T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİ TİP 2 DİABETES MELLİTUS HASTALARINDA CALPAİN-10 GENİNİN HASTALIK İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hülya ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN

KONYA-2012

ÖNSÖZ

Tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN'a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL'e, Sayın Prof. Dr. Ferhan PAYDAK'a, Sayın Prof. Dr. M. Sait GÖNEN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Gül DURSUN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU'na, Sayın Dr. Melda AKSOY'a, Sayın Uzman Dr. Süleyman İPEKÇİ'ye, Sayın Şengal BAĞCI TAYLAN ve Sayın Dr. Zeliha FAZLIOĞULLARI'na, 09202049 numaralı projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, sabır ve desteklerinden dolayı anneme, babama ve kardeşime teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ…….. ii

SİMGELER VE KISALTMALAR……..v

1. GİRİŞ……..1

1.1. Diabetes Mellitus……..…….....3

1.1.1. Diabetes Mellitus'un tarihçesi …….....3

1.1.2. Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması…….……... 4

1.1.3. Diabetes Mellitus'un tanı kriterleri…….……..8

1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus…….……..9

1.2.1. Komplikasyonlar…….……11

1.2.2. Tedavi…….……12

1.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus ve genetik ……...……13

1.3. Calpainler……..……15

1.4. Calpain-10……..……...21

1.4.1. Calpain-10'un insülin direnci ve salınımı üzerine etkisi.....23

1.4.2. Calpain-10 ve Tip 2 Diabetes Mellitus arasındaki ilişki ……...…….24

2. GEREÇ ve YÖNTEM…….…….26

2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması…….…….…. 26

2.2. Biyokimyasal Tetkikler…….…….….. 26

2.3. DNA Eldesi…….…….…… 27

2.3.1. Solüsyonların hazırlanması……...……. 27

2.3.2. Teknik……...……. 28

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu…….…….……. 29

2.4.1. PZR bileşenlerinin hazırlanması……...……. 29

2.4.2. PZR basamakları……...……. 29

2.4.3. Primer tasarımı ……..…… 30

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi……..…… 35

2.5.1. Solüsyonların hazırlanması ……..……. 35

2.5.2. Örneklerin jele yüklenmesi……..……. 36

2.6. SSCP Tekniği ……..……. 37

2.6.1. Camların temizlenmesi ve jelin dökülmesi……...……. 37

2.6.2. Örneklerin jele yüklenmesi……..……..…….38

2.6.3. Örneklerin görüntülenmesi (Boyama)…….……..…… 39

2.7. Restriksiyon Enzim Kesimi…….…….……... 40

2.7.1. Reaksiyon karışımının hazırlanması……..……..…… 41
2.8. İstatistiksel Analizler……..……. 41
2.9. Araç ve Gereçler……...42
2.9.1. DNA eldesi için gerekli olan araç ve gereçler……..…… 42
2.9.2. PZR tekniği için gerekli olan araç ve gereçler……..…… 42
2.9.3. SSCP için gerekli olan araç ve gereçler……..…….. 42
2.9.4. RFLP için gerekli olan araç ve gereçler……. 42
2.10. Kimyasallar……...42
2.10.1. DNA eldesi için gerekli olan kimyasallar……..……..... 42
2.10.2. PZR tekniği için gerekli olan kimyasallar……..…… 42
2.10.3. SSCP için gerekli olan malzemeler……..……... 43
2.10.4. RFLP için gerekli olan malzemeler……..…….. 43
3. BULGULAR……..…… 44
3.1. Klinik Özellikler……..…… 44
3.2. SNP -44, -43, -19, -110, -137 ve -63'ün Genotiplenmesi……..…….. 44
3.3. T2DM İle Genotip İlişkisi……..…….. 56
3.4. Genotip-Fenotip İlişkisi……..……. 56
4. TARTIŞMA……...……..……. 59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER……...……..……. 64
6. ÖZET…….……....65
7. SUMMARY……...……..……. 66
8. KAYNAKLAR…….…… 67
9. EKLER…….…… 73
EK. A: CAPN10 Tüm Gen Dizisi……..……73
EK. B: Etik Kurul Kararı.……...78
10. ÖZGEÇMİŞ……...……..79

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
CAPN10	: Calpain-10
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
HapMap	: Haplotip haritası
HbA1C	: Hemoglobin A1c
HOMA-IR	: Homeostasis Model of Assessment – Insulin Resistance
IFG	: Bozulmuş açlık glukozu
IGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon enzim kesimi
SNP	: Tek nükleotid değişimi (single nucleotid polymorphism)
SSCP	: Tek zincir biçim çeşitliliği (single strand conformational polymorphism)
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Multifaktöriyel kalıtımlı hastalıklar, genetik faktörler ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan hastalıklardır. Bu hastalıklar tüm genetik bozukluklar içinde insidansı ve prevalansı en yüksek olan grubu oluşturur. Diabetes Mellitus (DM) multifaktöriyel olarak kalıtılan hastalıklar arasında yer almaktadır.

Diyabet, bir yandan yüksek morbidite ve mortalite hızı, diğer yandan yüksek tedavi harcamaları ve iş gücü kaybı nedeni ile hem hastaya hem de topluma büyük yük getirmesinden ötürü önemli bir sağlık sorunudur. Gelişen teknolojiye bağlı olarak sedanter yaşam ve obezitenin yaygınlaşması, hastalığın tüm dünyada sıklığının giderek atmasına neden olmuştur. 2000 yılında 151 milyon olan dünyadaki diyabetli sayısının 2025 yılında 2 katına çıkarak 300 milyon civarına ulaşması beklenmektedir.

En sık görülen Diabetes Mellitus formu, Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)'dur ve hedef dokularda insülin direnci ve pankreatik β hücrelerinde insülin salınımının azalması ile karakterize edilen bir hastalıktır. T2DM yıllarca asemptomik kalır ve genellikle 45 yaş üzerinde ilk şikayetler görülmeye başlanır. Hastaların hekime ilk başvurma nedenleri polidipsi, poliüri ve polifaji gibi yakınmalardan ziyade görme bozuklukları, el ve ayaklarda uyuşukluk veya fasiyal sinir paralizisi gibi kronik komplikasyonlar mevcuttur. Hastaların çoğu obezdir.

T2DM'nin patogenezinde yaşam tarzı ve aşırı beslenme gibi çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de yer alır. T2DM'nin gelişimden sorumlu oluduğu düşünülen birçok aday gen bulunmaktadır. Bu aday genlerden birisi olan Calpain-10 geni, 2. kromozom üzerinde (2q37.3) bulunmaktadır. Horikawa ve ark'nın 2000 yılında yaptığı çalışmada Calpain-10 geninin T2DM ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.

Calpain'ler, aktivite gösterebilmek için Ca++ iyonlarına ihtiyaç duyan stoplazmik sistein proteazlardır. Fizyolojik fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın trombosit aktivasyonu, membran füzyonu, apoptoz, farklılaşma, hücre döngüsünün devamlılığı ve sinyal iletimi gibi hücresel Ca++ düzenleyici faaliyetlerde bulunmaktadır. Aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar nöronal dejenerasyon, Alzheimer, metastaz gibi patolojilere yol

açabilmektedir. Calpain 10 geninin insülin salınımında önemli rolü olduğu bilinmektedir. Calpain 10 genindeki genetik varyantlar serbest yağ asitleri ve insülin direnci ile ilişkilidir.

T2DM patogenezinde Calpain-10'un önemi toplumlara göre değişmektedir. Bazı toplumlarda Calpain-10 genindeki polimorfizmlerin T2DM riskini arttırdığı saptanırken, bir kısmında ise bu ilişki saptanamamıştır. Bu tez çalışmasında Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda Calpain-10 genindeki SNP -44, -43, -19, -110, -137 ve -63 polimorfizmleri çalışılarak Konya Bölgesi'ndeki sıklığının araştırılması ve genetik yatkınlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), insülin hormon salımının ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (Altuntaş 2001). Bazı hastalarda kan glukoz düzeyi böbrek eşiğini aşarak poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı gibi diyabetin klasik belirtilerine yol açar. Karbonhidrat metabolizması yanısıra lipid ve protein metabolizmasını da etkiler (Tamer 1998) (Çizelge 1.1). Avrupa'da ve Amerika'da toplam populasyonun %8'inin, 65 yaş nüfusun ise %20'sinin diyabetik olduğu bildirilmiştir (Esen 2004). Ülkemizde ise DM yaygınlığı %13,7'dir (Batkın ve Çetinkaya 2005). Ülkelere ve etnik gruplara göre bu rakamlar değişmektedir.

Çizelge 1.1. Diyabet semptomları.

Klasik semptomlar	**Daha az görülen semptomlar**
● poliüri ● polidipsi ● polifaji veya iştahsızlık ● halsizlik, çabuk yorulma ● ağız kuruluğu ● noktüri	● bulanık görme ● açıklanamayan kilo kaybı ● inatçı enfeksiyonlar ● impotans ● tekrarlayan mantar enfeksiyonları

1.1.1. Diabetes Mellitus'un tarihçesi

Mısır uygarlığında, M.Ö. 1500 yılına ait Ebers papirüsünde diabetten söz edilmektedir (Bağrıaçık 1997). Milattan 200 yıl sonra Orta Anadolu'da (Kapadokya) yaşayan Areteus, fazla su içen ve idrar çıkaran hastaların durumuna 'diabetes' yani akıp gitme, öteye geçme adını vermiştir. Ortaçağ İslam hekimi İbn-i Sina, diyabetik hastaların idrarı buharlaştırılırsa kahverengi ve tatlı bir kalıntı bıraktığını bildirmiştir. 1674 yılında diyabetiklerin idrarının tatlı olduğunu tadarak bulan Thomas Willis bu hastalığa ilk defa şekerli (ballı) sıfatını ekleyerek diabetes mellitus adını vermiştir. Hastalığın pankreas ile ilgisi 1889 yılında Minkowski'nin pankreaktomi yaptığı bir köpeğin diyabetik oluşu ile anlaşılmıştır. 1921 yılında Toronto'da Banting ve Best'in insülini bulmalarıyla hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında önemli bir çağ

başlamıştır (Hatemi ve Urgancıoğlu 1986). 1936'da Hagedorn kristalize insüline bir balık proteini olan protamini ilave ederek daha uzun etkili insülini geliştirmiştir (Yenigün ve Ener 2001). 1964'de Çinliler ve Amerikalılar birbirinden bağımsız olarak insülin molekülünün sentezini başarmışlardır (Hatemi ve Urgancıoğlu 1986). 1972'de Lilly saf insülini piyasaya sürmüştür (Yenigün ve Ener 2001). Günümüzde Recombinant DNA teknolojisi ile tamamen sentez ürünü olan insan insülini üretilmektedir.

1.1.2. Diabetes Mellitus'un sınıflandırılması

Diabetes Mellitus patogenez, doğal gidiş ve tedaviye cevap açısından farklı birçok klinik tabloyu kapsadığı için glukoz intoleransı olan hastaların sınıflamasında klinisyenler ve araştırmacıların genellikle kabul edilen terminolojinin yanı sıra standardize sınıflama ve tanısal kriterleri kullanmaları gerekmektedir. 1997'de Amerikan Diyabet Birliği (ADA), 1979'da basılan Ulusal Diyabet Veri Grubunun kriterlerinin yerini alacak olan yeni tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamıştır. 2003 yılında ise tekrar düzenlenmiştir (Burant 2004).

ADA'ya göre Diabetes Mellitus, tip 1 diabetes mellitus, tip 2 diabetes mellitus (T2DM), gestasyonel diabetes mellitus (GDM, gebelik diabeti), diğer spesifik diabet tipleri olmak üzere dört gruba ayrılır (Burant 2004) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Diabetes Mellitus sınıflandırması.

1. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) ● İmmün nedenli ● Nedeni bilinmeyen
2. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) ● Periferik insülin direnci ön planda ● İnsülin sekresyon yetmezliği ön planda
3. Spesifik Tipler ● β hücre fonksiyonunda genetik bozukluk ● İnsülin etkisinde genetik bozukluk ● Ekzokrin pankreas hastalıkları ● Endokrinopatiler ● İlaç ya da kimyasal maddeler ● Enfeksiyonlar ● İmmun diabetin bilinmeyen formları ● Bazen diyabetle ilişkili olan genetik sendromlar
4. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Tip 1 diyabet çocukluk çağında ortaya çıkan kronik hastalıklar arasında en sık görülenlerden biridir (Satman 2001). En önemli özelliği β hücre yıkımıdır. Yıkımın, virüsler ve immün kompleksler olmak üzere iki sebebi olduğu düşünülür (Yenigün 1997). Pankreastan salgılanan endojen insülinin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak gelişir. Bu yüzden tedavide insülin mutlaka gereklidir (Altuntaş 2001). Tip 1 diyabet doğumdan sonraki ilk 6 ayda son derece nadir görülür. İnsidansı dokuzuncu aydan sonra giderek artar ve 12-24 yaşlarında en yüksek düzeye erişir. Bu tepe değerden sonra yaş ilerledikçe insidans azalır. 30 yaş üzerinde yeni olgu çok azdır (Turhan 2007).

Tip 2 diyabette ise yaş ilerledikçe insidans artmaktadır. Kadınlarda Tip 2 diyabet prevelansı 65 yaşına kadar erkeklerden daha yüksek bulunur, 65 yaş üzerinde fark ortadan kalkar (Turhan 2007).

Gestasyonel diyabet (GDM), gebelikten önce var olmayan, gebelik esnasında ilk kez ortaya çıkan, gebeliğin sona ermesiyle de kaybolan diyabettir (Altuntaş 2001). Tipik olarak gebeliğin 2. yarısında ortaya çıktığından embriyonun organogenezini etkilemez, bu nedenle konjenital defektlere neden olmaz (Çolak

2004). Gebeliklerin yaklaşık %4-7'sini etkilemektedir. GDM'si olan kadınların %50'sinde daha sonra T2DM gelişmektedir (Burant 2004).

Daha önce 'Sınırda Diyabet' ya da 'Latent Diyabet' diye anılan bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ve bozulmuş açlık glukozu (IFG), artık 'Pre-diyabet' olarak kabul edilmektedir (Tahmiscioğlu 2008). Pre-diyabetli bireylerde açlık glukoz seviyesi veya glukoz toleransı test sonuçları normalin üzerindedir. Fakat diyabet için tanısal değildir. Bu hastalar T2DM ve kardiyovasküler hastalıklar için artmış riske sahiptir ve takip edilmelidir. Diyabetten korunma programları ve diğer çalışmalar göstermiştir ki yaşam şekli değişiklikleri (vücut ağırlığını %5-10 arasında azaltmak için yapılan diyet modifikasyonları ve haftanın çoğu günlerinde en az 30 dakika orta şiddette fiziksel aktivite) pre-diyabetik hastaların diyabete ilerlemesini önler veya geciktirir (Burant 2004).

Diğer spesifik diyabet tipleri diyabetli hastaların <%3'ünü temsil etmektedir. Her ne kadar bu gruptaki hasta sayısı az olsa da bu hastaların doğru tanı almaları ve uygulanacak tedavinin çoğunlukla farklı olması nedeniyle önemli bir gruptur. Çizelge 1.3'de bu kategoride yer alan hastalıkların listesi verilmiştir (Yılmaz ve Kepekçi 2004).

Çizelge 1.3. Diabetes Mellitus'un diğer spesifik tipleri.

♦ **β hücre fonksiyonunda genetik bozukluklar**	♦ **İlaca veya kimyasala bağlı**
● Kromozom 20 (*MODY1*)	● Vakor
● Kromozom 7 (*MODY2*)	● Pentamidin
● Kromozom 12 (*MODY3*)	● Nikotinik asit
● İnsulin promoter factor-1 (*MODY4*)	● Glukokortikoidler
● *HNF-1 β (MODY5)*	● Tiroid hormonu
● *NeuroD1/BETA2 (MODY6)*	● Diazoksid
● Mitokondrial DNA	● β-Adrenerjik agonistler
● Mutant insulinler	● Thiazidler
● Hiperproinsulinemi	● Dilantin
● Diğerleri	● α-Interferon
♦ **İnsülin etkisinde genetik bozukluk**	● Protease inhibitörleri
● Tip A insulin direnci	● Atipik antipisotikler
● Leprechaunism	● Diğerleri
● Rabson-Mendenhall sendromu	♦ **Enfeksiyonlar**
● Lipoatropik diyabet	● Kongenital rubella
● Diğerleri	● Sitomegalovirus
♦ **Ekzokrin pankreas hastalıkları**	● Diğerleri
● Pankreatit	♦ **İmmun aracılıklı diyabetin nadir formları**
● Travma/pankreatektomi	● "Stiff-man" sendromu
● Neoplazi	● Anti-insulin reseptor antikorları
● Kistik fibrozis	● Diğerleri
● Hemokromatozis	♦ **Bazen diyabetle ilişkili olan diğer genetik bozukluklar**
● Fibrokalküloz pankreatopati	
● Diğerleri	● Down sendromu
♦ **Endokrinopatiler**	● Klinefelter sendromu
● Akromegali	● Wolfram sendromu
● Cushing sendromu	● Friedreich ataksisi
● Glucagonoma	● Huntington koresi
● Feokromositoma	● Laurence-Moon-Biedl sendromu
● Hipertiroidizm	● Myotonik distrofi
● Somatostatinoma	● Porfiri
● Aldosteronoma	● Prader-Willi sendromu
● Diğerleri	● Diğerleri

1.1.3. Diabetes Mellitus'un tanı kriterleri

Diyabet için önerilen tanı kriterleri uluslararası kuruluş ve organizasyonlara göre değişmektedir. 1997'de ADA ve 1999'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) diyabet için yeni tanı kriterleri (Çizelge 1.4) tanımlamışlardır. ADA ve WHO, Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nin rutin uygulanması konusunda farklı görüş bildirmişlerdir. WHO, OGTT'yi rutinde kullanarak, erken tanı konabileceğini, böylece komplikasyonların önlenebileceğini ya da azaltılabileceğini savunmaktadır. ADA ise, sadece diyabet tanısı koymak için geçerli olan yeni açlık glukoz düzeyi olan 126 mg/dL'yi kullanarak, OGTT ile tanınabilecek diyabetlilerin çoğunun saptanabileceğini ileri sürmektedir (Orçun ve ark 2003).

Günümüzde kabul edilen kriterlere göre, diyabet tanısının konulması için açlık kan şekeri ölçümünün farklı günlerde tekrarlanarak teyit edilmesi gerekmektedir. OGTT diyabet tanısında geliştirilen yeni kavramlara rağmen altın standart olma özelliğini korumaktadır. Açlık kan şekeri değerleri normal sınırlarda bulunan, bununla birlikte diyabet şüphesi devam eden kişilere OGTT uygulanmalıdır. Standart OGTT (75 gr glukozla) değerlendirilmesinde incelenen ana kriter 2. saat glisemi değeridir (Yılmaz ve Kepekçi 2004).

