hipotezi ileri sürülmektedir. Damcott ve ark (2006) (Kafkasyalılarda) ve Chandak ve ark (2007) (Doğu Asya Hintlilerinde) yaptıkları çalışmalar ile TCF7L2 varyantlarının artmış insülin direnci ile ilişkili olduğunu bildirerek bu hipotezi desteklemektedirler.

Çalışmaların çoğunluğunda insülin salgılanmasının risk genotipleri ile ilişkili olduğu görüşü hakimken; TCF7L2 varyantlarının hem insülin salgılanması hem de insülin duyarlılığı ile ilişkili olduğunu ileri süren araştırmalar da bulunmaktadır. Örneğin; Damcott ve ark (2006), Amiş Aile Diyabet Çalışmasında yer alan 835 bireyde bu 4 SNP'yi genotiplemişler ve tip 2 diyabet, bozulmuş glukoz toleransı (BGT) ve normal glukoz toleransına (NGT) sahip bireylerde genotip frekanslarını karşılaştırmışlardır. Tip 2 diyabetikler, normal glukoz toleransına sahip olanlar ile karşılaştırıldığında rs7901695 (P=0.05) sınırda ilişkiliyken, Tip 2 diyabetik/BGT grubu birlikte NGT ile karşılaştırıldığında rs7901695 ve rs7903146 (P=0.008 – 0.01, sırasıyla) oldukça güçlü ilişkili, rs11196205 ve rs12255372 (P=0.07 ve P=0.04, sırasıyla) ise sınırda ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmanın eşliğinde, diyabetik olmayan 698 Amiş bireyde de bu SNP'leri genotiplemişler ve 3.saat oral glukoz testi boyunca Amiş bireylerde insülin ve glukoz düzeyleri ile herhangi bir ilişki bulmazken, intravenöz glukoz tolerans testi uyguladıkları Amiş olmayan ve diyabetik olmayan 48 bireyde rs7901695 ve rs7903146'nın insülin duyarlılığında azalma (P=0.003 ve P=0.005 sırasıyla) ve dispoziyon indeksi (P=0.04 ve P=0.007 sırasıyla) ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmalarında Damcott ve ark (2006) TCF7L2 varyantlarının hem insülin salgılanması hem de insülin duyarlılığı ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Loos ve ark (2007), İngiliz T2DM'li ve normal bireylerde yaptıkları çalışmalarında, rs7903146 risk allelli (T) ile açlık proinsülin düzeyleri ve proinsülin/insülin oranları arasında oldukça güçlü bir ilişki olduğunu saptamışlardır ($P=4.55x10^{-9}$). Buna göre, rs7903146 risk allellinin varlığının; proinsülinin insüline dönüşümünde iş gören faktörlerin PC1, PC2 ve/veya CPE'nin transkripsiyonlarını etkilemek yoluyla β-hücre proinsülinin işlenmesinde bozukluğa ve azalmış insülin salgılanması yoluyla T2DM'ye yatkınlığa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Proinsülin düzeyleri ve T2DM arsındaki bu ilişki sonraki başka çalışmalarla (Gonzalez-Sanchez ve ark 2008, Kirchhoff ve ark 2008, Stolerman ve ark 2009, McCaffery ve ark 2011) da tekrarlanmış ve da Silva Xavier ve ark (2009)'nın deney hayvanlarıyla yaptıkları çalışmalarında; TCF7L2 geninin sessizleştirilmesinin insülin vezikül trafiğini bozarak insülin salgılanmasını etkileyebileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda, rs12255372 G>T ve rs7903146 C>T dönüşümlerinin HOMA-IR değerleriyle ilişkili çıkmamış olması ve rs7903146 C>T dönüşümünün açlık

glukoz düzeyiyle güçlü düzeyde ilişki göstermesi bizi, bu polimorfik varyantların T2DM ile ilişkili risk etkilerini, insülin direncinden çok Lyssenko ve ark (2006)'nın gösterdiği şekilde, pankreastan insülin salgılanmasının etkilenmesi yoluyla T2DM geliştiği düşüncesine yakınlaştırmaktadır.

TCF7L2 varyantlarının (rs7903146) genel populasyondaki etkisini araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalar da risk allelinin diyabetik taşıyıcılarında, daha şiddetli β-hücre işlev bozukluğu ve daha fazla mikrovasküler komplikasyonlara sahip olduklarını ancak daha az metabolik sendrom özellikleri gösterdiklerini ve bu alleli taşımayan diğerlerine göre daha koruyucu bir lipid profiline sahip olduklarını ortaya koymaktadırlar (Cauchi ve ark 2006, Melzer ve ark 2006).

TCF7L2 risk etkisiyle ortaya çıkan diyabet, insülin salgılanmasında azalma ve pankreatik β-hücresinden çıkışı stimüle eden inkretin hormon GLP-1'in aktivitesinde bozulma ile beraberdir. Bu net bilgilerin yanında TCF7L2'nin diyabet patogenezine etkisini netleştirecek bir hipotez yoktur. TCF7L2 mRNA'sının alternatif kesimi oldukça karmaşıktır ve hangi kesim varyantının ve protein izoformlarının diyabet ile ilişkili olduğu bilinmemektedir. Ayrıca, TCF7L2 bir transkripsiyon faktörüdür ve çok sayıda gene bağlanmaktadır, fakat hangisinin diyabete neden olduğu açık değildir (The TCF7L2&Wnt Action Group).

Genetik varyasyonlar ekspresyon düzeylerini ve mRNA transkriptlerinin kesim mimarisini de etkiliyor olabilir (Graham ve ark 2006, Zhang ve ark 2008) . Bu nedenle birçok çalışmada, insan dokularında TCF7L2 mRNA ekspresyonu ve rs7903146 ile rs12255372 genotipleri arasındaki ilişki de test edilmiştir (Elbein ve ark 2007, Lyssenko ve ark 2007, Ahlzen ve ark 2008, Osmark ve ark 2009). Ancak bu çalışmalarda küçük hacimli örnek setleri ve az sayıda doku tipleri kullanılması önemli bir kısıtlama olarak düşünülmektedir (Prokunina-Olsson ve ark 2009).

Prokunina-Olsson ve ark (2009), 8 farklı insan dokusundan (pankreas, pankreatik adacıklar, bağırsak, karaciğer, monositler, iskelet kası, subkutanöz adipoz doku ve lenfoblastoid hücre hatları) elde ettikleri 380 örnekte çok sayıdaki TCF7L2 kesim formlarının mRNA ifadesini araştırdıkları çalışmalarında, TCF7L2 geninde dokuya özgü bir alternatif kesim paterni gözlemişler ve bunlardan bir kesim formunun sadece pankreatik adacıklar, pankreas ve bağırsağa özgü olduğunu, çalıştıkları diğer dokularda ise bulunmadığını saptamışlardır. Bu özgün formun ifadesinin, pankreatik adacıklarda glukoz uyarıcılı proinsülin ifadesi ile de ilişkili

olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, rs7903146 ve rs12255372 risk allelleri ile TCF7L2 kesim formları arasında bir ilişki olup olmadığını da test etmişler ve T2DM ilişkili bu risk varyantları ile alternatif kesim formları arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır.