Çizelge 1.4. Diabetes Mellitus tanı kriterleri.

ADA kriterlerine göre diabet tanısı			
Tanı	Açlık Glukozu		
Diabetes mellitus	>126 mg/dL		
Bozulmuş Açlık Glisemisi	100-125 mg/dL		
WHO kriterlerine göre diabet tanısı			
Tanı	Açlık Glukozu		2. saat glukozu
Diabetes mellitus	>126 mg/dL	veya	>200 mg/dL
Bozulmuş Glukoz Toleransı (IGT)	<126 mg/dL	ve	140-200 mg/dL
Bozulmuş Açlık Glisemisi	100-125 mg/dL	ve	< 140 mg/dl
Sağlıklı	<100 mg/dL	ve	< 140 mg/dl

ADA diyabet tanı kriterleri 4 madde ile özetlenebilir:

- Diabetes Mellitus'un klasik semptomları olan bir kişide günün herhangi bir zamanında kan şekerinin ≥ 200 mg/dl bulunması
- Açlık kan şekerinin iki kez ≥ 126 mg/dl olması
- OGTT'de 2.ci saat kan şekerinin ≥ 200 mg/dl bulunması
- HbA1c ≥ %6.5

Hemoglobin A1c (HbA1c) eritrositlerdeki hemoglobinin glikozillenmiş formudur. HbA1c düzeyleri 2-3 aylık dönemdeki glisemik kontrolü yansıtır. Diyabetik hastalarda hedeflenen HbA1c düzeyi <%7 olmalıdır. Genel kan glukoz kontrolünü değerlendirmenin en iyi yolu HbA1c'yi izlemektir. HbA1c arttıkça açlık glisemisinin katkısı daha çok artar. Buna karşılık HbA1c normale yakınsa tokluk glisemisinin katkısı daha ön plandadır. Standardizasyonundaki sorunlar ve tanı eşiğindeki belirsizlik nedeniyle HbA1c'nin diyabet tanı aracı olarak kullanılması uzun yıllardır tartışmalıdır. Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi 2008 yılında yaptığı bir dizi toplantılar sonucunda, uluslararası standardardizasyon kurallarına uyulması koşulu ile diyabet tanısı için HbA1c kesim noktasını %6.5 olarak belirlemiştir. ADA ise 2010 ocaktan itibaren HbA1c %5,7-6.4 aralığında bulunan bireylerin diyabet açısından yüksek riskli olduklarını ve koruma programlarına alınmaları gerektiğini bildirmiştir.

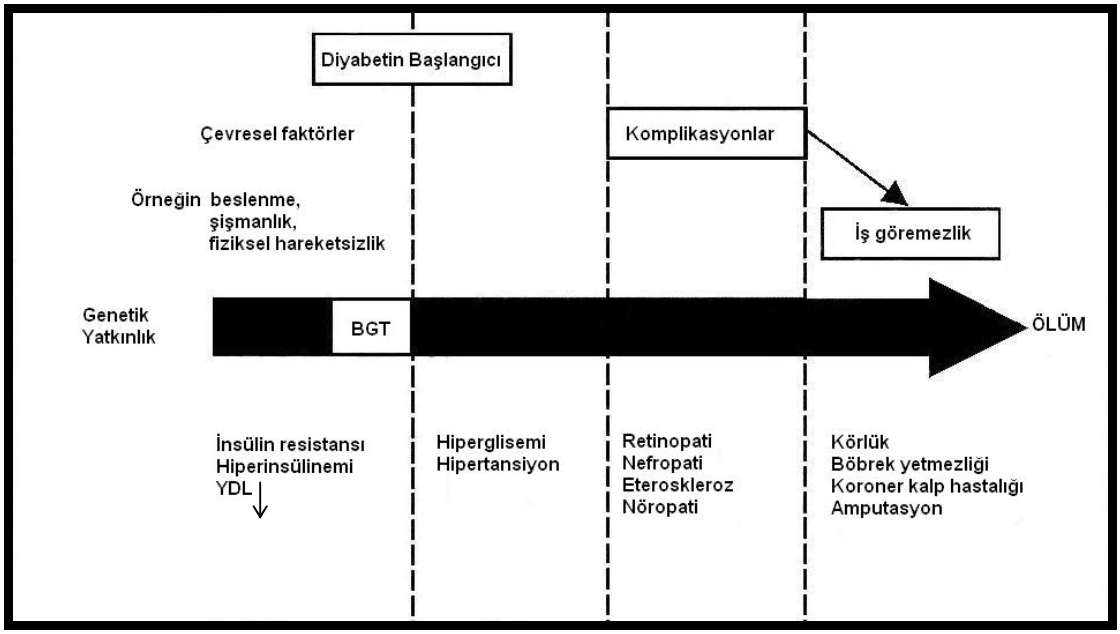
Genellikle hangi yöntemle tanı konulmuş ise ertesi gün bir diğer yöntemle tanı doğrulanmalıdır.

1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Toplumda en sık görülen diabetes mellitus formudur. Genel olarak orta yaş grubu ve yaşlıların hastalığıdır (Davidson 1998). Bununla beraber son yıllarda bazı etnik gruplarda genç erişkin ve adolesan gruplarda da sıklığı artmaktadır (Neufeld ve ark 1998). Dünya Sağlık Örgütü destekli Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesinde (TURDEP) %13,7 oranında diyabet saptanmıştır. Tüm diyabetlilerin %80'den fazlası Tip 2 diyabetlidir (Özkan 1993).

Tip 2 diyabetin en önemli özelliği, insülin aktivasyonuna karşı hücrelerde direnç oluşumudur (Yenigün 2001). Polidipsi (çok su içme), poliüri (sık idrara

çıkma), polifaji (çok yeme), pruritus (kaşıntı), ağırlık kaybı, plazma kan glukoz düzeyinin yükselmesi (aç karnına 126 mg'dan büyük ya da eşit olması) gibi klasik belirtiler ile ortaya çıksa da çoğu kez uzun sürebilen asemptomik bir dönemi mevcuttur ve yıllarca tanı konulamayabilir (Altuntaş 2001, Hilton ve ark 2002). Hastaların hekime ilk başvurma nedenleri polidipsi, poliüri ve polifaji gibi yakınmalardan ziyade görme bozuklukları, el ve ayaklarda uyuşukluk veya fasiyal sinir paralizisi gibi kronik komplikasyonlar mevcuttur. Hiperglisemiye rağmen kan ve idrarda keton cisimleri azdır veya yoktur. İnsülin tedavisi çoğu kez gerekli değildir (Altuntaş 2001). Diyabetteki kronik hiperglisemi durumu, göz, böbrek, sinir sistemi, kalp ve damarlar gibi çeşitli organlarda uzun süreli disfonksiyona, hasar ve yetmezliğe neden olur (Hilton ve ark 2002). T2DM'nin doğal seyri şekil 1.1'de tanımlanmıştır.



Şekil 1.1. T2DM'nin doğal seyri (YDL: yüksek dansiteli lipoprotein, BGT: bozulmuş glukoz toleransı) (Aykut ve ark 1999).

Son yirmi yılda gerçekleştirilen geniş çaptaki epidemiyolojik araştırmalar, en gelişmiş toplumlarda bile, daha önceden tanı konmuş T2DM'li birey sayısı kadar bireyin hastalığının farkında olmadığını ortaya koymuştur. Ülkemizde yapılan diyabet taramalarında bu oranın 1/3 civarında olduğu görülmektedir. Günümüzde modern tıptaki gelişmelere paralel olarak, diyabette de hastalıktan primer ve sekonder korunma önem kazanmaktadır. Bir bakıma T2DM'nin preklinik dönemde saptanması anlamına gelen, diyabetik gelişme riski yüksek grupların belirlenmesi ve

uygun yöntemler ile taranması, gelecekte hastalığa özgü sorunları ve erken ölüm riskini büyük ölçüde azaltacaktır (Bağrıaçık 1997).

1.2.1. Komplikasyonlar

T2DM çoğu kez sinsi gidişlidir. Ancak diyabete özgü komplikasyonlar ortaya çıktığı zaman tanı konulabilir (Molvalılar 1997). Diyabet komplikasyonları akut komplikasyonlar ve kronik komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar nonketotik koma, laktik asidoz ve hipoglisemik komadır. Hafif hipoglisemi ve hiperglisemiler diyabetli hastanın her gün yaşadığı sorunlardır. Diyabetin kronik komplikasyonları ise makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. (Çizelge 1.5). Makrovasküler komplikasyonlar arterosklerotik kalp ve damar hastalıklarıdır. Mikrovasküler komplikasyonlar, diyabet hastalarının arteriyel dolaşımındaki değişikliklerden kaynaklanan komplikasyonlar anlamına gelir. Diğer bir değişle, diyabet hastalarının gözlerinde, böbreklerinde ve sinir sisteminde meydana gelen değişikliklerdir (Molvalılar 1997, Tamer 1998).

Çizelge 1.5. Diabetes Mellitus Komplikasyonları.

Akut Komplikasyonlar	**Kronik Komplikasyonlar**
♦ Diyabetik ketoasidotik koma	♦ **Makrovasküler Komplikasyonlar**
♦ Hiperozmolar nonketotik koma	─ Koroner Arter Hastalığı
♦ Hipoglisemi koması	─ Periferik Arter Hastalığı
♦ Laktik asidoz	─ Serebrovasküler Hastalıkları
	♦ **Mikrovasküler Komplikasyonlar**
	─ Retinopati
	─ Nöropati
	─ Nefropati
	♦ **Diyabetik Ayak**

Diabetes Mellituslu hastalarda göz dibinde, sinirlerde, böbreklerde ve damarlarda tahribat olur. Ayak sinirlerindeki tahribat uyuşmalar, karıncalanmalar, hissizlik ve gece baldıra giren kramplar şeklinde kendisini gösterir. DM'lu hastaların ayaklarında çıkan yaraların kapanması oldukça zordur. Ayağa giden damarlar ve sinirler tam çalışmadığı için herhangi bir kesikle veya ayakkabı vurması gibi bir nedenle ortaya çıkan yaralar iyileşmez ve kangrene çevirebilir. DM'de koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık denilen inme, felç ve beyin kanaması, periferik damar hastalığı denilen uzun damarlarda tıkanma görülebilir. DM'un santral sinir sistemine etkisi ile hastalarda sinirlilik, asabi durum, endişe ve depresyona sık rastlanılır (Tonyukuk Gedik 2007).

Genel popülasyonda koroner arter hastalığı (KAH) prevalansı %2-4 arasındayken, diyabetik hastalarda %55'e kadar artmış KAH prevelansı bildirilmiştir (Araz 2004). Diabetes Mellitus'lu hastaların 3/4'ü KAH'a bağlı komplikasyonlar nedeniyle kaybedilir. Diabetes Mellituslu hastaların en önemli ölüm nedeni miyokard enfarktüsü ve inme ile sonlanan makrovasküler hastalıktır (Tonyukuk Gedik 2007).

1.2.2. Tedavi

Diabetes Mellitus tedavisinin esasları; tıbbi beslenme tedavisi, medikal tedavi ve egzersizdir (Salman 2004). Obezitenin artışıyla T2DM giderek artmaktadır. Farmakolojik olmayan tedaviyi diyet, kilo kontrolü, düzenli egzersiz oluşturur. (Tonyukuk Gedik 2007).

Doğru egzersiz planlanması, diyabet tedavisinde başarıya ulaşmada önemlidir. Çünkü egzersiz, diyabetli bireyde insüline duyarlılığı artırarak kan şekerini düşürmek, kilo fazlası olanlarda kilo kaybını kolaylaştırmak, lipid metabolizması üzerine olumlu etkiler gibi yararlar sağlamaktadır. Ancak bu olumlu etkilerin oluşabilmesi için ortamda insülin bulunmalıdır (Salman 2004).

Diabet tanısı alan hastalarda ilk etapta pre-obezite veya obezite söz konusu ise aşırı kilolarını vermeleri gereklidir. Hastaların ideal kilolarını hesaplamada vücut kitle indeksi (VKİ) kullanılmalıdır. Bu değerin optimali 20-25 kg/m2 arasıdır (Turhan 2007).

VKİ=Kilo / Boy x Boy (m2)

İstenilen kiloya ulaşabilmek için uyulması gereken bazı hususlar vardır. Düşük kalorili diyet ile beslenmelidir (Aktif olan hastalar için genellikle günlük 900-1000 kalori yeterlidir). Günlük beslenmede yağ oranı %20'ye düşürülmelidir. Beslenirken kompleks karbonhidratlar seçilmelidir. Lifli posalı yiyecekler tercih edilmelidir. Doymamış yağların kullanılması plazma lipidlerinin belli seviyede tutulmasını sağlar. Kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi açısından, alkol ve sigara kesilmelidir (Turhan 2007).

T2DM'li hastalarda ideal tedavi diyet ve egzersizle, glikoz metabolizmasının regülasyonudur. Fakat bu önlemler hastaların dörtte üçünde yeterli olmamakta ve oral antidiabetik ilaç veya insülin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Tamer 1998).

T2DM'li bir hastada tedavi stratejisi geliştirilirken olayın yalnızca glukoz toleransı olmayıp aynı zamanda dislipidemi, hipertansiyon, obezite, pıhtılaşma bozuklukları, mikroalbuminüri ve hızlandırılmış ateroskleroz gibi kompleks metabolik sendromun bir parçası olduğu unutulmamalıdır (DeForonzo 1999).

1.2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus ve genetik

Yaşam tarzı ve aşırı beslenmenin tetikleyici patojenik faktörler gibi görünmesine rağmen, T2DM'nin patogenezinde genetik faktörler de yer alır (Tahmiscioğlu 2008). T2DM'nin aile kuşakları içerisinde kümeleşmesi, etnik gruplarda yüksek oranda görülmesi ve tek yumurta ikizlerinde yüksek konkordans yüzdesi (%50-95) genetik bir yönü olduğunu göstermektedir (Arslan ve ark 2001, Williams ve Pickup 2004).

T2DM insidansı Hispanik/Latin, Amerika'daki ve Avustralya'daki Aborjinler, Pasifik ve Hint Okyanusu ada toplumları ve Hindistan altkıta insanları gibi belirli etnik toplumlarda özellikle yüksektir (Burant 2004). Diyabet gelişimi için ailede T2DM hikayesi bir diğer önemli risk faktörüdür. Aile öyküsünün mevcut olması tip 2 diyabet riskinin 2-4 kat artmış olduğunu gösterir. Tip 2 diyabetli hastaların % 15-25'inin birinci derece akrabalarında, bozulmuş glukoz toleransı ve diyabet gelişir (Tahmiscioğlu 2008).

Genetik faktörler, monogenik ve poligenik olmak üzere iki gruba ayrılır. Monogenik form tek bir gendeki nadir mutasyonlardır. Protein işlevini değiştirirler. Yüksek fenotipik penetrans ve erken yaşta tanı ile karakterizedirler. Monogenik form T2DM'nin küçük bir kısmını oluşturur. HNF-1α (hepatocyte nuclear factor-1α), HNF-4α (hepatocyte nuclear factor-4α), Glukokinaz, IPF1 (insulin promoter factor 1), mitokondrial genler, insülin reseptör genleri, PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), AKT2 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2) monogenik grupta yer alan genlerdir. Poligenik form ise çevresel ve genetiksel faktörler arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Genlerdeki polimorfizm sıklığı ile ilişkilidir. Polimorfik alleler sağlıklı bireyler ve T2DM'li bireylerde farklı sıklıkta mevcuttur. Bu dizilim farklılıkları hastalığın gelişim riskini sınırlı bir şekilde etkileyebilir. Ancak hastalığın belirlenmesinde ana faktör değildir. Poligenik T2DM genellikle ilerleyen yaşlarda ortaya çıkmaktadır ve glisemi seviyesinde artışa neden olmaktadır (McCarthy ve Froguel 2002, Malecki 2005).

Yapılan çalışmalar genetik yatkınlığı olan bireylerin yeme alışkanlığı, gebelik hali, cerrahi stres ve steroid gibi ilaçların tedavi amaçlı olarak alınması T2DM riskini artırabildiğini göstermiştir (Arslan ve ark 2001).

T2DM'nin gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen birçok aday gen bulunmaktadır. Bu genler pankreatik β-hücre fonksiyonu, insülin aktivitesi (insülin reseptör sinyal yolu, insülin aktivitesinin negatif düzenleyicileri, karbohidrat metabolizması), lipid metabolizması ve enerji homeostazisi ile ilgili proteinleri kodlayan genler olarak sınıflandırılabilir (Barroso ve ark 2003). Calpain-10, ABCC8 (ATP-binding Cassette, Sub-family C (CFTR/MRP), Member 8), KCNJ11 (Potassium channel inwardly rectifying subfamily J, member 11), IRS1 (Insulin receptor substrate 1) ve IRS-2 (Insulin receptor substrate 2) aday genlerden bazılarıdır (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6: T2DM gelişimine aday başlıca genler.

Gen	Lokus	Varyant
Calpain-10	2q37.3	A43G
KCNJ11	**11p15.1**	**Glu23Lys**
ABCC8	11p15.1	Ser1369Ala
PPAR γ	**3p25**	**Pro12Ala**
TCF7-L2	10q25.3	—
HNF4α	**20 q13.1-13.2**	—

1.3. Calpain'ler

Calpain'ler, Ca^{+2} ile aktive edilen sitoplazmik sistein proteinaz ailesinin üyeleridir (Goll ve ark 2003, Suzuki ve ark 2004). İlk kez yaklaşık 30 yıl önce tanımlanmıştır (Guroff 1964). İlerleyen yıllarda Calpain 1 (μ-Calpain) ve Calpain 2 (m-Calpain) olmak üzere 2 tane Calpain sınıflandırılmıştır (Yoshimura ve ark. 1983). Günümüzde tanımlanan en az 15 tane Calpain geni bulunmaktadır (Goll ve ark 2003, Suzuki ve ark 2004). Calpain ailesi üyeleri yüksek organizmalarda birçok dokuda eksprese edilmektedir. Ayrıca Calpain katalitik alt ünitenin homoloğu nematod, bitki, sinek ve mayaları içeren birçok organizmada bulunur (Perrin ve Huttenlocher 2002, Swapan ve ark 2003).