Bir başka çalışmada; 100 sağlıklı beyaz bireyden elde edilen periferal kan mononukleer hücrelerinde TCF7L2 alternatif kesimi, gen ifadesi ve bunların rs12255372 ve rs7903146 SNP'leri ile ilişkisi çalışılmış; rs12255372 ve rs7903146 risk allellerini homozigot (TT/TT) taşıyan bireylerde TCF7L2 mRNA'sının hiç risk alleli taşımayanlara (GG/CC) kıyasla 2.6 kat daha fazla ifade edildiği ve TCF7L2 transkriptlerinin alternatif kesimlerininin risk genotiplerinden etkilenmediği gösterilmiştir (Pang ve ark 2012).

TCF7L2'nin T2DM ile ilişkili risk varyantlarının genin doku spesifik alternatif kesimini nasıl etkilediği ve T2DM riski ile olan ilişkisinin anlaşılabilmesi için daha büyük örnekli ve fazla sayıda fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, TCF7L2 risk varyantları, mRNA ekspresyonu ve alternatif kesim formları dışında, T2DM ile ilgili birçok farklı tipte moleküler mekanizmalar ile de ilişkili olabilir (Prokunina-Olsson ve ark 2009).

T2DM poligenik bir hastalık olduğu için tek bir gen ya da varyantın sorumlu tutulmasından ziyade diğer aday genlerin ve varyantların da çalışılarak birlikte kümülatif etkilerinin değerlendirilmesi daha anlamlı bir yaklaşımdır.

Weedon ve ark (2006), literatürde T2DM ile en çok ilişkilendirilen, KCNJ11 E23K, PPARG Pro12Ala ve TCF7L2 rs7903146 varyantlarının Tip 2 diyabet gelişimine birlikte etkilerini analiz etmek için yaptıkları çalışmada, bu üç varyantı 2 409 diyabetik ve 3 668 sağlıklı bireyde genotiplemişlerdir. Altı risk allelinin tümünü taşıyan Tip 2 diyabetiklerde odds oranını, hiç risk alleli taşımayanlara kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksek hesaplamışlardır.

Hastalıkla ilişkili genlerin ve ilişkili varyantların tanımlanabilmesinin en önemli kazancı, buna dayanarak hastalığın patofizyolojisini açıklayabilmek ve bu bilgi kullanılarak da tanı koyucu, koruyucu ve tedavi edici yöntemler geliştirebilmektir. Örneğin; İlaçların yan etkilerinin ve terapötik başarısızlığın her ikisinin de altında güçlü bir etkiyle genetik bileşenlerin yattığı düşüncesi bilinmektedir. Bu nedenle spesifik bir terapiye diğerlerinden daha iyi yanıt verebilecek bireylerin tespit edilmesi önemlidir. TCF7L2 risk genotipini taşıyan T2DM'li hastaların sülfonilürelerle tedaviye cevabının oldukça zayıf olduğu,

metformine ise hiç cevap vermedikleri saptanmıştır (Pearson ve ark 2007). Ayrıca, T allelinin homozigot taşıyıcıları, CC homozigotlara kıyasla oral ilaç ya da insülin tedavisine daha fazla gerek duymaktadırlar. Bu onların daha şiddetli bozulmuş beta hücre fonksiyonuna sahip olmalarının bir sonucu olarak düşünülmektedir (Lyssenko 2008).

Çalışma grubumuzun amacı, Konya ve çevresindeki T2DM hastalarında ilişkili gen ve gen ailelerinin taranması ve bu genler bakımından geniş tabanlı bir veri merkezi oluşturarak çalıştığımız genlerin T2DM gelişimi açısından birlikte risk etkilerine dair bilgiler edinebilmektir. Bu amaca yönelik olarak ilk kez insülin reseptör substrat-1 ve 2 (IRS-1 ve 2) genleri çalışılarak (Sağlık Bilimleri 2003/010 ve SBAG 105S306) çekirdek bir hasta grubu (Aksoy Hepdoğru 2006) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu çekirdek grubumuza yeni hasta ve kontroller ekleyerek sayımızı genişletme çalışmalarımız devam etmektedir. Oluşturduğumuz örnek grubunda, bugüne kadar; ATP bağımlı potasyum kanallarını (K_{ATP}) oluşturan SUR1 ve Kir6.2 proteinlerini kodlayan ABCC8 ve KCNJ11 genleri, Calpain-10 ve Adiponektin gen polimorfizmleri çalışılmıştır. Sunulan bu çalışmayla TCF7L2 gen polimorfizmlerine yönelik veriler de mevcut birikimimize ve literatüre eklenerek amacımıza önemli bir adım daha yaklaşmamızı sağlamıştır.

Çalışmamız TCF7L2'nin T2DM gelişimi ile ilgili olarak literatürde oldukça tutarlı şekilde tekrarlanan ilişkisini desteklemekte ve rs12255372 ile rs7903146 risk allellerinin Türk populasyonunda T2DM gelişiminin bağımsız risk faktörleri olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tip 2 diyabet, kalıtımsal ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu çok farklı yaş gruplarında ortaya çıkabilen poligenik bir metabolik hastalıktır. Monogenik hastalıklara kıyasla, klinik görünümü de daha karmaşık ve heterojendir.

T2DM'ye yatkınlık oluşturan genlerin açık bir şekilde tanımlanması ve hangi kalıtımsal özellikler ile ortaya çıktığının bulunması hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. T2DM patogenezinin aydınlatılması, diyabet ve ilişkili komplikasyonların gelişimi bakımından risk taşıyan bireylerin belirlenmesi ve genom-ilaç etkileşimlerinin tespit edilmesi yoluyla bireysel farklılıklar gözetilerek hastaların daha etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için önemli bilgiler sağlayabilir.

Çok büyük örnekli ve farklı etnik gruplardan gelen populasyon çalışmalarının sonuçları TCF7L2 ve T2DM ilişkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Ancak, çoğunlukla rs7903146 ve rs12255372 SNP'leri öne çıkmak üzere farklı varyasyonları da dahil olmak kaydıyla, farklı populasyonlarda, farklı TCF7L2 varyantları T2DM ile ilişkili olabilmektedir.

Bizim populasyonumuzda rs7903146 ve rs12255372 gen polimorfizleri T2DM ile oldukça ilişkili bulunan gen varyantlarıdır. Ayrıca, rs7903146 açlık glukoz düzeyleri ile önemli düzeyde ilişkili iken rs12255372 dönüşümünün etkisi istatistiksel önemde değildir. rs7901695, rs3814573, rs11196205 ve rs1196213 polimorfizmleri ise hastalık ya da HbA1c, açlık insülin ve açlık glukoz ve HOMA-IR fenotipleri ile ilişkili bulunmamıştır.

TCF7L2'nin oldukça karmaşık alternatif kesiminin ve dokulara özgü çok farklı protein izofromlarının bulunması, ve bir transkripsiyon faktörü olarak çok fazla sayıda genin ifadesini etkiliyor olması, Tip 2 diyabet patogenezindeki yerinin aydınlatılmasını oldukça güçleştirmektedir. Mevcut çalışmalarla birçok hipotez ileri sürülmekle birlikte, TCF7L2 ve T2DM arasındaki kuvvetli ilişkinin altında yatan moleküler mekanzimalar ile ilgili belirsizlik sürmektedir. Bu nedenle, TCF7L2 gen varyasyonlarının, gen ifadesinin, protein ürünlerinin ve insan dokularındaki fonksiyonunun net olarak anlaşılabilmesi ve doğrulanabilmesi için daha çok sayıda fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca, TCF7L2 geninin, önemli bir bileşen olarak iş gördüğü Wnt sinyal yolunun, pankreatik β-hücrelerinin embriyolojik gelişimi, proliferasyonu, sağkalımı ve fonksiyonu için kritik önemde olmasından dolayı; sinyal yolundaki Wnt

proteinleri, reseptörleri ve β-katenin gibi diğer üyelerin de T2DM ile ilişkilerinin değerlendirilmesi için çalışmalar yapılması da önerilebilir.

Ek olarak, bu çalışma TCF7L2 genindeki söz konusu 6 SNP'nin Türk toplumunda T2DM riski ile ilişkisinin ortaya konulmasına yönelik ilk çalışma olması bakımından da önem arz etmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya Bölgesinde Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında TCF7L2 (Transcription factor 7 like-2) Gen Polimorfizmlerinin Taranması ve Hastalık ile İlişkilerinin Ortaya Konulması

Dudu ERKOÇ KAYA
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi / KONYA-2012

Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) 21.yüzyılın en zorlu sağlık sorunlarından biridir ve endişe verici bir biçimde artmaktadır. Malesef Türk populasyonu da bu eğilimin dışında değildir. T2DM, birçok genetik ve çevresel faktörün etkileşimi sonucunda ortaya çıkan oldukça kompleks bir hastalıktır. Bugüne kadar T2DM yatkınlığı oluşturduğu düşünülen aday genler arasında, TCF7L2 (Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2) geni birçok farklı populasyon çalışmasının oldukça tutarlı sonuçları ışığında T2DM ile en güçlü ilişkilendirilmiş olan gendir. TCF7L2 geni, hücre büyümesi ve gelişiminin temel düzenleyicisi olan Wnt sinyal yolağında iş gören bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Wnt sinyalizasyonu endokrin pankreas gelişimini etkiler ve insülin salgılanması, sağkalım ve proliferasyon gibi olgun β-hücre fonksiyonlarını değiştirir. TCF7L2 geninin özellikle intron 3 (rs7903146 C>T) ve intron 4 (rs12255372 G>T) bölgelerinde yer alan tek nukleotid polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphism-SNP) T2DM riski ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. Biz de bu çalışmamızda TCF7L2 geninin Türk populasyonunda, T2DM riski ile ilişkisini ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamızda, TCF7L2 genindeki en yaygın altı polimorfizm (rs7903146 C>T, rs12255372 G>T, rs7901695 T>C, rs11196205 G>C, rs11196213 C>T ve rs3814573 C>T dönüşümleri) 169 diyabetik ve 119 sağlıklı bireyde genotiplendi. Tüm hasta ve kontrollerin açlık plazma glukoz, açlık insülin, Homa-IR, HbA1c ve c-peptid değerleri ölçüldü. Kontrol grubuna oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulandı. Genotiplendirme PZR-RFLP ve PZR-SSCP teknikleri kullanılarak yapıldı.

rs7901695 T>C, rs11196205 G>C, rs11196213 C>T ve rs3814573 C>T polimorfizmleri ile biyokimyasal parametreler ve genotip-fenotip frekanslarında hasta ve kontrol grupları açısından istatistiksel önemde bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Bununla birlikte, rs7903146 ve rs12255372 T2DM ile (OR:1.9 [95% CI: 1.15-3.19] p=0.005 ve OR:2.1 [95% CI: 1.25-3.55] p=0.002 sırasıyla) ve ayrıca rs7903146 açlık glukoz düzeyleri ile anlamlı şekilde ($p< 0.05$) ilişkiliydi.

Çalışmamızın sonuçları, rs12255372 ve rs7903146 polimorfizmlerinin hastalıkla ilişkisini bildiren önceki çalışmaları destekler yöndedir ve TCF7L2 geninin T2DM gelişiminde güçlü bir aday olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: SNP, TCF7L2 geni, Tip 2 Diabetes Mellitus, Wnt yolu.

7. SUMMARY

Screening of TCF7L2 (Transcription factor 7 like-2) Gene Polymorphisms and Its Association with Disease Among Type 2 Diabetes Mellitus Patients in Konya Region

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is the most challenging health issues of the 21st century and is associated with an alarming rise in the incidence. The Turkish population is no exception to this trend. T2DM is a complex disease which occur by the interaction of multiple genetic and environmental effects. To date, TCF7L2 gene has been shown to be the strongest association with an increased risk of T2DM with well-replicated results in several different populations. TCF7L2 gene encodes a transcription factor, involved in Wnt-signalling pathway, a major regulator of cell growth and development. Consequently, Wnt signaling influences endocrine pancreas development and modulates mature β-cell functions including insulin secretion, survival and proliferation. We aimed to investigate whether TCF7L2 also has a role in T2DM susceptibility in Turkish populations.

Genotyping was carried out by PCR-RFLP and PCR_SSCP techniques and six common variants (rs7903146 C>T, rs12255372 G>T, rs7901695 T>C, rs11196205 G>C, rs11196213 C>T and rs3814573 C>T substitutions) were genotyped in 169 diabetic and 119 healty individuals. Biochemical parameters and genotype-phenotype associations were tested statistically ($p<0.05$).

There was no difference in biochemical parameters and genotype-phenotype frequencies in case and controls for rs7901695 T>C, rs11196205 G>C, rs11196213 C>T and rs3814573 C>T ($p> 0,05$). However, rs7903146 and rs12255372 was significantly associated with T2DM (OR:1.9 [95% CI: 1.15-3.19] p=0.005 and OR:2.1 [95% CI: 1.25-3.55] p=0.002 respectively) and also, rs7903146 with fasting glucose levels ($p< 0.05$).