Calpain'ler, hücre iskeleti yeniden düzenlenmesi ile apoptozis ve doku hücrelerinin yeniden yapılanmasında (proliferasyon, farklılaşma ve transformasyon) rol oynamaktadır (Horikawa 2006). Calpain'leri kodlayan genlerdeki mutasyonlar çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (çizelge 1.7).

Çizelge 1.7: Calpain ailesi ve hastalıklarla ilişkisi.

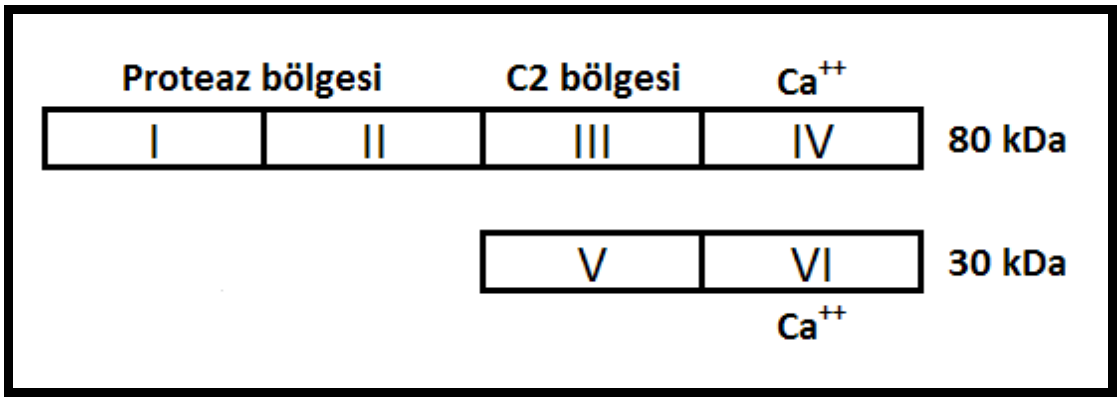
Calpain	**Hastalık**
Calpain 1	İnme, Travmatik beyin hasarı, Alzheimer, katarakt
Calpain 2	İnme, Travmatik beyin hasarı, Alzheimer, katarakt
Calpain 3	Ekstremite-kavşak tip kas distrofisi 2A, katarakt
Calpain 9	Mide kanseri
Calpain 8 / 10	Tip 2 diabetes mellitus

Calpain-8 ve Calpain-10 tip 2 diabetes mellitusla, Calpain-9 mide kanseriyle, Calpain-3 musküler distrofiyle ilişkilidir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklar (örn: Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), iskemi ve miyokard enfarktüsüne neden olan Calpain üyeleri de bulunmaktadır (Squier ve ark 1994, Swapan ve ark 2003, Horikawa 2006). Hücre iskeleti proteinleri, aktin bağlayıcı proteinler, kalmodulin bağlayıcı proteinler, hormon reseptörleri, hücre membran hormon reseptörleri, glukozu metabolize eden enzimler, sinyal iletimini düzenleyen enzimler ve transkripsiyon faktörleri Calpin'ler için bilinen substratlardır (Çizelge 1.8). Calpain-4 eksikliği olan transgenik fareler kardiyovasküler sistem gelişemediği için embriyonik gelişim sırasında ölürler (Croall ve Demartino 1991). Calpain-1 eksikliği olan transgenik fareler ise, Calpain-2 Calpain-1'in yerini aldığı için normal gelişim gösterir fakat farede sıklıkla trombosit agregasyon hastalığı gözlenir (Horikawa 2006).

Çizelge 1.8: Calpain proteini substratları.

CALPAİN PROTEİNİ SUBSTRATLARI
A. İskelet kas sistem proteinleri
Aktin bağlayıcı proteinler (spektrin, talin, filamin, α-aktinin)
B. Membran proteinleri
Büyüme faktörü reseptörleri (EGF reseptörleri)
Adhezyon molekülleri (integrin, kaderin, N-CAM),
İyon transport molekülleri (Ca - ATPaz)
C. Enzimler
Kinazlar (Protein kinaz C, myozin hafif zincir kinaz, kalmodulin-bağımlı kinaz, pp60)
Fosfatazlar (kalsinörin)
Fosfolipazlar (fosfolipaz C)
D. Diğer
Sitokinler (IL-1α)
Transkripsiyon faktörleri (Fos, Jun)
Lens proteinleri (kristallinler)

Calpain'lerin iki önemli izoformu m Calpain'ler (CAPN1) ve μ Calpain'lerdir (CAPN2). Aktiflenmeleri için m Calpain'ler milimol seviyelerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarına ihtiyaç duyarken, μ Calpain'ler ise mikromol düzeylerinde Ca^{+2} konsantrasyonlarında aktiflenirler. Bu Calpain'ler 80 kDa katalitik ve 30 kDa regülatör alt ünitelerden (CAPN4) oluşan heterodimerlerdir. 80 kDa'luk alt ünite dört bölge (I-IV), 30 kDa'luk alt ünite ise 2 bölge (V-VI) içerir (Hosfield ve ark 1999, Strobl ve ark 2000) (şekil 1.2). Calpain kelimesi geleneksel olarak 80 kDa ve 30 kDa'dan oluşan heterodimer μ ve m Calpain'ler için kullanılmaktadır. Ancak 80 kDa kendi başına tamamen aktif olduğu için Calpain kelimesi günümüzde artık 80 kDa için kullanılmaktadır (Suzuki ve ark 2004).

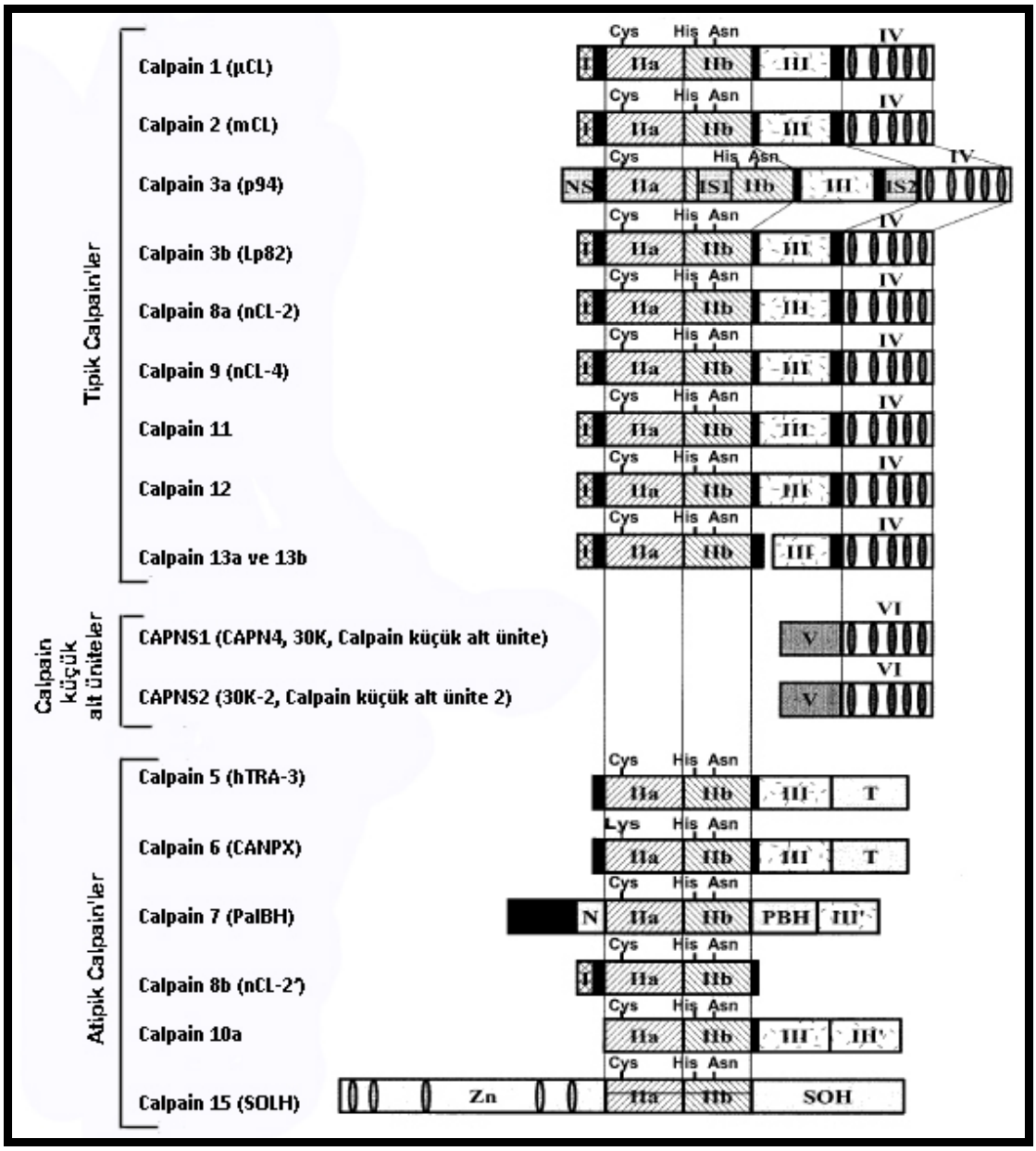


Şekil 1.2. m-Calpain, μ-Calpain ve onların 30 kDa regülatör alt ünitesinin yapısı (Perrin ve Huttenlocher 2002).

Calpain 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 ve 13; m-Calpain ve μ-Calpain'de bulunan 4 bölgeden oluşur ve tipik Calpain'ler olarak isimlendirilirler. Calpain 1, 2 ve 9; 30 kDa ile etkileşerek heterodimer oluştururlar. Fakat Calpain 3, 8, 11 ve 12; 30 kDa ile etkileşime girmez ve heterodimer oluşturmaz. Calpain 5, 6, 7, 8b, 10a ve 15'de bazı bölgeler yoktur veya bazıları 2 tekrarlıdır ve atipik Calpain'ler olarak isimlendirilirler. Atipik Calpain'lerde IV. bölge eksiktir ve 30 kDa ile bir dimer oluşturmazlar (Horikawa 2006, Suzuki ve ark 2004) (Şekil 1.3).

Calpainler genellikle sitozolde ubikuitöz olarak eksprese edilirler. Fakat doku spesifik Calpain'ler de mevcuttur. Calpain 1, 2, 5, 7, 10, 13 ve 15 ubikuitöz Calpain'ler, Calpain 3, 6, 8, 9, 11 ve 12 ise doku spesifik Calpain'lerdir (Huang ve Wang 2001, Sorimachi ve Suzuki 2001) (Çizelge 1.9).

Hücre içi kalsiyum seviyelerine Calpain'lerin hassasiyeti membran fosfolipitleri sayesindedir (Swapan ve ark 2003, Wingrave ve ark 2003). Calpain'lerin Ca^{+2} afinitesini arttıran aktivatör proteinlerin varlığında Calpain aktivasyonu başlar (Suzuki ve ark 1995). Aktif Calpain membranlarda bulunur. Calpain'lerin aktivasyonlarında veya inaktivasyonlarında fosforilasyon ve membrandaki lokalizasyonları önemli rol oynar (Ray ve ark 2000, Suzuki ve ark 1995).



Şekil 1.3. Calpain ailesi (Suzuki ve ark 2004).

Çizelge 1.9: İnsan Calpain gen ailesi (Suzuki ve ark 2004).

protein	gen	diğer adı	doku dağılımı	kromozom	aminoasit
Calpain 1	CAPN1	μ-Calpain büyük alt ünite	ubikuitöz	11q12-13.1	714
Calpain 2	CAPN2	m-Calpain büyük alt ünite	ubikuitöz	1q32-41	700
Calpain 3	CAPN3	p94, nCL-1	iskelet kası	15q15	821
Calpain 5	CAPN5	hTRA-3, nCL-3	ubikuitöz	11q14	640
Calpain 6	CAPN6	CANPX	plasenta, embriyonik kas	Xq23	641
Calpain 7	CAPN7	PalBH	ubikuitöz	3p24	813
Calpain 8	CAPN8	nCL-2	mide	1q32-41	703
Calpain 9	CAPN9	nCL-4	sindirim yolları	1q42.1-43	690
Calpain 10	CAPN10	—	ubikuitöz	2q37.3	672
Calpain 11	CAPN11	—	testis	6p12	702
Calpain 12	CAPN12	—	saç folikülü	19q13	720
Calpain 13	CAPN13	—	ubikuitöz	2p21-22	423
Calpain 14	CAPN14	—	tespit edilmedi	2p21-22	?
Calpain 15	SOLH	SOLH	ubikuitöz	16p13.3	1086
CAPNS1	CAPNS1	Calpain küçük alt ünite, 30K, CAPN4	ubikuitöz	19q13	268
CAPNS2	CAPNS2	Calpain küçük alt ünite 2	ubikuitöz	16q13	248

1.4. Calpain-10 (CAPN10)

İnsan Calpain-10 geni 2. kromozomun q37.3 bandında bulunmaktadır ve 15 ekzondan oluşmaktadır. 31 kb uzunluğundadır (Horikawa ve ark 2000). Calpain-10 geninin uluslararası sembolü CAPN10'dur. En az 8 izoforma sahiptir (Calpain-10a-h). Dokularda en fazla bulunan, en uzun izoformu olan Calpain-10a 672 amino asitten oluşmaktadır (Horikawa ve ark 2000) (şekil 1.4). Faredeki Calpain geni ile %81,7 benzerlik göstermektedir (Hanis ve ark 1996).

Calpain-10a, IV. domain yerine III. domain'in bulunduğu bir atipik Calpain'dir ve en fazla kalpte ifade edilir. Ayrıca glukoz metabolizmasında rol oynayan çeşitli dokularda, karaciğerde, kasta, pankreas adacıklarında ve yağ dokularında saptanmıştır (Horikawa ve ark 2000, Suzuki ve ark 2004). Calpain-10c ve 10g birçok dokuda bulunmasına rağmen, Calpain-10b, 10d, 10e ve 10f daha az miktarda bulunmaktadır (Horikawa ve ark 2000).

Calpain-10'da II. ve III. bölgelerdeki kalsiyum-bağlayıcı kısımlar olmadığı için, kalsiyum tarafından proteinin aktive edilip edilmediği bilinmemektedir. Ayrı bir mekanizma içinde kalsiyum ile etkileşime girdiği düşünülmektedir (Ma ve ark 2001).

1	MRAGRGATPA	RELFRDAAFP	AADSSLFCDL	STPLAQFRED
41	ITWRRPQEIC	ATPRLFPDDP	REGQVKQGLL	GDCWFLCACA
81	ALQKSRHLLD	QVIPPGQPSW	ADQEYRGSFT	CRIWQFGRWV
121	EVTTDDRLPC	LAGRLCFSRC	QREDVFWLPL	LEKVYAKVHG
161	SYEHLWAGQV	ADALVDLTGG	LAERWNLKGV	AGSGGQQDRP
201	GRWEHRTCRQ	LLHLKDQCLI	SCCVLSPRAG	ARELGEFHAF
241	IVSDLRELQG	QAGQCILLLR	IQNPWGRRCW	QGLWREGGEG
281	WSQVDAAVAS	ELLSQLQEGE	FWVEEEEFLR	EFDELTVGYP
321	VTEAGHLQSL	YTERLLCHTR	ALPGAWVKGQ	SAGGCRNNSG
361	FPSNPKFWLR	VSEPSEVYIA	VLQRSRLHAA	DWAGRARALV
401	GDSHTSWSPA	SIPGKHYQAV	GLHLWKVEKR	RVNLPRVLSM
441	PPVAGTACHA	YDREVHLRCE	LSPGYYLAVP	STFLKDAPGE
481	FLLRVFSTGR	VSLSAIRAVA	KNTTPGAALP	AGEWGTVQLR
521	GSWRVGQTAG	GSRNFASYPT	NPCFPFSVPE	GPGPRCVRIT
561	LHQHCRPSDT	EFHPIGFHIF	QVPEGGRSQD	APPLLLQEPL
601	LSCVPHRYAQ	EVSRLCLLPA	GTYKVVPSTY	LPDTEGAFTV
641	TIATRIDRPS	IHSQEMLGQF	LQEVSVMAVM	KT

Şekil 1.4. Calpain10a'nın aminoasit dizisi.

1.4.1. Calpain-10'un insülin direnci ve salınımı üzerine etkisi

CAPN10 genindeki genetik farklılıkların yüksek serbest yağ asitleri ve insülin direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ortho-Malender ve ark 2002). Ayrıca artmış mikrovasküler aktivite, yağ hücrelerinde azalmış beta3-adrenoseptör aktivitesi, polikistik over sendromu ve kan glukozu üzerine etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Gonzalez ve ark 2002, Hoffstedt ve ark 2002a, Lynn ve ark 2002, Shore ve ark 2002, Carlsson ve ark 2004).

In vitro çalışmalar (Griffin ve ark 1999) serbest yağ asitlerinin protein kinaz C'yi aktive ettiğini göstermiştir. İnsülin reseptörlerinin aşırı fosforillenmesi, bu reseptörlerin kinaz aktivitesinde azalmaya yol açar (Griffin ve ark 1999). Böylece insülin direnci artar. Bu yüzden protein kinaz C aktivitesinin kontrolü (aşağı regülasyonu, downregulation) insülin reseptörlerinin uygun fosforilasyon düzeylerinde kalması için önemli bir faktör olarak gözükmektedir (Itani ve ark 2000). CAPN-10'daki SNP'lerden özellikle 3. intronundaki SNP-43'ün mRNA ekspresyonunu etkilediği ortaya konmuştur (Baier ve ark 2000). G/G genotipli bireyler daha düşük Calpain mRNA düzeylerine sahiptir (Baier ve ark 2000). Protein kinaz C, Calpain'in iyi bilinen bir in vivo substratı olduğu için, düşük Calpain düzeyi insülin sinyalini azaltarak protein kinaz C aktivitesinin yukarı regülasyonuna (upregulation) yol açarak insülin direnciyle sonuçlanmaktadır (Suzuki ve ark 2004)

Fare pankreatik ada hücrelerinin Calpain inhibitörlerine kısa süreli maruz bırakılması glukozla indüklenen insülin salınımını artırır. Fakat adipositler ve iskelet kası içine insülin uyarıcı glukoz alımını ve kaslardaki glikojen sentez oranını azaltır. Ancak bu görüş kısmen desteklenmektedir. Çünkü insülin sinyal yolundaki Calpain etkisinin tam yeri bilinmemektedir (Sreenan ve ark 2001).