Our results for rs7903146 and rs12255372 are consistent with previous studies that reports the association between these SNPs and the disease and indicate that TCF7L2 might be a strong candidate for T2DM development.

Key words: SNP, TCF7L2 gene, Type 2 Diabetes Mellitus, Wnt pathway.

8. KAYNAKLAR

1. Aguilera O, Munoz A. DKK1 (dickopf homolog 1 (Xenopus laevis)). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2007:11:42.

2. Ahlzen M, Johansson LE, Cevrin C, Tornquvist H, Groop L, Riderstrale M. Exspression the transcription factor 7 like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is downregulated by insulin. Biochem Biophys Res Commun. 2008: 370:49-52.

3. Ahren B. Type 2 diabetes, insülin secretion and beta cell mass. Curr Mol Med. 2005:5(3):275-86.

4. Akçay G, Akçay MN, Akarsu E. Endokrin ve Metabolizma Hastalıkları. Erzurum, Aktif Yayıncılık. 2000;191-244.

5. Aksoy-Hepdoğru M. iç Anadolu Toplumunda Tip 2 Diabetli Hastaların IRS-1 ve IRS-2 Gen Çok Yapılılığının Taranması, (Doktora Tezi), Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya, 2006.

6. Alsmadi O, Al-Rubeaan K, Mohamed G, Alkaya F, Al-Saud H, Al-Saud NA, Al-Daghri N, Mohammad S and Meyer BF. Weak or no association of *TCF7L2* variants with Type 2 diabetes risk in an Arab population BMC Medical Genetics. 2008; 9:72.

7. Altuntas Y (2001). Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflanması. Her Yönüyle Diabates Mellitus, Ed: Yenigün M, Altuntas Y. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001;51-62.

8. American Diabetes Association (ADA). "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus", Diabetes Care. 2010:33:62-69.

9. American Diabetes Association (ADA). Clinical Practice Recommendations. Standarts of medical care. Diabetes Care.2009;32(suppl.1):13-69.

10. American Diabetes Association (ADA). Clinical Practice Recommendations. Diabetes Care. 2005; 32 (suppl-1) Nat Rev Genet 5(9):691- 701.

11. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus, Diabetes Care. 2008;31:Suppl 1, S55-60.

12. American Diabetes Association (ADA). Economic consequences of diabetes mellitus in the United States in 1997. Diabetes Care. 1998;21:296–309.

13. American Diabetes Association (ADA). Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2002 Diabetes Care. 2003;26 (3):917-932

14. Amoli MA, Amiri P, Tavakkoly-Bazzaz J, Charmchi1 E, Hafeziyeh J, Keramatipour M, Abiri M, Ranjbar SH and Larijani B. Replication of TCF7L2 rs7903146 association with type 2 diabetes in an Iranian population. Genetics and Molecular Biology. 2010; 33(3): 449-451.

15. Arslan M. Metabolik Sendrom Klavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2003;1-13.

16. Barraso I, Luan J, Middelberg R, Harding A, Franks P, Jakes R, Clayton D, Shafer AJ, Wareham JN. "Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved n β-Cell Function as Well as Insulin Action", PLoS Biology. 2003 1:41-55.

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

18. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosshedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature. 1996;382:638-642.

19. Bhatia V. IAP National Task Force for Childhood Prevention of Adult Diseases. IAP National Task Force for Childhood Prevention of Adult Diseases: insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus in childhood. Indian Pediatr. 2004;41(5):443-57.

20. Bodhini D, Radha V, Dhar M, Narayani N, Mohan V. The rs12255372(G/T) and rs7903146(C/T) polymorphisms of the TCF7L2 gene are associated with type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. Metabolism Clinical and Experimental. 2007;56: 1174–1178.

21. Bradley RS, Brown AM. The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. EMBO J. 1990;9:1569-75.

22. Brantjes H, Roose J, van de Wetering M and Clevers H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-represors. Nucleic Acid Res. 2001;29: 1410-1419.

23. Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Type 2 diabetes mellitus. Williams Textbook of Endocrinology, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky K, Larsen PR. Elsevier, Philadelphia, 2008;1329-89.

24. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. J Cell Sci. 2006;119 (Pt3):395-02.

25. Carmelli D, Cardon LR, Fabsitz R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments, Am J Hum Genet. 1994;55: 566–573.

26. Caro JJ, Ward AJ, O'Brien JA. Lifetime costs of complications resulting from type 2 diabetes in the U.S. Diabetes Care. 2002;25(3):476-81.

27. Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R et al. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes invarious ethnic groups: a global meta-analysis. J Mol Med. 2007;85:777–782.

28. Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, Marre M, Balkau B, Froguel P. TCF7L2 varyant predicts hyperglycemia incidence in a French general population: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) Study. Diabetes. 2006;55:3189-3192

29. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT et al. Common variants in the TCF7L2 gene arestrongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indianpopulation. Diabetologia. 2007;50: 63–67.

30. Chang YC, Chang TJ, Jiang YD et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. Diabetes. 2007;56:2631-2637.

31. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008;40(7):577-94.

32. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Employing new cellular therapeutic targets for Alzheimer's disaease: a change for the beter? Curr Neurovasc Res. 2005;2(1):55-72.

33. Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. Development. 2007;134(1):3-12.

34. Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. Diabetes Metab Res Rev. 2010;26: 261–270.

35. Çorakçı A, Azal Ö, Beyhan Z. Dibetes Mellitus'ta Oral Ajan Tedavisi. Editör: İmamoğlu Ş. Yardımcı editör: Özyardımcı Ersoy c. Diabetes Mellitus. Gözden geçirilmiş ve genişletilmiş 2. baskı. İstanbul, Deomed. 2009;138-175.

36. da Silva Xavier G, Loder MK, McDonald A, Tarasov AI, Carzaniga R, et al. TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells. Diabetes. 2009;58: 894–905.

37. Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD et al. Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with Type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. Diabetes.2006; 55: 2654–2659.

38. Das KW, Elbein SC. The genetic basis of Type 2 Diabetes. Cellscience.2006;2(4):100-131.

39. De Ferranti SD, Osganian SK. Epidemiology of paediatric metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Diab Vasc Dis Res. 2007;4 (4):285-96.

40. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard (DGIBIH), MIT, Lund University and Novartis Institutes for BioMedical Research. Genome-wide association analysis identifies loci for Type 2 diabetes and triglyceride levels. Science. 2007;316: 1331–1336.

41. Donma MM, Donma O. Wnt signaling pathway in cardiovascular and other clinical diseases: Review. Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci. 2010;22:93-103.