Calpain-10'un proteaz aktivitesi henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Atipik Calpain-10'un kalsiyum duyarlılığı tipik Calpain'lerden önemli bir şekilde farklıdır (Barnoy ve ark 2000). Calpain membran füzyonunda rol oynamaktadır (Barnoy ve ark 2000) ve hücresel sinyallere aracılık eden kinazlar, reseptörler ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli proteinleri hidroliz etmektedir (Suzuki ve ark 2004). Ayrıca Calpain preadipositlerin adipositlere farklılaşması için önemlidir (Suzuki ve ark 2004). Bu etkiler Calpain'in insülin salınımı ve etkisine aracılık etmesini artırır.

İskelet kaslarında, karaciğer ve pankreasta çeşitli Calpain'ler ekprese edilir. Calpain inhibitörleri kullanılarak Calpain etkisi üzerine yapılan çalışmalar Calpain-10 dışındaki diğer Calpain'lerin de insülin salınımına ve etkisine aracılık ettiğini göstermiştir (Suzuki ve ark 2004). Calpain tarafından birçok adım modüle edilebildiği için Calpain ile T2DM'nin ilişkisini açıklayıcı moleküler ve fizyolojik mekanizmaları aydınlatmak üzere daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmektedir (Suzuki ve ark 2004).

1.4.2. Calpain-10 ve Tip 2 Diabetes Mellitus arasındaki ilişki

Son yıllarda T2DM'ye yatkınlıkta rol oynayan yüzlerce gen incelenmiştir. Fakat yanlızca birkaç tanesinin hastalığa etkisi kanıtlanmıştır. Meksikalı-Amerikalı popülasyonda T2DM'nin CAPN10 geni ile bağlantısı yıllar süren yoğun araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (Hanis ve ark 1996, Horikawa ve ark 2000). CAPN10 geni Horikawa ve arkadaşları tarafından T2DM ile ilişkili ilk gen olarak tanımlanmıştır (Horikawa ve ark 2000). T2DM oluşum riski, CAPN10 genindeki SNP-19, -43 ve -63'ün oluşturduğu haplotipde, genin diğer SNP'lerine kıyasla çok daha yüksektir. Bu 3 SNP intronlarda lokalize olmuştur. Böylece proteinin aminoasit yapısını etkilememektedir. Ancak CAPN10 gen ekspresyonunu etkilediği öne sürülmektedir (Horikawa ve ark 2000).

CAPN10 geninin T2DM ile olan ilişkisi gündeme geldikten sonra değişik etnik gruplarda çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. T2DM patogenezinde CAPN10'un önemi toplumlara göre değişmektedir. Bir kısmında CAPN10 genindeki polimorfizmlerin T2DM riskini arttırdığı saptanırken, bir kısmında ise bu ilişki saptanamamıştır. Örneğin bu gendeki polimorfizmler Meksikalı-Amerikalılarda ailesel grupların yaklaşık %40'ında sorumlu iken İngiliz populasyonunda bu oran birkaç kat daha düşüktür (Horikawa ve ark 2000, Evans ve ark 2001). CAPN10'un T2DM riskine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar tutarsızdır (Horikawa ve ark 2000, Evans ve ark 2001). Calpain-10 diğer proteinlerin parçalanmasında iş görmektedir (Sorimachi ve ark 1997). Ayrıca apoptosizi düzenleyici etkisi olduğu da ortaya konmuştur (Sorimachi ve ark 1997). Bununla birlikte bozulmuş glukoz metabolizması gibi Calpain-10'un ilişkili olduğu moleküler mekanizmalar hala aydınlatılmayı beklemektedir. Bu moleküler mekanizmalar muhtemelen insülin direnci ve insülin salınımındaki bozuklukları da içermektedir

(Sreenan ve ark 2001). Proteaz inhibitörleri ile tedavi edilen AIDS hastalarında bozulmuş glukoz toleransının oluşumu, bir proteaz olan Calpain'in de T2DM'nin patogenezindeki rolünün anlaşılabilmesinde örnek bir mekanizma oluşturmaktadır (Martinez ve ark 1999).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Hasta grubu, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyetine başvuran T2DM teşhisi konmuş hastalardan oluşturuldu. Çalışmaya alınan hasta grubu insülin kullanmayan, 40 yaşın üzerinde, vücut kitle indeksleri (VKİ) 30'un altında, akraba olmayan hastalardan; kontrol grubu ise ailesinde diyabet hikayesi olmayan, oral glukoz tolerans testi (OGTT) normal, 40 yaşın üzerindeki gönüllü bireylerden oluşturuldu. Çalışmaya 168 hasta ve 59 birey kontrol grubu olarak dahil edildi. Moleküler çalışmalar Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

2.2. Biyokimyasal Tetkikler

Biyokimyasal tetkiklerde kullanılmak üzere falkon tüplerine 10 ml kan alındı. Glukoz, insülin, HbA1c, C-peptid, kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliserid düzeylerine bakıldı. Kontrol grubundaki bireylere 9-16 saatlik açlıktan sonra sabah saat 8'de OGTT yapıldı. 300 ml suda eritilen 75 gr glukoz bir limon sıkılarak limonata şeklinde içirildi. OGTT yapılmadan önce ve glukoz içirildikten sonra 1. ve 2. saatlerde kan örneği alınarak glukoz, insülin, C-peptid ve HbA1c değerleri için analizleri yapıldı. OGTT diabetin tanısı için kullanılan en duyarlı testtir. Glikoz alımından 2 saat sonra ölçülen kan şekeri sonucu 200 mg/dL ise diabet tanısı kesinleşti. Her bir hasta ve kontrol için HOMA-IR (Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

HOMA-IR = açlık insülin (mU/L) x açlık glukoz (mmol/L) / 22.5

2-2,5'un üzerindeki oranda olan hasta ve kontrol grubu bireyleri insüline dirençli kabul edildi.

2.3. DNA Eldesi

2.3.1. Solüsyonların hazırlanması

0,5 M EDTA

EDTA ……..…….18,61 gr

dH_2O ……..……..... 80 ml

1 M Tris-HCl

Tris-HCl ……... 15,76 gr

dH_2O …….……... 83 ml

4 M NaCl

NaCl …….…… 23,97 gr

dH_2O ……... 76,03 ml

Üreli Parçalama Çözeltisi

Üre ……... 4.2 gr

dH_2O ……. 10 cc

10x parçalama çözeltisi…… 1 cc

10x Parçalama Çözeltisi

3 M NaCl …….. 75 ml

100 mM TrisHCl ……... 10 ml

100 mM EDTA ……. 20 ml

pH 7.5 a ayarlandı. Otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

%20 SDS

SDS …… 20 gr

dH_2O …… 100 ml'ye tamamlandı.

%70 Etanol

%96 Etanol …… 72 ml

dH_2O ……100 ml'ye tamamlandı.

Proteinaz K (10 mg/ml)

Proteinaz K …… 10 mg

dH_2O ……... 1 ml

2.3.2. Teknik

1. GÜN

- 10 ml tüm kan EDTA'lı (0.5M – 300 µl) tüpe alınarak 1 gece için derin dondurucuda saklandı.
- Çalışmadan önce derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözdürüldü.
- 5 ml'si başka bir tüpe alınarak üzerine hacmi kadar soğuk dH_2O (distile su) eklendi ve iyice alt üst edildi. Daha sonra 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işleme renk açılana kadar devam edildi (3 kez).
- Süpernatan atıldı. Pellete 3 ml üreli parçalama çözeltisi eklendi (üreli parçalama çözeltisi taze hazırlandı). Pellet tamamen çözdürüldü. Alt üst edildi.
- 400 µl %20'lik SDS (sodyum dodesil sülfat) eklendi. Tekrar alt üst edildi.
- 100 µl 10 mg/ml proteinaz K eklendi ve alt üst edildi.
- 37 ^{0}C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2. GÜN

- İnkübasyondan çıkarılan örneklere 2 ml 5 M NaCl eklenerek 10-15 dakika alt üst edildi.
- Üzerine 8 ml kloroform konularak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada örnek süt görünümündedir.
- Santrifüj sonunda 3 ayrı faz oluşumu gözlendi. En üst faz temiz bir tüpe alınarak hacmi kadar %98'lik etil alkol veya izopropilalkol eklendi (yaklaşık 2,5 ml). DNA gözlenmediği takdirde alkol miktarı artırıldı.
- Etilalkolde yumak şeklinde oluşumu gözlenen DNA'lar içinde %70'lik etil alkol bulunan 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak alt üst edildi.
- Tüpler 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'ların yapışması sağlandı. Üzerindeki alkol dökülerek tekrar %70'lik etilalkol eklendi. Bu işlem en az 2 kez daha tekrarlandı.

- Yıkama işleminden sonra alkol tamamen dökülerek tüpler ağzı açık olarak vakumlu kurutucuya yerleştirildi ve yarım saat kurutuldu. Jelimsi kıvam gidene kadar kurutmaya devam edildi.
- Kuruyan DNA'ların üzerine miktarına göre (300 µl) dH_2O eklenerek derin dondurucuya kaldırıldı.

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hedeflenen nükleotid dizilerinin in-vitro olarak, uygun koşullar altında çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PZR istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşmaktadır.

2.4.1. PZR bileşenlerinin hazırlanması

dH_20……..……..……12,87 µl
10x tampon …….…….. 2 µl
MgCl2 (25 mM)…….……..1,3 µl
dNTP (10mM)…….1,4 µl
İleri primer (50 pmol)……..…….0,16 µl
Geri primer (50 pmol) …….…… 0,16 µl
Taq polimeraz enzimi (5µ/ µl, 500 u)……0,11 µl
DNA ……..2 µl

Her bir örnek için toplam 20 µl olacak şekilde buz üzerinde hazırlandı.

2.4.2. PZR basamakları

İlk denatürasyon……94 ºC ..... 5 dk
Denatürasyon……..94 ºC..... 30sn
Bağlanma…… .....30sn } 35 döngü
Uzama……72 ºC..... 30sn
Son uzama……...72 ºC ..... 2 dk

Her bir primer çifti için belirlenen bağlanma sıcaklığına göre PZR cihazına uygun program kuruldu ve örnekler cihaza yerleştirildi. Ekzon 10 için 61,4 ºC, İntron

3 için 60,2 ºC, İntron 6 için 63 ºC, İntron 13 için 62.4 ºC bağlanma sıcaklıkları kullanıldı.

2.4.3.Primer tasarımı

PZR yöntemi ile çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı özellikte 18-25 baz uzunluğunda, sentetik olarak sentezlenebilen oligonükleotidlere primer denir. Bu diziler çeşitli tasarım programları kullanılarak hedeflenen gen bölgesine özgü olarak sentezlenmektedir. Primer tasarımında genel olarak dikkat edilmesi gereken bazı noktalar bulunmaktadır. Öncelikle primer dizisi hedeflenen DNA'ya özgün olmalıdır, bu nedenle hedeflenen bölgenin dizisi bilinmelidir. Primer genelinde G/C oranı %45-55 olmalıdır. İleri ve geri primerlerin seçiminde birbirlerine yakın Tm değerlerine sahip olmalarına, bu aralığın 55-65º C arasında olmasına özen gösterilmelidir. Ayrıca primerlerin kendi içinde veya birbirleri ile tamamlayıcı olmamalarına dikkat edilmelidir.

Calpain-10 geninin gen dizisi ve SNP'leri PubMed NCBI Gen Bankasından bulundu (Erişim Numarası: NM_023083). Literatürde hastalıkla ilişkili olarak belirtilen SNP'lerin bulunduğu bölgeler tarandı (Çizelge 2.1). Primerler, www.idtdna.com adresindeki online primer tasarlama programı ile tasarlandı. Tasarlanan primer çiftleri çizelge 2.2'de, primerlerin bölgelere yerleşimleri ise şekil 2.2 ve 2.3'de gösterilmiştir.

Primer çiftlerinin en verimli çalıştığı erime sıcaklığını tespit etmek ve tepkime koşullarını iyileştirmek için önce gradient PZR yapıldı. Daha sonra hedef gen bölgeleri tespit edilen uygun sıcaklıklarda çoğaltıldı.

Çizelge 2.1: Hastalıkla ilişkili olan SNP'lerin bulunduğu bölge ve allel değişikliği.

NCBI SNP no	**Polimorfizm**	**Bölge**	**Allel**	**Nükleotid**
rs 2975760	SNP44	İntron 3	T/C	4841
rs 3792267	SNP43	İntron 3	G/A	4852
rs 3842570	SNP19	İntron 6	INS/DEL	7920
rs 7607759	SNP110	Ekzon 10	A/G (T504A)	9803
–	SNP137	Ekzon 10	C/T (R555C)	9956
rs 5030952	SNP63	İntron 13	C/T	16378

Çizelge 2.2: Tasarlanan primer çiftleri ve ürün büyüklükleri.

Ekzon (E) İntron (İ)	PRİMER (5'› 3') İleri	Geri	Ürün Büyüklüğü (bç)	Teknik
İ-3	AGAGAGTTTCTGTGTGTGGGCAGA	AAATCGTCCAACCGCTGCCTCAAT	155	SSCP
İ-6	CCAGTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGA	AAACACCAGGCATCAGCTGTGGGA	217	SSCP
E-10	CCTCCCATGTTTGTCTTCTTGGCA	TGCCTGGAAGATATGGAAGCCGAT	290	SSCP
E-10	CGCCATCAGGGCAGTGGCCAAGAACAGC	CAGAGTGATGCGGACGCAGCG	202	RFLP
İ-13	TGGTCACTGGATGTTGCTGACACT	AAGGTTCCACTCTCCAGCCTCTTA	142	SSCP
İ-13	AAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGGCG	AGCACTCCCAGCTCCTGATC	189	RFLP

İntron 3 (I-3)

TGGTGACATCAGTGCCCAGTGAGCCCTTCCATCCCAAGGGCTGTTTTAGGAAAAGCAGGG
TTGGAGCTTGAGAGCCAAGGGATGTGGGCATCCATAGCTTCCACGCCTCCTGCCCTGCTC
CTGTGCCCACACCGGATGCCAGAGAGTTTCTGTGTGTGGGCAGAGGACTGCAGGGCGCT
CACGCTTGCTGTGAAGTAAGGCGTTTGAAGGTGAGGCTAAGCCTTGACTTGGTGAGGAT
GAGGAAGAAGGCAGAGGGGAGTAAAGAGGTGGGATTGAGGCAGCGGTTGGACGATTTG
GGGTGCTACAGACCATGGGAATCAGAGAGGGGGCCATGCTCAATGCCAGAGGCTCACTC
CCATGGTGATTGTGTCCCCTAG

İntron 6 (I-6)

GTAGTGCCCCGAGGGGCTGTGCTGGGCACGTGCTCTGCCTGCCGAAGTGAGGAGGCTGG
GCAGGTGCCTGGGTTCCCCCTGCCCAGGCCCAGTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAGAGATG
ATTCTGTCCCAGGAGCCGGGAGGAGGGTGATGATTCTGTCCCAGGAGCTGGGAGGAG
GGTGGGCTTGTGGGAGGGGCTGGCTCTGTCTGTGGCCGTAGCTGCTGCTTAGACCCTGCC
AGGGTTCATGAGGCCACCATGGCGGGAGGCCAGCGAGGAGCCGTGTCCCACAGCTGATG
CCTGGTGTTTTCTCACTAG

Exon 10 (E-10)

CTGTGGTTGGCAGGTGTCCATGTGGGAACTGAGGCCACCGGGAACCTGCTGCCAGC
GCCCTCCCATGTTTGTCTTCTTGGCAGGCGCCATCAGGGCAGTGGCCAAGAACACCACC
CCCGGGGCAGCCCTGCCTGCGGGGGAGTGGGGGACCGTGCAGCTACGGGGTTCTTGGAG
AGTCGGCCAGACGGCGGGGGGCAGCAGGAACTTTGCCTCATACCCCACCAACCCCTGCT
TCCCCTTCTCGGTCCCCGAGGGCCCTGGCCCCCGCTGCGTCCGCATCACTCTGCATCAGC
ACTGCCGGCCCAGTGACACCGAGTTCCACCCCATCGGCTTCCATATCTTCCAG**GCAAGCT**
CCTTGCCCC

- Koyu siyah ile yazılan yerler intron bölgesidir.

İntron 13 (I-13)

…...……GCCCCGAGCTGGCCGGGCCCGCAGCCCACTCCCTGGTCACTGGATGTTGCT
GACACTTCACTCGGTCAGAGCCCTAGCACCCAAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGG
AGCGAGGGGTGGGCCGCGTCTGTGCAGGCTCAGAAGCTTCCTAAGAGGCTGGAGAGTGG
AACCTTCAGGCACCACGCACTGCCTCCTCCCTGCC……..

Şekil 2.2: Hastalıkla ilişkili SNP'lerin bulunduğu bölgeler ve SSCP çalışması için tasarlanan primerlerin yerleşimi. SNP'ler gri dolgu ile işaretlenmiştir. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

Exon 10 (E-10)

CTGTGGTTGGCAGGTGTCCATGTGGGAACTGAGGCCACCGGGAACCTGCTGCCAGC
GCCCTCCCATGTTTGTCTTCTTGGCAGCGCCATCAGGGCAGTGGCCAAGAACACCACC
CCCGGGGCAGCCCTGCCTGCGGGGGAGTGGGGGACCGTGCAGCTACGGGGTTCTTGGAG
AGTCGGCCAGACGGCGGGGGGCAGCAGGAACTTTGCCTCATACCCCACCAACCCCTGCT
TCCCCTTCTCGGTCCCCGAGGGCCCTGGCCCCCGCTGCGTCCGCATCACTCTGCATCAGC
ACTGCCGGCCCAGTGACACCGAGTTCCACCCCATCGGCTTCCATATCTTCCAG**GCAAGCT**
CCTTGCCCC

İntron 13 (I-13)

…...……GCCCCGAGCTGGCCGGGCCCGCAGCCCACTCCCTGGTCACTGGATGTTGCT
GACACTTCACTCGGTCAGAGCCCTAGCACCCAAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGG
AGCGAGGGGTGGGCCGCGTCTGTGCAGGCTCAGAAGCTTCCTAAGAGGCTGGAGAGTGG
AACCTTCAGGCACCACGCACTGCCTCCTCCCTGCCCACGGTCCTGGTTTCTCCAGATGGG
GCCTTGGCCTTGGCTAGGTGTTGATCAGGAGCTGGGAGTGCTGCGCCCCGCCCAACTTCT
CCAAACTCCAGCCAGGGCACCTCAGTGAGGCCTCAGCCACCTGCGCCTTATTTGCTTCCT
CCTTGGAGGCCCTCGTGTCTGTTCATTCATCAAACAGCAGCTGGGGCCCCCAGCAGACCC
CCTTCCCCAACTTTC

Şekil 2.3: Hastalıkla ilişkili SNP'lerin bulunduğu bölgeler ve RFLP çalışması için tasarlanan primerlerin yerleşimi. SNP'ler gri dolgu ile işaretlenmiştir. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerinde hareketine dayanmaktadır. Bu hareketin hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayrılamayan DNA fragmanlarının ayrılabilmesini sağlamasıdır. UV ışığı altında fluoresan etki gösteren etidyum bromür (EtBr) boyasının kullanımı ile çok düşük konsantrasyonlarda (1–10 ng) olsa bile, DNA'nın jel üzerindeki yerini belirlemek mümkündür.