42. Donovan DS. Epidemiology of diabetes and its burden in the World and in the United States. Principles of Diabetes Mellitus. Ed: I. Poretsky, Dordrecht, London, kluwer Academic Publishers. 2002:107-21.

43. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. Cell Metab. 2008;8(3):186-200.

44. Dorman HJ, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiacae species grown in Turkey. J.Agric Food Chem. 2004;25:52(4):762-70.

45. Duan QL, Dubé MP, Frasure-Smith N, Barhdadi A, Lesperance F, Théroux P, St-Onge J, Rouleau GA, McCaffery JM. Additive effects of obesity and TCF7L2 variants on risk for type 2 diabetes among cardiac patients. Diabetes Care. 2007 Jun;30(6):1621-3.

46. Duval A, Rolland S, Tubacher E, Bui H, Thomas G, Hamelin R. The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. Cancer Res. 2000;60(14):3872-3879.

47. Eftychi C, Howson JMM, Barrat BJ, Vella A, Payne F, Smyth DJ, Twells RCJ, Walker NM, Rance HE, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-TirgoviÇte C, Savage DA, Todd JA. Analysis of the type 2 diabetes-associated single nucleoide polymorphisms in the genes IRSI, KCNJ11, and PPARG2 in type 1 diabetes. Diabetes. 2004;53(3):870-3.

48. Elbein SC, Chu WS, Das SK, Yao Borengasser A, Hasstedt SJ, Wang H, Rasouli N, Kern PA. Transcription factor 7 like 2 polymorphisms and type 2 diabetes, glucose homeostasis traits and gene expression in US participants of European and African descent. Diabetologia. 2007;50(8):1621-1630

49. Elbein SC. Evaluation of polymorphisms known tocontribute to risk for diabetes in African and African-American populations. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007;10:415–419.

52. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2004;22: 849–860.

53. Ezzidi I, Mtiraoui N, Cauchi S, Vaillant E, Dechaume A, et al. Contribution of type 2 diabetes associated loci in the Arabic population from Tunisia: a case-control study. BMC Med Genet. 2009;10:33.

54. Fang M, Li J, Blauwkamp T, Bhambhani C, Campbell N. And Cadigan KM. C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila. EMBO J. 2006;25:2735–2745.

55. Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabtes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits (review). Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003; 4:257-91.

56. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PIW, Shuldiner AR et al. The Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. N Engl J Med. 2006; 355: 241–250.

57. Florez JC. The new type 2 diabetes gene TCF7L2. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2007;10:391–396.

58. Freathy RM, Hayes MG, Urbanek M, Lowe LP, Lee H, Ackerman C, Frayling TM, et al. HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: common genetic variants in GCK and TCF7L2 are associated with fasting and postchallenge glucose levels in pregnancy and with the new consensus definition of gestational diabetes mellitus from the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. Diabetes. 2010;59:2682–2689.

59. Freathy RM, Weedon MN, Bennett A, Hypponen E, Relton CL, Knight B, Shields B, Parnell KS, Groves CJ, Ring SM, Pembrey ME, Ben-Shlomo Y, Strachan DP, Power C, Jarvelin MR, McCarthy MI, Davey Smith G, Hattersley AT, Frayling TM. Type 2 diabetes TCF7L2 risk genotypes alter birth weight: a study of 24,053 individuals. Am J Hum Genet. 2007;80(6):1150-61

60. Freeman H, Cox RD. Type 2 diabetes: a coctail of genetic discovery. Human molecular genetics. 2006;15: R202-R209.

61. Froguel P, Hager J. Human diabetes and obesity: tracking down the genes, Trends Biotechnol. 1995;13: 52–55.

62. Fuerer C, Nusse R, Berge D. EMBO reports. 2008; 9:134–138

63. Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Kinyoun JL, Leonetti DL, Newell- Morris LL, Robinson LR, Shuman WP, Stolov WC, Tsunehara CH, et al. Diabetes and diabetes risk factors in second- and third-generation Japanese Americans in Seattle, Washington. Diabetes Res Clin Pract. 1994;24:S43-52.

64. Fujino T, Asaba H, Kang MJ et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose. İnduced insulin secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:229-234.

66. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signalling in cancer. Biochim Biophys Acta. 2003;1653(1):1-24.

67. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8)

confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. Diabetes. 2003;52:568–572.

68. Goldfine AB, Bouche C, Parker RA, Kim C, Kerivan A, Soeldner JS, Martin BC, Warram JH, Kahn CR. Insulin resistance is a poor predictor of type 2 diabetes in individuals with no family history of disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(5):2724-9.

69. Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Zabena C, Perez-Barba M, Serrano-Rios M Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. Diabetologia. 2008;51: 1993–1997.

70. Gostner JM, Fong D, Wrulich OA, Florian Lehne, Marion Zitt, Martin Hermann, Sylvia Krobitsch, Agnieszka Martowicz, Guenther Gastl, Gilbert Spizzo. Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines. BMC Cancer. 2011; 11:45.

71. Gönen MS, Arıkoğlu H, Erkoç Kaya D, Özdemir H, ipekçi SH, Arslan A, Kayış SA, Göğebakan B. Effects of Single Nucleotide Polymorphisms in K(ATP) Channel Genes on Type 2 Diabetes in a Turkish Population. Arc Med Res. 2012;43:317-323.

72. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeuth T, Gonzales Escribano MF, Pons Etsel B et al. A caommon haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosis. Nat Genet. 2006;38:550-555.

73. Grant RW, Moore AF, Florez JC. Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. Diabetes Care. 2009;32(6):1107-14.

74. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A,Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, StyrkarsdottirU, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, GudmundsdottirT, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP,Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, ThorsteinsdottirU, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcriptionfactor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. Nat Genet. 2006;38:320-323.

75. Grarup N, Andersen G. Gene–environment interactions in the pathogenesis of type 2 diabetes and metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007;10:420–426.

76. Groves Cj, Zeggini E, Minoton J, Frayling TM, Weedon MN, Rayne NW et.al. Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as atype 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. Diabetes. 2006;55:2640-4.

77. Guo T, Hanson RL, Traurig M, Muller YL, Ma L, Mack J, Kobes S, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ: TCF7L2 is not a major susceptibility gene for type 2 diabetes in Pima Indians: analysis of 3,501 individuals. Diabetes. 2007; 56(12):3082-3088.

78. Habas R and Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? J Biol. 2005;4(1):2.

79. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 1992;35: 595–601.

80. Hattersly AT. Prime suspect: the TCF7L2 gene and type 2 diabetes risk. J Clin Invest. 2007;117(8):2077-9.

81. Hayashi T, Iwamoto Y, Kaku K, Hirose H, Maeda S. Replicationstudy for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2diabetes in a Japanese population. Diabetologia. 2007;50: 980–984.

82. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/β-catenin signaling: Arrows point the way. Development. 2004;131:1663-1677.

83. Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V,Gunnarsdottir S et al (2007). Refining the impact of TCF7L2 gene variantson type 2 diabetes and adaptive evolution. Nat Genet. 2007;39:218–225.

84. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. Agenetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetologia. 2007;50: 747–751.

85. Hovanes K, Li TW and Waterman ML. The human LEF 1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. Nucleic Acid Res. 2000;28:1994-2003.

86. http://www.turkstat.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=243.

87. Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, Li KW, Palmen J, Miller MA, Cappuccio FP, et al. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. J Mol Med. 2006;84:1005-1014.

88. Internatinal Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas. 3rd Edition. Brussels, International Diabetes Federation, 2006.

89. .International Diabetes Federation (IDF).Diabetes Atlas. 4th Edition. Brussels, 2009.

90. Iwata M, Maeda S, Kamura Y, Takano A, Kato H, Murakami S, Higuchi K, Takashi A, Fujita H, Hara K, Kadowaki T,Tobe K. Genetic Risk Score Constructed Using 14 Susceptibility Alleles for Type2Diabetes Is Associated With the Early Onset of Diabetes andMay Predict the Future Requirement of Insulin Injections Among Japanese Individuals. Diabetes Care. 2012;35:1763–1770.

91. İmamoğlu Ş. Diabetes Mellitus. Dolar E (Ed.). İç Hastalıkları, Nobel&Günes Tıp Kitabevi İstanbul; 2005;692-719.

92. Ji Linong, Ren Q,Wang F, Han X. Sequencing and association analysis of transcription factor 7 like 2 (TCF7L2) polymorphisms in the Chinese Type 2 diabetes population. Diabetes Research and Clinical Practice. 2008;79:S1-S127.

93. Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. Mol Endocrinol. 2008;22(11):2383-92.

94. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. Diabetologia. 2008;51(10):1771-80.

95. Kabalak T, Çetinkalp Ş. Tip 2 diabetes mellitus. "Diabetes Mellitus" içinde. Ed: İmamoğlu Ş, Ersoy C. 3. Baskı, İstanbul, Deomed Medikal Yayıncılık. 2009;54-72.

93. Kahn CR. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. Exp Diabesity Res. 2003;4(3):169-82.

96. Kahn SE. Engineering a new beta-cell: a critical venture requiring special attention to constantly changing physiological needs. Semin Cell Dev Biol. 2004;15 (3):359-70.

97. Kahn SE. The importance of beta cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Am J Med. 2000;108 (Suppl 6a)2s-8s.

98. Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A et al. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integrationsite family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. Am J Hum Genet. 2004; 75:832–843.

99. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. Exp Mol Med. 2006; 38:1-10.

100. Kikuchi A, Yamamoto H. Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signalling. Cancer Sci. 2008; 99:202-8.

101. Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, Schafer SA, Tschritter O, et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. Diabetologia. 2008. 51: 597–601.

102. Klein K, Haslinger P, Bancher-Todesca D, Leipold H, Knöfler M, Handisurya A, Kautzky-Willer A, Worda C. Transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus. J Matern Fetal Neonatal Med. 2012;25(9):1783-6.

103. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/β-Catenin/Tcf Signaling: A critical pathway in gastrointesitinal tumorigenesis. Digestion. 2002; 66: 131-144.

104. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van WichenD, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B and Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin–Tcf complex in APC colon carcinoma. Science. 1997;275: 1784-1787.

105. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. Am J Epidemiol. 2002;156(11):1070-7.

106. Laukkanen O, Pihlajamaki J, Lindstrom J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Patrikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M, Finnish Diabetes Prevention Study Group. Polymorphisms of the SUR1 (ABCC8) and Kir6.2 (KCNJ11) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:6286-6290.

107. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HEet al. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and its upstream region are associated with Type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. Diabetes. 2007;56: 389–393.

108. Liu Z, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta-cell proliferation. J Biol Chem. 2008;283:8723–8735.

109. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:781- 810.

110. Loos RJF, Franks PW, Francis RW, Barroso I, Gribble FM, Savage DB et al. TCF7L2 polymorfisms modulateproinsulin levels and β cell function in a British Europid population. Diabetes. 2007;56:1943-1947.

111. Lorenowicz MJ, Korswagen HC. Sailing with the Wnt: charting the wnt processing and secretion route. Exp Cell Res. 2009;315:2683-9

112. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. San Antonio Heart Study. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. Diabetes Care. 2003;26(11):3153-9.

113. Luo Y, Wang H, Han X. "Meta-analysis of the association between SNPs in TCF7L2 and type 2 diabetes in East Asian population", Diabetes Research and Clinical Practice. 2009; 85:139-146.

114. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Perfekt R, Lahti K, Nissen M, Isomaa B, Forsen B, Homstrom N, Saloranta C, et al. Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. Diabetes. 2005;54, 166–174.

115. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjogren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen AL, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. J Clin Invest. 2007;117: 2155-2163.

116. Lyssenko V. The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2008;11:385–392.

117. Malecki MT, Klupa T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. Pharmacological reports. 2005;57:20-32.

118. Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 2005;68 Suppl1:S10-21.

119. Marquezine GF, Pereira AC, Sousa AG, Mill JG, Hueb WA, Krieger JE. TCF7L2 variant genotypes and type 2 diabetes risk in Brazil: significant association, but not a significant tool for risk stratification in the general population. BMC Med Genet. 2008;4;9:106.

120. Martınez-Gomez LE, Cruz M, Martınez-Nava GA, Madrid-Marina V, Parra E, Garcıa-Mena J, Espinoza-Rojo M, Estrada-Velasco BI, Piza-Roman LF, Aguilera P, and Burguete-Garcıa AI. A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with Type 2 Diabetes in two different populations of Mexico. Annals of Human Genetics. 2011;75,612–620.

121. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. Lancet. 1992;340(8825):925-9.

122. Marzi C, Huth C, Kolz M, Grallert H, Meisinger C, Wichmann HE, et al. Variants of the transcription factor -7 like-2 gene (TCF7L2) are strongly associated with type 2 diabetes but not with the metabolic syndrome in the MONICA/KORA surveys. Horm Metab Res. 2007;15:342-6.

123. Mayans S, Lackovic K, Lindgren P, Ruikka K, Agren A, Eliasson M, Holmberg D. TCF7L2 polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Northern Sweden. Europ J Hum Genet. 2007;5: 342-346.

124. Mayer K, Wolff E, Clevers H, and Ballhausen WG. The human high mobility group (HMG)-box transcription factor TCF-1: novel isoforms due to alternative splicing and usage of a new exon IXA. Biochem Biophys Acta. 1995;1263: 169–172.