2.5.1. Solüsyonların hazırlanması

0.5 M EDTA

EDTA …….18,6 gr
Disitile su ……..…… 80 ml
NaCl .....……..2 gr

Manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve NaOH ile pH 8' e ayarlanır.

50xTAE

Tris baz ……24,2 gr
Glasiel asetik asit …… 5,71 ml
0.5 M EDTA (pH 8)…….. 10 ml
Disitile su …… 100 ml'ye tamamlanır.

1xTAE

50xTAE …….10 ml
Disitile su …… 490 ml

%1.5'luk Agaroz jel

Agaroz …….....1,5 gr
1xTAE……..……100 ml

% 3,5'luk Agaroz jel

Agaroz …….....3,5 gr

1xTAE……..……100 ml

Agaroz ve TAE bir erlen içerisine ilave edilerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözününceye kadar kaynatıldı. Çeker ocaklı kabine alındı. İçine 5 µl etidyum bromür ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Birkaç dakika soğumaya bırakıldı. Yatay elektroforez tepsisine üzerinde herhangi bir kabarcık kalmamasına dikkat edilerek döküldü. Agaroz jel bu şekilde 15 - 30 dakika bekletildikten sonra kullanıldı. Etidyum bromür güçlü bir mutajenik ajan olduğu için jel dökme işlemi çeker ocaklı kabin içerisinde yapıldı.

2.5.2. Örneklerin jele yüklenmesi

DNA……..6 µl

6x jel yükleme solüsyonu……..2 µl

Agaroz jelin tamamen donmasının ardından, ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla, DNA ile yükleme boyası karıştırılarak kuyulara yüklendi. Jel yükleme solüsyonu örneğin kuyuya oturmasına ve elektroforez sırasında örneğin takip edilmesine imkân vermektedir. Ayrıca bant büyüklüklerinin karşılaştırılabilmesi amacı ile bant büyüklükleri bilinen bir DNA standardı (marker) da jele yüklendi.

Örnekler ortalama 100-200 V arasında 30 dakika yürütüldü.

Elektroforez işleminin ardından UV ışık altında görüntüleme sistemi ile bantların değerlendirmesi yapıldı.

İntron 6'da bulunan SNP19, bir delesyon/insersiyon polimorfizmidir. Polimorfizmi belirlemek için örnekler %3,5'luk agaroz jelde 100 V'da 1 saat yürütüldü. Gözlenen bantlar, büyüklüklerine göre değerlendirildi.

2.6. SSCP Tekniği

SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism = Tek Zincir Biçim Çeşitliliği) analizi, bilinmeyen mutasyonların saptanması için kullanılan PZR'a bağlı bir mutasyon tarama yöntemidir. Bu yöntem nokta mutasyonlarının yanısıra küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının saptanmasında da tercih edilmektedir. Mutasyon saptama oranı %80 ile %90 arasında değişmektedir.

Bu yöntemde PZR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jele uygulanır. Denatüre edilerek tek zincir haline getirilmiş DNA'ların zincir içi zayıf bağlarla kazandıkları yeni ikincil yapıları mutasyon sonucu değişebilir. Mutasyon sonucu oluşan bu ikincil yapıda oluşan konformasyon farkı o bölgenin elektroforezdeki hareketinde normal kontrol ile karşılaştırıldığında bir kaymaya, farklılığa neden olur. SSCP analizi genellikle tek iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerinden yararlanılarak mutasyonun varlığını tahmin etmekte kullanılmaktadır.

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri, elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforetik hız, tek zincirli nükleik asitlerin büyüklükleri ve dizileri analizden alınacak sonucu etkiler.

2.6.1. Camların temizlenmesi ve jelin dökülmesi

%70'lik alkol kullanarak camların her iki tarafı silindi. %96'lık alkol ile sadece jelin döküleceği kısım ikinci kez silindi. Camların her iki tarafına aralık meydana getirmesi için aralık çubukları yerleştirildi. Camlar jel dökme aparatına yerleştirildi.

Jel hazırlanması (29 :1)

Akrilamid : Bisakrilamid stok …… 15 ml
1 x TBE ……...…..5 ml
dH_2O ……30 ml
APS …… 350 µl
TEMED …… 35 µl

Akrilamid : Bisakrilamid Stoğu (100 ml)

Akrilamid …….... 29 gr
Bisakrilamid ……. 1 gr

dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti whatmann filtresinden geçirildi.

APS (Amonyum Persülfat)

APS …….. 0,035 gr
dH_2O …….....350 µl

10 x TBE Tamponu

EDTA …… 9,37 gr
Trisbaz …… 108 gr
Borik asit …….. 55 gr
dH_2O …… 1000 ml'ye tamamlandı.
pH 8,3 e ayarlandı.

1 x TBE Tamponu

10 x TBE Tampon ……. 100 ml
dH_2O …….. 900 ml

Hazırlanan jel hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek iki camın arasına döküldü ve tarak yerleştirildi. Polimerize olması için 1,5 saat bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra jel dökme aparatından çıkarılıp, elektroforez tankına yerleştirdi ve tarak çıkarıldı. Elektroforez tankına 1x TBE konuldu ve pH dengesinin sağlanması için 125 V 40 mA 20 W'da ön yürütme yapıldı.

2.6.2. Örneklerin jele yüklenmesi

PZR ürünü ……..... 3 µl
SSCP tamponu ……..… 15 µl
olacak şekilde hazırlandı.

SSCP Tamponu

Bromofenol mavisi…… 0,025 gr
Ksilen siyanol ……... 0,025 gr
Formamid ……..…8 ml
dH_2O ……..... 2 ml

Ön yürütmenin bitmesine yakın PZR'da 95 ^oC'de 10 dakika denatüre edildi. Denatürasyondan sonra renatüre olmaması için en az 5 dakika buzda bekletildikten sonra örnekler jele yüklendi ve 17,5 saat yürütüldü.

2.6.3. Örneklerin görüntülenmesi (Boyama)

%10'luk Asetik Asit

Asetik asit ……. 25 ml
dH_2O ……... 250 ml'ye tamamlandı.

Gümüş Nitrat Çözeltisi

Gümüş Nitrat ……..... 0,3 gr
dH_2O ……..…. 250 ml
Formaldehit …….. 0,3 ml

Sodyum Karbonat Çözeltisi

Sodyum Karbonat …….…… 8,5 gr
dH_2O ……..…. 250 ml

Derin dondurucuda soğutulur. Kullanılmadan önce

Formaldehit …….. 0,9 ml
Soydum tiyosülfat …… 200 µl ilave edildi.

Soydum tiyosülfat (10 mg/ml)

Soydum tiyosülfat ……..… 0,06 gr
dH_2O ……..…. 6 ml

- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra camlar tanktan alındı ve jel camlardan çıkarıldı.
- 250 ml %10'luk asetik asitte 15 dakika çalkalama cihazında orta hızda çalkalandı.
- Asetik asitten alıp dH_2O'ya konuldu ve 10 dakika çalkalandı.
- 250 ml %2'lik gümüş nitrat çözeltisine alınarak 30 dakika çalkalandı.
- dH_2O'ya batırılıp, çıkarıldı.
- 250 ml %0.75'lik soğuk sodyum karbonat çözeltisinde bantlar görünene kadar çalkalandı.
- Bantlar görünür görünmez dH_2O'ya alınıp, 1-2 dakika çalkalandı.
- %10'luk asetik asitte 5 dakika çalkalandı.
- dH_2O'da 5 dakika çalkalandı.
- Jel asetat kağıtları arasına alınarak, tarayıcıda tarandı.
- SSCP'de farklı göç profili gösteren örnekler dizi analizi için Macrogen'e gönderildi.

2.7. Restriksiyon Enzim Kesimi

Restriksiyon Enzim Kesimi (RFLP) tek baz değişikliklerini veya farklı büyüklükte minisatellitleri belirleyebilen bir tekniktir. Restriksiyon endonükleazlarla DNA'nın farklı büyüklüklerdeki parçalara ayrılarak incelenmesine dayanmaktadır. Restriksiyon endonükleazlar, DNA molekülünü özgün tanıma sıralarından kesebilen enzimlerdir. Parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler.

PZR-SSCP yöntemiyle CAPN10 genindeki SNP-63 ve SNP-110 polimorfizmlerini belirlemek için planlanan bu çalışmada hasta grubunun yarısında sonuç alınamadı. Bunun üzerine Evans ve ark (2001)'ın aynı SNP'yi taramak için kullandıkları primerler ile aynı bölge yeniden PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Her iki SNP de *Hha*I enzimi ile kesildi. HhaI enziminin tanıma bölgesi ve kesim sonrası oluşan ürün büyüklükleri çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3: HhaI enziminin ürün büyüklükleri

Polimorfizm	Restriksiyon Enzimi	Enzimin çalışma sıcaklığı (°C)	Enzim tanıma bölgesi	PZR ürün büyüklüğü	Enzim kesiminden elde edilen parçaların büyüklüğü (bç)
SNP -110	Hhal	37	GCG↓C	202	A aleli: kesim yok G aleli: (173+29 bç)
SNP -63	Hhal	37	GCG↓C	189	C aleli: (159+30 bç) T aleli: kesim yok

2.7.1. Reaksiyon karışımının hazırlanması

dH_20……...……...17 µl
Enzim tamponu…….…. 2 µl
Enzim …….…..……... 1 µl
PZR ürünü…….. 10 µl

Toplam hacim 30 µl olacak şekilde hazırlanan tüpler, 37^{o}C'de, su banyosu içinde, 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra %2,5'luk agaroz jelde 100 volt (V)' da, 1 saat yürütüldü. UV görüntüleme cihazında değerlendirildi.

2.8. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiki analizi SPSS 11.0 programı kullanılarak yapıldı. Biyokimyasal veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması student t testi ile hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunun genotiple ilişkisini belirlemek için Chi-Square testi, genotip dağılımı için Hardy-Weinberg eşitliği kullanıldı. Fenotip genotip ilişkisini belirlemek için Single point regression (parametrik) ve Kruskal-Wallis (nonparametrik) testleri yapıldı. *P* değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.9. Araç ve Gereçler

2.9.1. DNA eldesi için gerekli olan araç ve gereçler

Santrifüj (WiseSpin, Kore), derin dondurucu (Beko), mikropipet (Eppendorf), hassas terazi (Kern), benmari (WiseBath, Kore), pH metre (Hach)

2.9.2. PZR tekniği için gerekli olan araç ve gereçler

PZR cihazı (Bio-Rad), manyetik karıştırıcı (Stuart), vorteks (Heidolph), hassas terazi (Kern), pH metre (Hach), mikrodalga fırın (Arçelik), görüntüleme cihazı (Vilber lourmat), yatay elektroforez (Thermo), güç kaynağı (Thermo), derin dondurucu (Beko), mikropipet (Eppendorf), pipet ucu, PZR tüpü, kabin, çeker ocak

2.9.3. SSCP için gerekli olan araç ve gereçler

Dikey elektroforez tankı (Biolab), güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida), PZR aleti (Bio-Rad), çalkalayıcı (Biosan)

2.9.4. RFLP için gerekli olan araç ve gereçler

Yatay elektroforez tankı (Biolab), güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation, St Petersburg, Florida), su banyosu, görüntüleme cihazı

2.10. Kimyasallar

2.10.1. DNA eldesi için gerekli olan kimyasallar

EDTA(Vivantis), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Applichem), proteinaz K (Fermentas), sodyum klorür (NaCl) (Amresco), Tris-HCl (Vivantis), kloroform (Applichem), üre (Applichem), etil alkol, deiyonize steril su

2.10.2. PZR tekniği için gerekli olan kimyasallar

DNA, disitile su, taq polimeraz enzimi (Vivantis), tampon, $MgCl_2$, dNTP (Vivantis), ileri ve geri primer (Biomers), agaroz (Prona), etidyum bromür (Serva), tris-HCl (Vivantis), glasial asetik asit (Merck), EDTA (Vivantis), NaCl (Amresco), jel yükleme solüsyonu (Vivantis), DNA standardı (marker) (Vivantis)

2.10.3. SSCP için gerekli olan kimyasallar

Akrilamid (Merck, Darmstadt, Almanya), bisakrilamid (Vivantis), amonyum persülfat (Vivantis), sodyum tiyosülfat, TEMED (Sigma, St Louis, Amerika), ksilen siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), bromofenol mavisi (Merck, Darmstadt, Almanya), sodyum karbonat (Merck, Darmstadt, Almanya), gümüş nitrat (Vivantis), borik asit (Vivantis), asetik asit (Merck, Darmstadt, Almanya), EDTA (Vivantis), Tris-HCl (Vivantis), formaldehit (Applichem), formamid (Applichem)

2.10.4. RFLP için gerekli olan kimyasallar

Agaroz (Prona), etidyum bromür (Serva), DNA standardı (Vivantis), enzim (fermentas)

3. BULGULAR

3.1. Klinik Özellikler

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyetine başvuran T2DM teşhisi konmuş 168 hasta ve 59 kontrol grubu seçildi. Tablo 3.1'de hasta ve kontrol gruplarının klinik ve metabolik özellikleri gösterildi. T2DM grubunun yaş ortalaması 56,25±8,99, kontrol grubunun yaş ortalaması 40,35±12,86 olarak hesaplandı ($p<0,001$). T2DM grubunun vücut kitle indeks ortalaması 26,47±2,79 dur. Gruplar arasındaki istatistiksel farkın önemi student t testi ile belirlendi. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ve kontrol grubu cinsiyet, vücut kitle indeksi ve açlık insülin değerleri bakımından uyumludur.

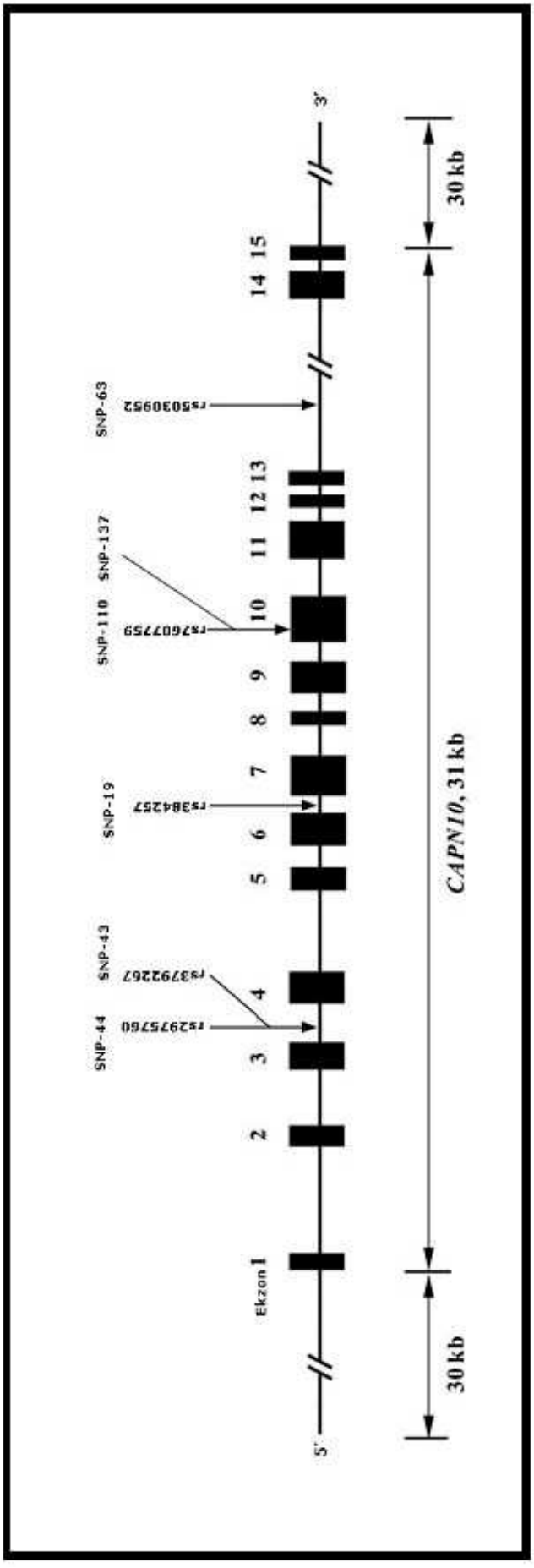
Çizelge 3.1: T2DM hastaları ve kontrol gruplarının klinik özellikleri

	T2DM (n=168)	**Kontrol (n=59)**	***P***
Cinsiyet (E/B)	105:63	30:29	0,16
Yaş	56,25 ± 8,99	40,35 ± 12,86	0,000
Vücut Kitle İndeksi (kg/m^2)	26,47± 2,79	26,03 ± 3,37	0,37
Açlık glukoz (mg/dl)	161,14 ± 66,69	91,32 ± 13,67	0,000
Açlık insülin (mIU/l)	8,87 ± 4,6	8,37 ± 4,06	0,42
HbA1c (%)	7,52 ± 2,52	5,37 ±0,54	0,000
c-peptid	2,24 ± 1,2	3,77 ± 3,86	0,0058
HOMA-IR	3,39 ± 2,01	1,9 ± 0,99	0,000

Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

3.2. SNP-44, -43, -19, -110 -137 ve -63'ün Genotiplenmesi

Literatürde T2DM ile ilişkili olduğu bildirilen CAPN10 genindeki 6 SNP, PZR-SSCP ve PZR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. Bu SNP'lerin CAPN10 genindeki lokalizasyonu şekil 3.1'de gösterildi. Genotiplerin dağılımının Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu saptandı. (Çizelge 3.2).



Şekil 3.1: CAPN10 genindeki 6 SNP'nin lokalizasyonu.

Çizelge 3.2: CAPN10 genindeki polimorfizmlerin genotip sıklığı

	T2DM hasta grubu n (168)			P (Hardy-Weinberg test)	Kontrol grubu n (59)			P (Hardy-Weinberg test)
SNP	**1/1**	**1/2**	**2/2**		**1/1**	**1/2**	**2/2**	
SNP-44	150 (%89,3)	18 (%10,7)	0	0,78	52 (%88,1)	7 (%11,9)	0	0,94
SNP-43	105 (%62,5)	63 (%37,5)	0	0,045	26 (%44,1)	33 (%55,9)	0	0,08
SNP-19	46 (%27,4)	73 (%43,4)	49 (%29,2)	0,46	17 (%28,8)	21 (%35,6)	21 (%35,6)	0,33
SNP-110	100 (%59,5)	68 (%40,5)	0	0,017	38 (%64,4)	21 (%35,6)	0	0,37
SNP63	82 (%48,8)	86 (%51,2)	0	0,081	38 (%64,4)	21 (%35,6)	0	0,34

SNP -44: Allel 1=T, Allel 2=C; SNP -43: Allel 1=G, Allel 2=A; SNP-19: Allel 1=2 tekrar, Allel 2=3 tekrar;

SNP -110: Allel 1=A, Allel 2=G; SNP -63: Allel 1=C, Allel 2=T

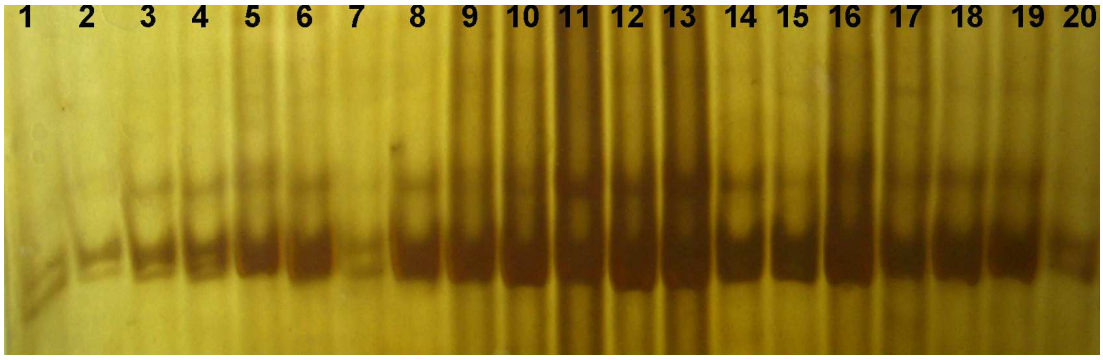
SNP -44 ve SNP -43

SNP -44 ve -43 intron 3'de lokalize olmuştur. Birbirlerinden 11 bç uzaklıkta bulunmaktadırlar. SNP -44 T/C, SNP -43 ise G/A polimorfizmidir. 168 hasta ve 59 kontrol PZR-SSCP tekniği kullanılarak değerlendirildi. SNP -44'de C/C, SNP -43'de ise A/A genotipi gözlenmedi.

SNP -44 için genotip sıklığı hasta grubunda %89,4 (T/T), %10,6 (T/C) ve %0,0 (C/C), kontrol grubunda %89,4 (T/T), %10,6 (T/C) ve %0,0 (C/C) olarak hesaplandı.

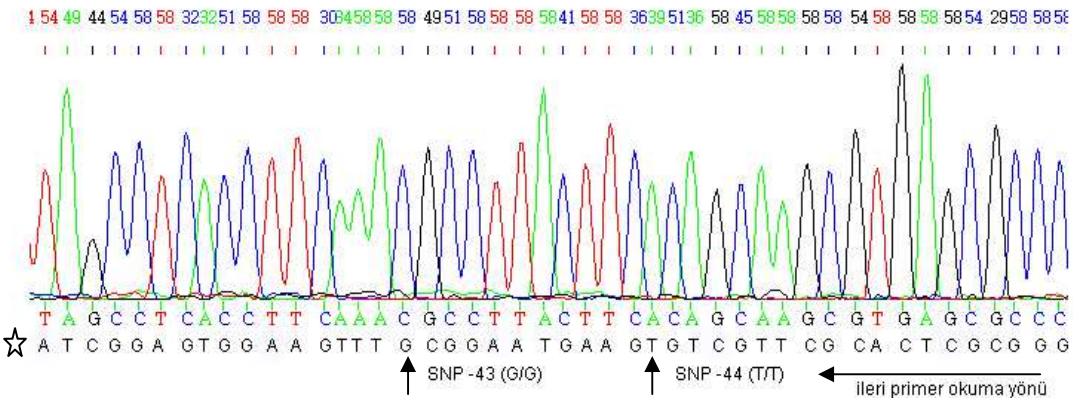
SNP -43 için hasta grubunda % 62,6 (G/G), % 37,4 (G/A) ve %0,0 (A/A) kontrol grubunda ise % 44,8 (G/G), % 55,2 (G/A) ve %0,0 (A/A) olarak hesaplandı.

Resim 3.1'de SNP -44 ve -43'ün SSCP jel görüntüleri, şekil 3.2'de ise dizi analizi görüntüleri gösterildi.

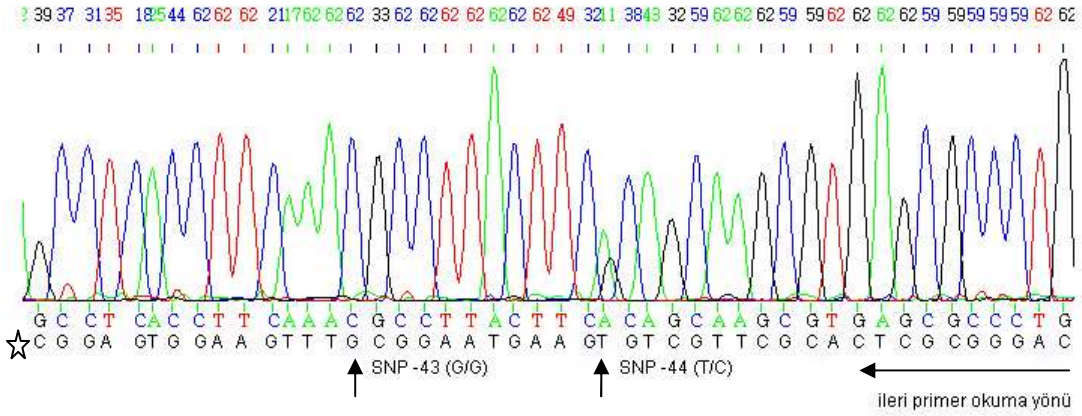


Resim 3.1: SNP -44 ve -43'ün SSCP jel görüntüsü. (2 numaralı kuyucuk=SNP-44: T/T, SNP -43: GG; 4 numaralı kuyucuk=SNP -44: T/C, SNP -43: G/G, 10 numaralı kuyucuk=SNP -44: T/T, SNP -43: G/A).

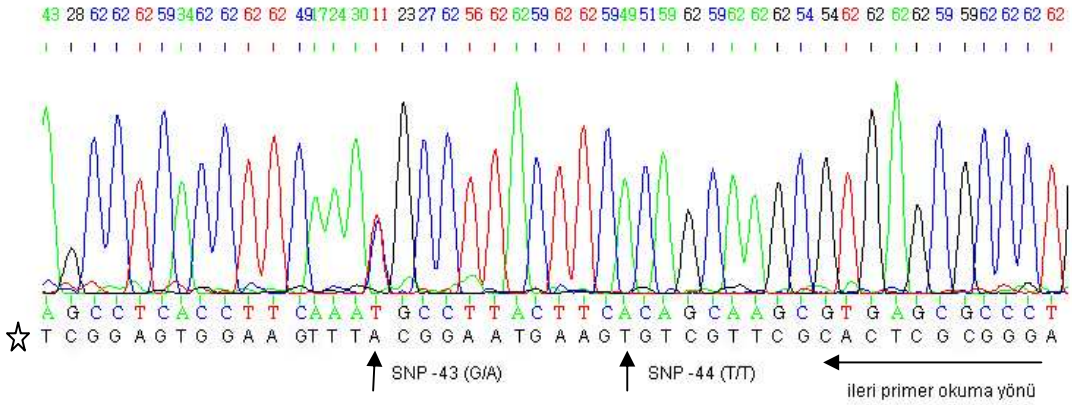
a)



b)



c)



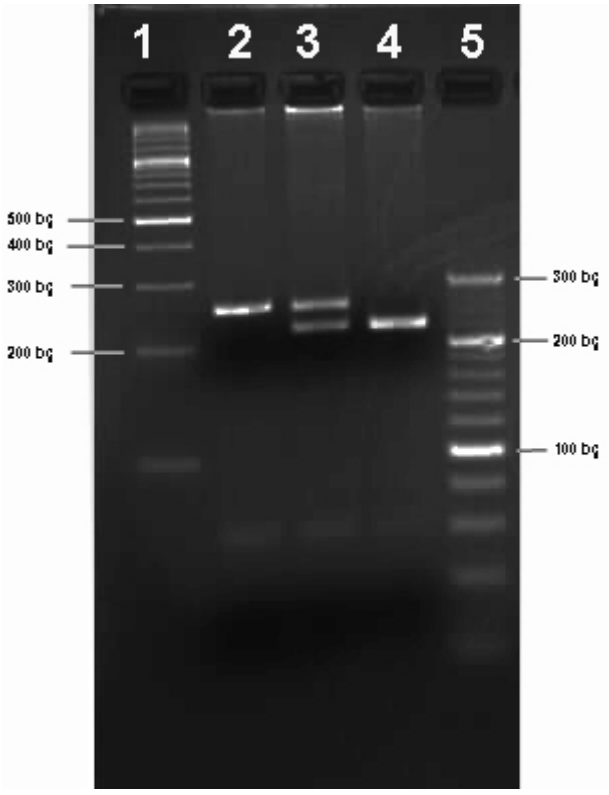
Şekil 3.2: SNP -44 ve -43'ün geri primer ile yapılan dizi analizi görüntüleri.
a) SNP -43 (G/G), SNP -44 (T/T). b) SNP -43 (G/G), SNP -44 (T/C).
c) SNP -43 (G/A), SNP -44 (T/T) (☆ : geri primer ileri primere çevrildi.)

SNP -19

SNP 19, 32 bç büyüklüğünde 2 veya 3 tekrardan oluşan bir delesyon/insersiyon polimorfizmidir. İntron 6'da bulunmaktadır. SNP -19 polimorfizminin genotiplendirmesi doğrudan PZR sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yapıldı. Tekrar bölgesi ve allel büyüklüğünün ölçümü için PZR ürünleri %3,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi sonucunda allel 1, 217 bç (2 tekrar) ve allel 2, 249 bç (3 tekrar) büyüklüğünde bantlar oluşturdu.

Genotip sıklığı 168 T2DM hastasında %27,4 (2R/2R), %43,4 (2R/3R) ve %29,2 (3R/3R), 59 kontrolde ise %28,8 (2R/2R), %35,6 (2R/3R) ve %35,6 (3R/3R) olarak hesaplandı.

Resim 3.2'de SNP -19'un agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü gösterildi.



Resim 3.2: SNP -19'un agaroz jel elektroforez görüntüsü. (2 numaralı kuyucuk:3R/3R, 3 numaralı kuyucuk:2R/3R, 4 numaralı kuyucuk:2R/2R).

SNP -110 ve SNP -137

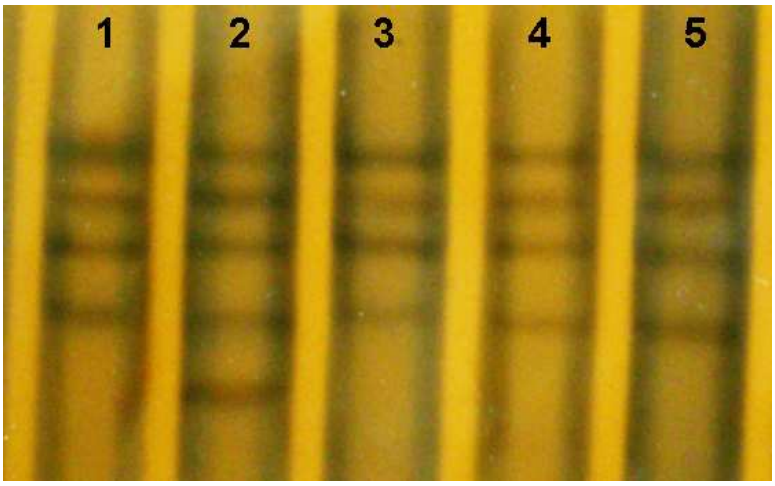
SNP -110, A/G (T504A) ve SNP -137 C/T (R555C) polimorfizmidir. Ekzon 10'da ve birbirlerinden 153 bç uzaklıkta bulunmaktadırlar. SNP -137 polimorfizmini belirlemek için PZR-SSCP tekniği kullanıldı. SNP -110 polimorfizmini belirlemek için önce PZR-SSCP tekniği kullanıldı. Fakat yapılan SSCP çalışmasında örneklerin yarısından sonuç elde edilemeyince, Evans ve ark (2001)'ın aynı SNP'yi taramak için kullandıkları primerler ile aynı bölge yeniden PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve PZR-RFLP çalışması yapıldı.

SNP -110 polimorfizmini belirlemek için 168 T2DM hastasına ve 59 kontrole ait PZR ürünleri *Hha*I restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrasında ürünler %2,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Kesimden sonra A/A genotipli bireylerde 202 bç'lik tek bant, G/G genotipli bireylerde 173 ve 29 bç'lik iki bant ve heterozigot A/G genotipli bireylerde ise 202, 173 ve 29 bç'lik üç bant oluştu.

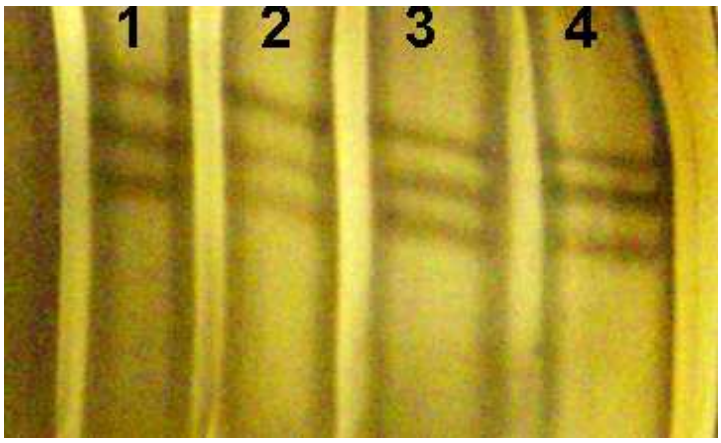
SNP -110'un genotip sıklığı hasta grubunda %59,5 (A/A), %40,5 (A/G) ve %0,0 (G/G), kontrol grubunda ise %64,4 (A/A), %35,6 (A/G) ve %0,0 (G/G) olarak hesaplandı. SNP -110'da sadece A/A ve A/G genotipleri gözlendi. G/G genotipi gözlenmedi. Dizi analizi sonuçları ile de bulgularımız desteklendi (Şekil 3.3).

Resim 3.3'de SNP -110'un SSCP jel görüntüsü gösterildi. Resim 3.5'de SNP -110'un RFLP agaroz jel elektoroforez götüntüsü gösterildi.

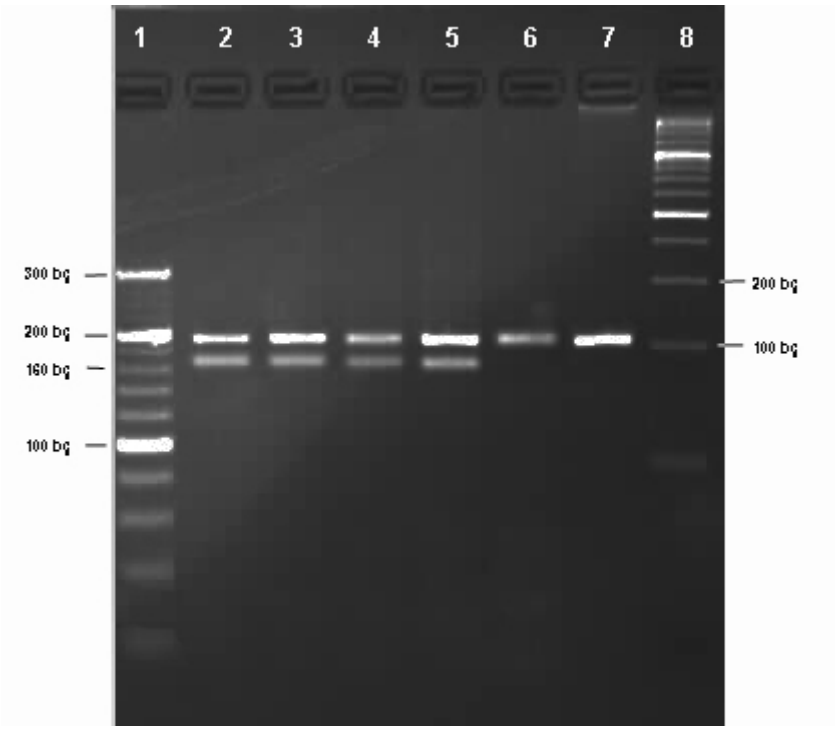
SNP-137 polimorfizmini belirmek için PZR-SSCP tekniği kullanıldı. PZR-SSCP sonuçlarında tüm bireylerde aynı göç profili gözlendi (Resim 3.4). Dizi analizi sonuçları ile de bu bölgede C/C genotipinin olduğu gösterildi (Şekil 3.3). SNP-137'de C/T ve T/T genotipleri gözlenmemiş olup tüm hasta ve kontrol bireylerimiz C/C genotipinde olduğu belirlendi. Sonuç olarak çalışma grubumuzda SNP -137 polimorfizmine rastlamadık.



Resim 3.3: SNP -110'un SSCP jel görüntüsü. (1,3,4,5 numaralı kuyucuklar: A/A, 2 numalaralı kuyucuk: A/G).

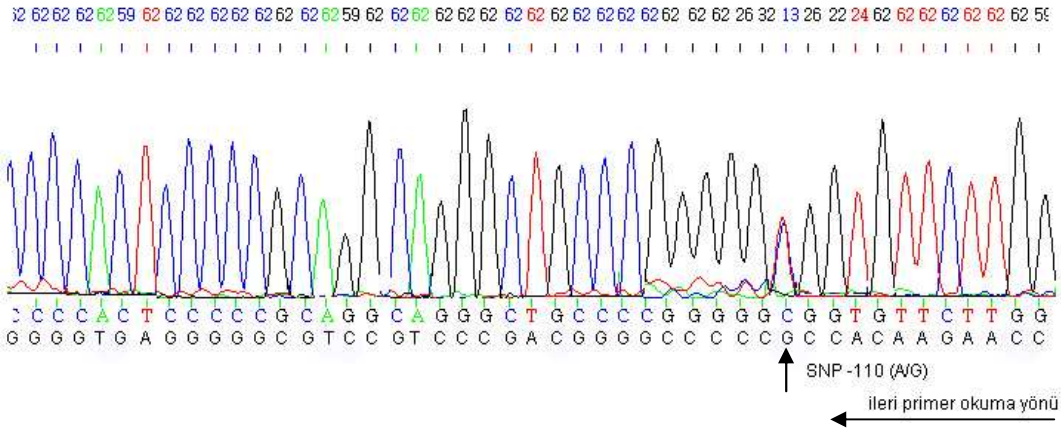


Resim 3.4: SNP -137'nin SSCP jel götüntüsü. (1,2,3,4 numaralı kuyucuklar: C/C).