125. Mayer-Davis EJ. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and current research toward prevention and treatment. J Am Diet Assoc. 2008;108 (4):S45-51.

126. McCaffery JM, Jablonski KA, Franks PW, Dagogo-Jack S, Wing RR, et al. TCF7L2 Polymorphism, Weight Loss and Proinsulin:Insulin Ratio in the Diabetes Prevention Program. PLoSONE. 2011;6(7).

127. Melzer D, Murray A, Hurst AJ, Weedon MN, Bandinelli S, Corsi AM, Ferrucci L, Paolisso G, Guralnik JM, Frayling TM: Effects of the diabetes linked TCF7L2 polymorphism in a representative older population. BMC Med. 2006;4:34.

128. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene. 2006;25(57):7461-8.

129. Miller JR. The Wnts. Genome Biol. 2002; 3(1):Reviews 3001.

130. Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Yasuda K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, and 11 others. Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese patients. J. Hum. Genet. 2008; 53: 174-180.

131. Moczulski D, Gawlik B, August R, Strojek K, Grzeszczak W. TCF7L2 gene is associated with type 2 diabetes in Polish population. Diabetologia Doświadczalnai Kliniczna 2007;7(2):109–111.

132. Moon RT, Brown JD, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. Trends Genet 1997;13:157-162.

133. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and beta-catenin signalling: diseases and therapies. Nat Rev Genet.2004;5(9):691-701.

134. Mueckler M, Kruse M, Strube M, Riggs AC, Chiu KC, Permutt MA. A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity, Journal of Biological Chemistry. 1994;269:17765-17767.

135. Ng MCY, Tam CHT, Lam VKL, So WY, Ma RCW, Chan JCN. Replication and identification of novel variants at TCF7L2 associated with type 2 diabetes in Hong Kong Chinese. J Clin Endocr Metab. 2007;92: 3733-3737.

136. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. Cell. 1992;69(7):1073-87.

137. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. Cell Res. 2005;15(1):28-32.

138. Osmark P, Hansson O, Jonsson A, Rönn T, Groop L, Renström E. Unique splicing pattern of the TCF7L2 gene in human pancreatic islets. Diabetologia. 2009;52:850-854

139. Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. Curr Opin Genet Dev. 2007;17:239–244.

140. Özbey N, Orhan Y. Diabetes Mellitus. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.

141. Palizban A, Nikpour M, Salehi R, Maracy MR. Association of a common variant in TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus in a Persian population Clin Exp Med. 2012; 12:115–119.

142. Pang DX, Smith AJP, Humphries SE. Functional analysis of TCF7L2 genetic variants associated with type 2 diabetes Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 2012; doi:10.1016/j.numecd.2011.12.012.

143. Papadopoulou S, Edlund H. Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. Diabetes. 2005; 54:2844–2851.

144. Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue P, Shrive M, Wacher N, Kumate, J, Kittles R, Cruz M. Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. Clin Genet. 2007;71: 359-366.

145. Pedersen O, Bak JF, Andersen PH. Evidence against altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. Diabetes. 1990;39:865-70.

146. Peifer M, Polakis P. Wnt signalling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. Science. 2000;287:1606-1609.

147. Pimenta W, Korytkowski M, Mitrakou A, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Evron W, et al. Pancreatic beta-cell dysfunction as the primary genetic lesion of NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. JAMA. 1995;273:1855–61.

148. Polakis P. Wnt signalling and cancer. Genes Dev. 2000;14(15):1837-51.

149. Potapov VA, Shamkhalova MN, Smetanina SA, Bel'chikova LN, Suplotova LA, Shestakova MV, and Nosikov VV. TCF7L2 rs12255372 and SLC30A8 rs13266634 Confer Susceptibilityto Type 2 Diabetes in a Russian Population. Russian Journal of Genetics. 2010;46(8):1001–1008.

150. Powers AC. Diabetes Mellitus. Ed: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th edition, Mc Graw Hill Company. 2001;2: 2109-2138.

151. Poy F, Lepourcelet M, Shivdasanil RA and Eck MJ. Structure of a humanTcf4/β-catenin complex. Nature: structural biology. 2001; 8 number 12.

152. Prokunina-Olsson L, Welch C, Hansson O, Adhikari N, Scott LJ, Usher N, Tong M, Sprau A, Swift A, Bonnycastle LL, Erdos MR, He Z, Saxena R, Harmon B, Kotova O, Hoffman EP, Altschuler D, Groop L, Boehnke M, Collins FS and Hall JL. Tissue-spesific alternative splicing of TCF7L2. Human Molecular Genetics. 2009;8:3795-3804.

153. Pugliese A, Miceli D. The insulin gene in diabetes. Diab Metab Res Rev. 2002;18:13-25

154. Qiao H, Zhang X, Zhao X, Zhao Y, Xu L, Sun H, Fu S. Genetic variants of TCF7L2 are associated with type 2 diabetes in a northeastern Chinese population. Gene. 2012;495: 115–119

155. Rees SD, Bellary S, Britten AC, O'Hare JP, Kumar S, Barnett AH, Kelly MA: Common variants of the TCF7L2 gene are associated with increased risk of type 2 diabetes mellitus in a UK-resident South Asian population. BMC Med Genet. 2008, 9:8.

156. Rees SD, Hydrie MZI, Shera A, Kumar S, O'Hare JP, Barnett AH, Basit A, Kelly MA. Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations. Diabetologia. 2011;54:1368–1374

157. Ren Q, Han XY, Wang F, Zhang XY, Han LC, Luo YY, Zhou XH, Ji LN. Exon sequencing and association analysis of polymorphisms in TCF7L2 with type 2 diabetes in a Chinese population. Diabetologia. 2008;51(7):1146-52.

158. Roder ME, Porte Jr D, Schwartz RS, Kahn SE. Disproportionately elevated proinsülin levels reflect the degree of impaired beta cell secretory capacity in patients with non-insülin dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(2):604-8.

159. Roglic G, Unvin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates fort the year 2000. Diabetes Care. 2005;28(9):2130-5.

160. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. Science. 2000;289:950–95.

161. Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW et al. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:6247–6252.

162. Saadi H, Nagelkerke N, Carruthers SG, Benedict S, Abdulkhalek S, Reed R, Lukic M, Nicholls MG: Association of TCF7L2 polymorphism with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and markers of beta cell function and insulin resistance in a population- based sample of Emirati subjects. Diabetes Res Clin Pract. 2008, 80(3):392-398.

163. Saltiel AR, Kahn CR. İnsulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414:799-806.

164. Sampietro J, Dahlberg CL, Uhn Soo Cho, Hinds TR, Kimelman Dand Xu W. Crystal Structure of a b-Catenin/BCL9/Tcf4 Complex. Molecular Cell. 2006;24: 293–300.