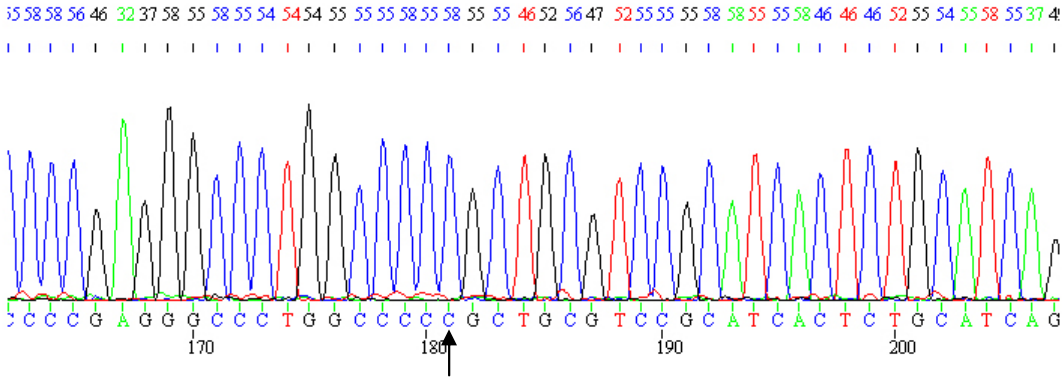


Resim 3.5: SNP -110'un *Hha*I enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektrofez görüntüsü. (2,3,4,5 numaları kuyucuklar: A/G, 6 ve 7 numaralı kuyucuklar A/A).

a)



b)



Şekil 3.3: a) SNP -110 un geri primer dizi analizi görüntüsü **b)** SNP-137'nin ileri primer dizi analizi görüntüsü. Ok işareti ile gösterilen baz SNP -137 (C/C).

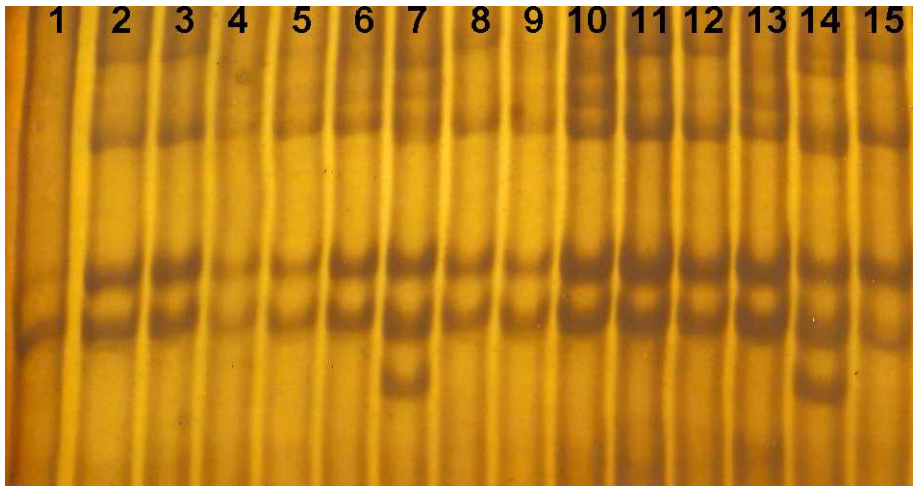
SNP -63

SNP -63 intron 13'de bulunan C/T polimorfizmidir. SNP -63 polimorfizmini belirlemek için önce PZR-SSCP tekniği kullanıldı. Fakat yapılan SSCP çalışmasında örneklerin yarısından sonuç elde edilemeyince, Evans ve ark (2001)'ın aynı SNP'yi taramak için kullandıkları primerler ile aynı bölge yeniden PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve PZR-RFLP çalışması yapıldı.

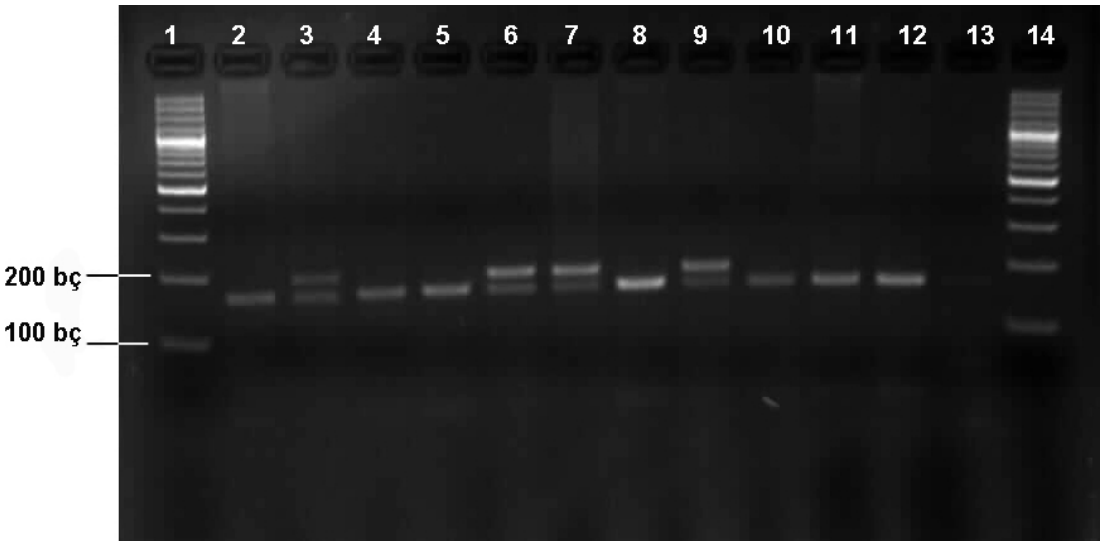
SNP -63 polimorfizmini belirlemek için 168 T2DM hastasına ve 59 kontrole ait PZR ürünleri *Hha*I restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrasında ürünler %2,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Kesimden sonra T/T genotipli bireylerde 189 bç'lik tek bant, C/C genotipli bireylerde 159 ve 30 bç'lik iki bant ve heterozigot C/T genotipli bireylerde ise 189, 159 ve 30 bç'lik üç bant oluştu.

Genotip sıklığı 168 T2DM'li hastada %48,8 (C/C), %51,2 (C/T) ve %0,0 (T/T), 59 kontrolde ise %64,4 (C/C), %35,6 (C/T) ve %0,0 (T/T) olarak hesaplandı. Hem hastalarda hem de kontrollerde T/T genotipine rastlanmadı.

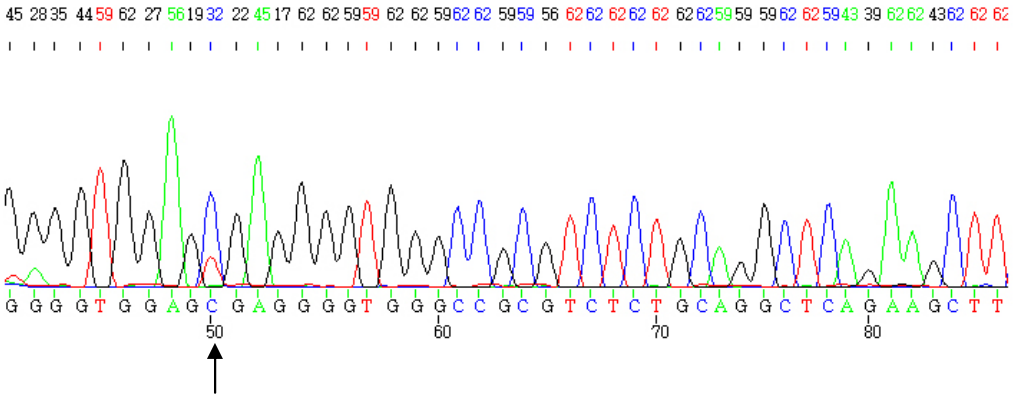
Resim 3.6'da SSCP jel görüntüsü, resim 3.7'de RFLP jel görüntüsü ve şekil 3.4'de ise dizi analizi görüntüsü gösterildi.



Resim 3.6: SNP -63'ün SSCP jel görüntüsü. (7 ve 14 numaralı kuyucuklar C/T, diğerleri ise C/C).



Resim 3.7: SNP -63'ün *Hha*I enzim kesimi sonrasında yapılan agaroz jel elektrofez görüntüsü. (2,4,5,8,10,11 ve 12 numaları kuyucuklar: C/C, 3, 6, 7 ve 9 numaralı kuyucuklar C/T).



Şekil 3.4: SNP -63'ün ileri primer dizi analizi sonucu. Ok işareti ile gösterilen baz SNP -63 (C/T).

3.3. T2DM ile Genotip İlişkisi

Hastalıkla genotip arasındaki ilişkiyi belirlemek için x^2 testi yapıldı. SNP -44, -43, -19, -110 ve -63'ün genotip dağılımının hasta ve kontrollerde bağımsız olup olmadığı test edildi. *P* değerleri sırasıyla 0,88; 0,04; 0,59; 0,54; 0,16 olarak bulundu. SNP -43 hariç diğer SNP'ler ile hastalık arasında bir ilişki görülmedi.

Çizelge 3.3: SNP'lerin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı.

SNP	Genotip	Hasta N (%)	Kontrol N (%)
SNP -44	T/T	150 (%89,4)	52 (%89,4)
	T/C	18 (%10,6)	7 (%10,6)
	C/C	0	0
SNP -43	G/G	105 (%62,6)	26 (%44,8)
	G/A	63 (%37,4)	33 (%55,2)
	A/A	0	0
SNP -19	2R/2R (del/del)	46 (%27,4)	17 (%28,8)
	2R/3R (del/ins)	73 (%43,4)	21 (%35,6)
	3R/3R (ins/ins)	49 (%29,2)	21 (%35,6)
SNP -110	A/A	100 (%59,5)	38 (%64,4)
	A/G	68 (%40,5)	21 (%35,6)
	G/G	0	0
SNP -137	C/C	168 (%100)	59 (%100)
	C/T	0	0
	T/T	0	0
SNP -63	C/C	82 (%48,8)	38 (%64,4)
	C/T	86 (%51,2)	21 (%35,6)
	T/T	0	0

Çizelge 3.4: SNP'lerin hasta ve kontrol grubundaki allel dağılımı.

SNP	Allel	Hasta N (%)	Kontrol N (%)
SNP -44	T	318 (%94,6)	111 (%94)
	C	18 (%5,4)	7 (%6)
SNP -43	G	273 (%81,2)	85 (%72)
	A	63 (%18,8)	33 (%28)
SNP -19	2R (del)	165 (%49,1)	55 (%46,6)
	3R (ins)	171 (%50,9)	63 (%53,4)
SNP -110	A	268 (%79,7)	97 (%82,2)
	G	68 (%20,3)	21 (%17,8)
SNP -137	C	336 (%100)	118 (%100)
	T	0	0
SNP -63	C	250 (%74,4)	97 (%82,2)
	T	86 (25,6)	21 (%17,8)

3.4. Genotip-Fenotip İlişkisi

SNP -44, -43, -19, -110 ve -63'ün açlık glukoz, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR üzerine etkisi hesaplandı. Açlık insülin ve HOMA-IR değerleri normal dağılıma uymadığı için açlık insülin değerlerine karekök transformasyon, HOMA-IR değerlerine ise log transformasyon yapıldı. Açlık glukoz ile genotip ilişkisi x^2 testi, açlık insülin ile genotip ilişkisi F testi, HbA1c ile genotip ilişkisi Kruskal Wallis testi ve HOMA-IR ile genotip ilişkisi One-Way Anova testi kullanılarak hesaplandı.

Açlık glukoz için, SNP -44, -43, -110 ve -63 ile ilişki gözlenmezken (P>0,05), SNP -19 ile arasındaki ilişkinin önemli olduğu bulundu (*P*<0,05) (çizelge 3.5).

HOMA-IR için, SNP -44, -43, -19, -110 ve -63 ile ilişki gözlenmedi (P>0,05) (çizelge 3.5).

HbA1c ile SNP -44, -43 -19 ve -110 arasında ilişki bulunmadı (P>0,05). SNP -63 üzerinde sınırda etkisi vardı (*P*=0,057) (çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: Genotiplerle açlık glukoz, HOMA-IR ve HbA1c arasındaki ilişki.

Açlık glukoz	***P***	**HOMA-IR**	***P***	**HbA1c**	***P***
SNP -44	0,72	SNP -44	0.728	SNP -44	0.974
SNP -43	0,22	SNP -43	0,093	SNP -43	0,701
SNP -19	0,004	SNP -19	0,798	SNP -19	0,724
SNP -110	0,29	SNP -110	0.719	SNP -110	0.713
SNP -63	0,68	SNP -63	0,27	SNP -63	0.057

Açlık insülin için, SNP -44, -43, -19 -110 ve -63 arasında hasta ve kontrol gruplarında ilişki bulunmadı (P>0,05) (çizelge 3.6).

Çizelge 3.6: Genotiplerle açlık insülin arasındaki ilişki.

Açlık İnsülin	***P* (hasta)**	***P* (kontrol)**
SNP -44	0.786	0.602
SNP -43	0.730	0.405
SNP -19	0.397	0.104
SNP -110	0.753	0.791
SNP -63	0.452	0.650

4. TARTIŞMA

T2DM, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile meydana gelen, komplikasyonları ile yaşam kalitesini bozan karmaşık bir hastalıktır. Giderek artan ve epidemik boyutlara varan yaygınlığı, diyabetin önemini arttırmaktadır. Dünyada en sık görülen kronik hastalıklardan biridir. Diyabette daha iyi metabolik kontrol sağlamak ve diyabetle ilişkili komplikasyonları azaltmak için yeni stratejilerin geliştirilmesi amacıyla yoğun çaba sarf edilmektedir. Bunun yanı sıra, fiziksel hastalıkların ötesinde diyabet, yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve psikososyal zorluklara neden olmaktadır.

İnsan DNA'sında gen diziliminin %99,9'u birbirine benzemektedir. İnsanlar arasındaki genetik çeşitlilik %0,01'lik farklılıktan ileri gelmektedir. Bu genetik farklılıklar; fiziksel özellikler, hastalıklara yatkınlık ve direnç, ilaç veya besin metabolizmasında görülen farlılıklardır. İnsan popülasyonları arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle bazı popülasyonlar bazı hastalıklara daha duyarlıdır (International HapMap Consortium 2004).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) kavramı genom projesinin tamamlandığı süreçte gündeme gelmiştir. Popülasyondaki sıklığı %1'den fazla olan genomdaki tek baz farklılıklarına SNP adı verilmektedir. İki birey arasında 1250 bç'de bir farklılık olduğu tahmin edilmektedir. Diabetes Mellitus, kanser, Alzheimer, bazı kardiyovasküler hastalıklar ve migren gibi hastalıklar SNP ile yakın ilişkilidir. SNP taramalarında hangi varyant allellerin hastalıkla yakın ilişkili olduğu belirlenebilmektedir. İnsan genom projesinin devam etmekte olan alt projelerinden biri de HapMap (Haplotype Map) projesidir. 2002'de başlayan Uluslararası HapMap projesinin amacı insanlar arasında farklı olan genom dizilerini ortaya koymak ve genomunun haplotip haritasını geliştirmektir. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar genomun büyük çoğunluğunun haplotip blokları şeklinde olduğunu göstermektedir. Yanlızca birkaç SNP bu haplotip bloklarının işaretlenmesinde ve bir hastalıkla ilişkili olup olmadığının belirlenmesinde yeterli olacaktır. Bir hastalık birden fazla gen tarafından etkileniyorsa, haplotiplerden elde edilecek bilgi SNP'lerden bir seferde elde edilecekten fazla olabilir (International HapMap Consortium 2003, International HapMap Consortium 2004).

İnsan Genom Haritasının çıkarılması için girişimlere başlandıktan sonra geniş kitleleri etkileyen hastalıklar ve bu hastalıklarla genetik faktörlerin ilişkisi de araştırmalarda ön planda yer almaya başlamıştır. Bu kapsamda Diabetes Mellitus gelişimine etkili genetik faktörlerin araştırılması sonucunda Non Insulin Dependant Diabetes Mellitus 1 (NIDDM1) geninin Tip 2 Diabetes Mellitus ile ilişkisi olduğu ortaya konmuştur (Polonsky ve ark 1996). Pozisyonel klonlama çalışmalarından sonra kromozom 2q37.3 lokalizasyonundaki Calpain-10 geni Horikawa ve arkadaşları tarafından Tip 2 Diyabet ile ilişkili ilk gen olarak tanımlanmıştır (Horikawa ve ark 2000). Bunu takip eden çalışmalarla birlikte Calpain-10 geninde SNP -19, -43, -44 ve -63 polimorfizmlerinin T2DM ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Baier ve ark 2000, Evans ve ark 2001, Cassell ve ark 2002, Garant ve ark 2002, Hoffstedt ve ark 2002b, Malecki ve ark 2002). Horikawa ve arkadaşlarının Meksikalı-Amerikalı, Bosnalı, Finlandiyalı ve Alman populasyonunu içeren gruplarda yaptığı araştırmalar sonucunda SNP -43 ve SNP -63 polimorfizmlerinin Meksikalı-Amerikalılarda, Bosnak ve Finlandiya populasyonlarında T2DM gelişimi riskini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca Meksikalı-Amerikalılarda SNP -19 polimorfizminin de T2DM gelişimiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Horikawa ve ark 2000, Horikawa ve ark 2003, Horikawa ve ark 2006).

Çalışmamızda SNP'ler ile T2DM arasındaki ilişkiye bakındığında SNP -43'ün hastalıkla ilişkili olduğu fakat SNP -44, -19, -110 ve -63'ün ise ilişkili olmadığı saptanmıştır.

CAPN10 geninin T2DM ile olan ilişkisi gündeme geldikten sonra değişik etnik gruplarda çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. T2DM patogenezinde CAPN10'un önemi toplumlara göre değişmektedir. Bir kısmında CAPN10 genindeki polimorfizmlerin T2DM riskini arttırdığı saptanırken, bir kısmında ise bu ilişki saptanamamıştır.