165. Satman I, Alagöl F, Ömer B, Kalaca S et all. 2010 TURDEP 2. Çalışma Grubu 32. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi 13-17 Ekim 2010. Antalya.

166. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tutuncu Y, Sargin M, Dinccag N, Karsidag K, Kalaca S, Ozcan C, King H. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. 2002;25(9):1551-6.

167. Saxena R, Gianniny L, Burtt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjogren M et al. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with Type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in non-diabetic individuals. Diabetes. 2006;55:2890–2895.

168. Schäfer SA, Machicao F, Fritsche A, Häring HU, Kantartzis K. New type 2diabetes risk genes provide new insights in insülin secretion mechanisms. Diabetes Research and Clinical Practice. 2011;93:s9-s24.

169. Schäfer SA, Tschritter O, Machicao F, et al. Impaired Glucagon-Like Peptide-1-Induced Insulin Secretion in Carriers of Transcription Factor 7-Like-2 (TCF7L2) Gene Polymorphisms, Diabetologia. 2007;50:2443–2450.

170. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A et al. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. Breast Cancer Research. 2007; 9:R63.

171. Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N et al. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)variants with Type 2 diabetes in a Finnish Sample. Diabetes. 2006;55: 2649–2653.

172. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL et al. A genome-wide association study of Type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science. 2007;316: 1341–1345.

173. Shaat N, Lernmark A, Karlsson E, Ivarsson S, Parikh H, Berntorp K, Groop L. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. Diabetologia. 2007;50: 972–979.

174. Shaw J. Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. Pediatr Diabetes. 2007;8 (Suppl 9):7-15.

175. Shiina H, Igawa M, Breault J, Ribeiro-Filho L, Pookot D, Urakami S, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, Shirai M, et al. The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2003; 9:2121-2132.

176. Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K. TCF7L2 regulates βcell survival and function in human pancreatic islets. Diabetes. 2008;57: 645–653.

177. Shulewitz M, Soloviev I, Wu T, Koeppen H, Polakis P, Sakanaka C. Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. Oncogene. 2006;20;25(31):4361-9.

178. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature.2007;445: 881–885.

179. Smith U. TCF7L2 and type 2 diabetes - we WNT to know. Diabetologia 2007;50:5-7.

180. Sönmez Ü, Ergür BU. [Wnt signal mechanism and its effect on spine development]. J Turk Spinal Surg. 2002;13(3-4):17-21.

181. Steiner DF, James DE. Cellular and molecular biology of the beta cell. Diabetologia. 1992 Dec;35 Suppl 2:S41-8.

182. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. Nat Genet. 2007;39:770-775.

183. Stern MP. Do non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease share common antecedents? Ann Intern Med. 1996;124: 110–116.

184. Stolerman ES, Manning AK, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, et al. TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. Diabetologia. 2009: pp 614–620.

185. Tang W, Dodge M, Gundapaneni D, Michnoff C, Roth M. and Lum L. A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. Proc Nat Acad Sci. USA. 2008;105:9697–9702.

186. Tanır HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. Wnt/Beta-Katenin sinyal yolunda görev alan hedef hücre zarı biyomolekülleri (Rew). Marmara medical Journal. 2012;25:53-7

187. Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı (TDÖKP). TC Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 2011.

188. The TCF7L2&Wnt Action Group. http://www.ludc.med.lu.se/ludc-action-groups/the-tcf7l2-wnt-action-group/

189. The World Health Organization, Country and Regional Data: Prevelance of Diabetes Worldwide. http://www.who.int/diabetes/facts/worldfigures/en/.

190. Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H and Zhang B. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. BMC Medical Genetics. 2009;10:15:1471-2350.

191. Tsao DA, Huang CW, Chang HR, Hsieh KC, Tung TC, Liao MC, Huang SC, Lu TY, Huang CS. Single nucleotid polmorphisms of TCF7L2 and Adiponectin genes for Type 2 Diabetes Mellitus in Taiwan. Fooyin J Health Sci. 2009;1(1):41-47.

192. Twells RC, Mein CA, Payne F et al. Linkage and association mapping of the LRP5 locus on chromosome 11q13 in type 1 diabetes. Hum Genet. 2003;113:99–105.

193. Utzschneider KM, Carr DB, Hull RL, Kodama K, Shofer JB, Retzlaff BM, Knopp RH, Kahn SE. Impact of intra-abdominal fat and age on insulin sensitivity and beta-cell function. Diabetes. 2004;53 (11): 2867-72.

194. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development (Rew). Development 2009; 136 (19):3205-14.

195. van de Wetering M, Castrop J, Korinek V, and Clevers H. Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. Mol. Cell. Biol. 1996;16: 745–752.

196. Virally M, Blickle JF, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Tip 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. Diabetes Metab. 2007;33(4):231-44.

197. Weedon MN. The importance of TCF7L2. Diabet Med. 2007;24:1062–1066.

198. Weedon MN, Schwarz PEH, Horikawa Y, et al. Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility. Am J Hum Genet. 2003;73:1208–1212.

199. Welters HJ ve Kulkarni RH. Wnt signalling: relevance to-cell biology and diabetes. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2008;19(10): 349-355.

200. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. Growth Factors, 2005;23:111-116.

201. Willert K, Jones KA . Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes Dev. 2006;20: 1394-1404.

202. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev. 1998;8(1):95-102.

203. Williams G, Pickup JC. Diyabet El Kitabı, üçüncü baskı Blackwell publishing. 2004

204. www.betacell.org/content/articles/articlepanel

205. Yenigün M. "Her Yönüyle Diabetes Mellitus", Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı, İstanbul, 2001.

206. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. J Biol Chem. 2005;280:1457–1464.

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

208. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H et al. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for Type 2 diabetes. Science. 2007; 316: 1336–1341.

209. Zeng X, Huang H, Ta mai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, et al. Initia ion of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. Development. 2008;135(2):367-75.

210. Zhang W, Duan S, Bleibel WK, Wisel SA, Huang RS, Wu X, He L, Clark TA, Chen TX, Schweitzer AC et al. Identification of common genetic variants that account for transcript isoform variation between human populations. Hum. Genet. 2008; 125:81-93.

211. Zhang Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, Turner RC. 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. 1996;39:1505-1511.

10. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Beyşehir'de doğdu. İlk öğrenimini 1987-1992 yılları arasında Beyşehir Atatürk İlkokulu'nda, ortaöğrenimini ise 1992-1999 yılları arasında Beyşehir Ali Akkanat Anadolu Lisesi (Hazırlık-Orta ve Lise kısmı)'nde tamamladı. 1999 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2003 yılında mezun oldu. 2003-2006 yılları arsında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans programını tamamladı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı doktora eğitimi devam etmektedir. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Öğretim görevlisi olarak atandı. Evli ve bir çocuk annesidir.