Horikawa ve arkadaşları SNP- 44'ün bir güçlendirici (enhancer) elementte lokalize olduğunu ve CAPN10 ekspresyonunu düzenlediğini bildirmişlerdir (Horikawa ve ark 2000).

İngilizler üzerinde yapılan bir çalışmada SNP -43, -19 ve -63'ün T2DM ile ilişkisini bulamamışlardır. Bununla birlikte yaptıkları aile bazlı çalışmada SNP -

44'teki C allelinin hastalıktan etkilenen nesillere beklenenden daha fazla aktarıldığını gözlemlemişlerdir. Böylece SNP-44 gen polimorfizminin önemi ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada Evans ve arkadaşları ayrıca kodlanan bölgede SNP -136 (L34V), SNP -110 (T504A), SNP 137 (R555C) ve SNP -58 (V666I) olmak üzere 4 tane polimorfizm tespit etmişlerdir. Ayrıca SNP -44'ün SNP -110 ile çok iyi bir şekilde bağlantı dengesizliğinde (linkage disequilibrium) olduğunu göstermişlerdir. SNP -110, CAPN10'un işlevi bilinmeyen T bölgesinde lokalize olmuştur ve CAPN10 aktivitesindeki rolünün anlaşılabilmesi için fonksiyonel çalışmalar yapılması gerekmektedir (Evans ve ark 2001). Evans ve arkadaşlarının aksine Horikawa ve arkadaşları Meksikalı-Amerikalı popülasyonunda SNP -110 polimorfizmine çok seyrek rastlamışlardır. Aynı toplumda SNP -137 polimorfizmi görülmemiştir (Horikawa ve ark 2000). Çalışmamızda SNP -110 polimorfizmi tespit edilirken, SNP -137 polimorfizmi saptanmamıştır.

Tsai ve arkadaşlarının Polinezya'nın Samoa halkında, Rasmussen ve arkadaşlarının İskandinav popülasyonunda, Fingerlin ve arkadaşlarının Finlandiya popülasyonunda, Elbein ve arkadaşlarının Kafkaslar üzerinde yaptıkları Calpain-10 gen polimorfizm çalışmalarında T2DM riskini arttırdığına dair bulgu saptanmamıştır (Tsai ve ark 2001, Elbein ve ark 2002, Fingerlin ve ark 2002, Rasmussen ve ark 2002). Bununla birlikte Elbein ve arkadaşları SNP -19 ve SNP -63'ün açlık insülin düzeyini artırdığını rapor etmişlerdir (Elbein ve ark 2002). Ortho-Malender ve arkadaşlarının Finlandiya popülasyonunda yaptığı çalışmada SNP-44 G alelinin ve SNP-63 T alelinin T2DM riskini arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca CAPN10 genindeki genetik farklılıkların yüksek serbest yağ asitleri ve insülin direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ortho-Malender ve ark 2002). Cassell ve arkadaşlarının Güney Hindistan popülasyonunda yaptığı araştırmada SNP-44, -43, -19, -63 polimorfizmleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada bozulmuş açlık glukoz ve bozulmuş glukoz toleranslı olgularda SNP-63'ün T allelinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla izlendiği belirtilmiştir (Cassell ve ark 2002).

Çalışmamızda, Cassell ve ark. aksine SNP -63'ün açlık glukoz ve açlık insülin üzerine bir etkisi olmadığı saptanırken, HbA1c üzerine ise sınırda bir etkisinin olduğu bulunmuştur. SNP -19'un ise açlık glukoz ile arasındaki ilişkinin önemli olduğu, ancak açlık insülin ve HbA1c ile ilişkisinin olmadığı gözlenmemiştir.

SNP -44, -43 ve -110 polimorfizmleri ile açlık glukoz, açlık insülin ve HbA1c arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Daimon ve arkadaşlarının Japonlar üzerinde yaptıkları çalışmada SNP -44 ve -43'ün T2DM ile ilişkisini incelemişlerdir. 81 hasta ve 81 kontrol ile yapılan çalışma sonucunda bu genotip ve genotip kombinasyonu sıklığının gruplar arasında herhangi bir farklılığa neden olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu SNP'lerin obezite ve hipertansiyon ile ilişkisinde de bir farklılık olmadığını saptamışlardır. Fakat serum kolestrolü ile ilişkisini incelediklerinde SNP -43 (G/G) ve SNP -44 (T/T) genotip kombinasyonunun bir risk faktörü olduğunu gözlemlemişlerdir (Daimon ve ark 2002). Shima ve arkadaşları Japon popülasyonunda CAPN10 genindeki SNP -19 için VKİ değerlerinin ve HbA1c düzeylerinin genotip 3R/3R'de genotip 2R/2R ve 2R/3R'e göre daha yüksek olduğunu, SNP -63 için VKİ değerlerinin ve HbA1c düzeylerinin genotip C/C'de genotip C/T ve T/T'e göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca SNP-19'da genotip 3R/3R'ye sahip hastaların daima SNP -63'de genotip C/C'i taşıdığını belirtmişlerdir. SNP -43'ün ise hastalarda metabolik özellikleri etkilemediğini bulmuşlardır. SNP-19 polimorfizminde Calpain-10 mRNA düzeylerinin transkripsiyon ve protein ekspresyonunu etkileyerek T2DM gelişimine etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar Japonlarda obezite ve glukoz toleransına SNP-19'un katkısını göstermektedir (Shima ve ark 2003).

Horikawa ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada ise CAPN10 geninin özendirici (promoter) ve ekzon bölgelerini taramışlardır. Özendirici bölgede 5 nükleotid değişimi saptamışlardır. Fakat bu SNP'lerin nüklear faktörleri tanıma dizilerinde yer almadığını belirtmişlerdir. Ayrıca 3 tanesi sessiz (missense) mutasyon (P200T, T504A (SNP -110) ve R202G) olan toplam 7 tane kodlama farklılığı bulmuşlardır. P200T hariç bütün SNP'lerin sıklığının hasta ve kontrollerde benzer olduğunu ve bu genetik farklılıkların Japonlarda T2DM'nin oluşumunda önemli bir faktör olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca CAPN10 aktivitesinde P200T, R202G, T504A (SNP -110)'nın rollerini açıklamak için fonksiyonel çalışmalara gerek olduğunu bildirmişlerdir (Horikawa ve ark 2003). Çalışmamızda SNP -110'un T2DM oluşumunda önemli bir faktör olmadığı saptanmıştır.

Song ve arkadaşları T2DM riskine CAPN10'un etkisini belirlemek için 21 popülasyon temelli ve 5 ailesel temelli çalışmaların meta-analizini yapmışlardır.

Popülasyon temelli çalışmada, SNP -43 ve T2DM arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulmamışlardır. Bununla birlikte G/G genotipini taşıyan bireylerin G/A ve A/A genotipini taşıyanlardan %19 daha yüksek T2DM riski taşıdığını bildirmişlerdir. Ayrıca SNP -43 G/G genotipi ve metabolik fenotipler arasındaki ilişki için kanıt bulamamışlardır. Ailesel temelli çalışmaların meta analizinde ise T2DM'li heterezigot anne babaların, T2DM'lu çocuklarında SNP -44'deki nadir görülen C allelinin daha fazla iletildiğini bildirmişlerdir (Song ve ark 2004).

Çin popülasyonunda yapılan çalışmada ise SNP -43 için A/A genotipine rastlanmamıştır. Ayrıca SNP -43'ün insülin direnci üzerinde etkili olmadığı gözlemlenmiştir (Wu ve ark 2005). Demirci ve arkadaşları Calpain-10 SNP-44 polimorfizminde T/C genotipinin T2DM riskini arttırdığını saptamışlardır (Demirci ve ark 2007). Kifagi ve arkadaşları Tunus popülasyonunda SNP -43, -19, -63 ve -110 polimorfizmlerini incelemişlerdir. Yalnızca SNP-43'ün A allelini T2DM ile ilişkili bulmuşlardır (Kifagi ve ark 2008). Saez ve arkadaşlarının İspanyollarla yaptıkları bir çalışmada SNP44 T/T genotipinin hastalıkla ilişkili olduğu, SNP -19'da ise 3R/3R genotipinin HOMA değerini artırdığını gözlemlemişlerdir (Saez ve ark 2008). Adak ve arkadaşlarının Batı Hindistan popülasyonunda yaptıkları ve SNP-43, -19, -63 polimorfizmlerini değerlendirdikleri çalışma sonucunda SNP-63'te T alelinin T2DM riskinde artışa neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Adak ve ark 2010). Çalışmamızda SNP -44, -43, -19, -110 ve -63 polimorfizmleri ile HOMA değeri arasında bir ilişki saptanmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Konya Bölgesindeki Tip 2 Diabetes Mellituslu hastalarda CAPN10 genindeki 6 polimorfizmin (SNP -44, -43, -19, -110 -137 ve -63) sıklıklarını ve polimorfizmlerin T2DM gelişimine etkisini araştırdık. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyetine başvuran T2DM teşhisi konmuş 168 hasta ve 59 kontrol grubu ile çalıştık.

Sonuç olarak;

SNP -44'de C/C, SNP -43'de A/A, SNP -110'da G/G ve SNP -63'de T/T genotiplerini gözlemedik. Çalışma grubumuzda SNP -137 polimorfizmine rastlamadık. Hastalıkla genotip arasındaki ilişki incelendiğinde, SNP -43 hariç bütün SNP'lerin hastalıkla ilişkili olmadığını bulduk.

Ayrıca CAPN10 gen polimorfizmlerinin açlık glukoz, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR üzerinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığını inceledik. Bu fenotiplerle SNP -44, -43 ve -110 arasında bir ilişki gözlemlemedik. SNP -63'ün HbA1c üzerinde zayıf etkili olduğu ancak açlık glukoz, açlık insülin ve HOMA-IR üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı bulduk. SNP -19'un açlık glukoz ile ilişkisinin önemli olduğunu, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR üzerine ise herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemledik.

Bu çalışmanın ileri bir adımı olarak hasta ve kontrol sayılarının arttırılarak SNP -44, -43, -19 ve -63 için haplotip analizlerinin yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya Bölgesi Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında Calpain-10 Geninin Hastalık İle İlişkisinin Araştırılması

Hülya Özdemir

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2011

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) dünyada yaklaşık 135 milyon insanda görülen, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır. Patogenezinde insülin salınımı ve insülin direncinde azalma rol oynar.

Calpain'ler kalsiyum ile aktive edilen proteazlardır. Hücre içi sinyal iletimi, nöral fonksiyonlar ve hücre iskeleti yeniden düzenlenmelerini içeren birçok hücresel etkinlikte görev alırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar Calpain-10 (CAPN10) genindeki varyasyonların T2DM ile ilişkili olduğunu göstermiştir. CAPN10'nun insülin direnci ve salınımında bozulma ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada Konya bölgesindeki T2DM'li hastalarda CAPN10 genindeki 6 polimorfizmin (SNP-19, -43, -44, -63, -110 ve –137) ve haplotip kombinasyonlarının hastalıkla ilişkisini araştırdık. Hastalar, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı ve Konya Diyabet Cemiyetine başvuran T2DM teşhisi konmuş hastalardan seçildi. Çalışmaya aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, yaş ve vücut kitle ilişkisi birbiriyle uyumlu 168 hasta ve 59 kontrol grubu dahil edildi. Biyokimyasal tetkiklerde; total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, HbA_{1C}, C-peptid, açlık ve tokluk kan şekeri ve serum insülin düzeylerine bakıldı. Kontrol grubundaki bireylere oral glikoz tolerans testi (OGTT) yapıldı. Her bir hasta ve kontrol için HOMA-IR hesaplandı. Periferal kandan DNA izole edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu-tek zincirli konfarmasyonal polimorfizm (PZR-SSCP) ve polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim kesimi (PZR-RFLP) teknikleri kullanıldı.

SNP -44'de C/C, SNP -43'de A/A genotipi, SNP -110'da G/G, SNP -63'de ise T/T genotipi gözlenmemiştir. Çalışma grubumuzda SNP -137 polimorfizmi gözlenmedi.

T2DM ile CAPN10 gene polimorfizmleri arasında SNP -43 hariç ilişki gözlenmedi. Açlık glukoz, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR üzerinde SNP -44, -43 ve -110'un herhangi bir etkisi bulunmadı. SNP -63'ün HbA1c üzerinde zayıf etkili olduğu ancak açlık glukoz, açlık insülin ve HOMA-IR üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. SNP -19'un açlık glukoz ile ilişkisinin önemli olduğu, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR üzerine ise herhangi bir etkisinin olmadığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Calpain-10, SNP -19, SNP -43, SNP -63, Tip 2 Diabetes Mellitus

7. SUMMARY

Investigation Of Association Between Type 2 Diabetes Mellitus And The Gene For Calpain-10 In Konya Region

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a multifactorial disease, influenced by both genetic and environmental factors, that affects apporoximately 135 million people worldwide. Two major pathophysiological pathways coexist in the disease: impaired insulin secretion and decreased insülin sensitivity.

Calpains are ubiquitous calcium-activated proteases that are implicated in many cellular activities, including intracellular signal transduction, neural functions and cytoskeletal rearrangemets. Recent studies have shown that variation in gene encoding Calpain-10 (CAPN10) is associated with T2DM. It has been suggested that CAPN10 may be implicated in insülin resistance and impaired insülin secretion.

In this study, we examined the possible association between six CAPN10 gene polymorphisms (SNP-19, -43, -44, -63, -110 ve –137) and haplotype combinations with T2DM in Konya Region. Patients with T2DM were recruited at the Selcuk University Meram Medical Faculty Endocrinology Department and Konya Diabetes Society. The study population consisted of 168 unrelated , age and body mass index matched subjects with T2DM and 59 non-diabetic controls. Biochemical examinations included total cholesterol, HDL- cholesterol, LDL- cholesterol, triglyceride, HbA_{1C}, C-peptid, fasting and postprandial blood glucose and serum insülin. All control subjects underwent oral glucose tolerance test (OGTT). Homeostasis model assement (HOMA) of insülin resistance (IR) was calculated. DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes. The method of polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was applied on genomic DNA.

We didn't showed C/C genotype for SNP -44, A/A genotype for SNP -43, G/G genotype for SNP -110 and T/T genotype for SNP -63. SNP -137 was not observed in this study.

We found no association between polymorphisms of CAPN10 gene and type 2 diabetes except SNP -43. There were no effect of SNP -44, -43 ve -110 on fasting plasma glucose (FPG), fasting insulin, HbA_{1C} and HOMA-IR. We found a weak association of SNP -63 with HbA1c but no effect on FPG, fasting insulin and HOMA-IR. SNP -19 had a significant association on FPG, but no effect on fasting insulin, HbA1c and HOMA-IR.

Key Words: Calpain-10, SNP -19, SNP -43, SNP -63, Type 2 Diabetes Mellitus

8. KAYNAKLAR

1. Adak S, Sengupta S, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Co-existence of risk and protective haplotypes of Calpain 10 gene to type 2 diabetes in the eastern Indian population. Diabetes and Vascular Disease Research. 2010; 7(1) 63-68.

2. Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflanması. In:Yenigün M, Altuntaş Y, editörs. Her yönüyle diabetes mellitus, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; p. 49-57.

3. Araz M. Postprandiyal hiperglisemi, koroner arter hastalığı ve tedavisi. In: Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA, editörler. Diabetes mellitus'un modern tedavisi. 2. Baskı. İstanbul, Özlem grafik matbaacılık, 2004;109-115.

4. Arslan A, Taştekin G, Bulun M. Diabetes Mellitus ve genetik. In:Yenigün M, Altuntaş Y, editörs. Her yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001.

5. Aykut M, Çetinkaya F, Günay O, Öztürk Y, Öztürk A. Diabetes Mellitus'un önlenmesi. Kayseri, Erciyes Üniversitesi matbaası, 1999.

6. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı. In: İlkova H. editör. Diabetes Mellitus. İstanbul, Diabetes Mellitus Sempozyumu, 1997;p. 9-18.

7. Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen G-Q *ve ark*. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. J Clin Invest. 2000;106:R69–R73.

8. Barnoy S, Supino-Rosin L, Kosower N. Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. Biochem J. 2000;351: 413–420, 351.

9. Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW et al. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. PLoS Biol. 2003; 1(3):445.

10. Batkın D, Çetinkaya F. Diabetes mellitus hastalarının ayak bakımı ve diabetik ayak hakkındaki bilgi, tutum ve davranışları. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2005;14(1):6 -12.

11. Burant CF. Medical management of type 2 diabetes. ADA. 2004.

12. Carlsson E, Fredriksson J, Groop L, Ridderstrale M. Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004; 89: 3601-3605.

13. Cassell PG, Jackson AE, North BV, Evans JC, Syndercombe-Court D, Phillips C, et al. Haplotype combinations of calpain 10 gene polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians, Diabetes. 2002; 51(5):1622–1628.

14. Croall DE, Demartino GN. Calcium activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. Physiol Rev. 1991;71: 813-847.

15. Çolak R. Diabetes Mellitus ve gebelik. In: Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA, editörler. Diabetes Mellitus'un modern tedavisi. 2. Baskı. İstanbul, Özlem grafik matbaacılık, 2004;145-151.

16. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H *ve ark*. Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese. Diabetes Research and Clinical Practice. 2002; 56:147–152.

17. Davidson MB. Diabetes Mellitus. diagnosis and treatment. 4. Baskı, Philadephia, WB Saunders Company, 1998.

18. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. Rev. Annals of Internal medicine. 1999;131(4):281-303.

19. Demirci H, Yurtcu E, Ergun M, Yazıcı A, Karasu C, Yetkin I. Calpain-10 SNP-44 gene polymorphism affects susceptibility to type 2 diabetes mellitus and diabeticrelated conditions. Genetic testing. 2007; 12:305-310.

20. Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, *ve ark*. Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. J.Clin. Endocr. Metab. 2002;87:650-654.

21. Esen A. Diyabetin tanımı, sınıflandırılması ve risk faktörleri. Fadıloğlu Ç (Çeviren). III. Ege Dahili Tıp Günleri, İzmir: Meta Matbaacılık, 2004: 21-38.

22. Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M, *ve ark*. Studies of association between the gene for Calpain-10 and Type 2 Diabetes Mellitus in United Kingdom. Am. J. Hum. Genet. 2001;69:544-552.

23. Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL,et al. Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene notassociated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. Diabetes. 2002; 51(5): 1644–1648.

24. Garant MJ, Kao WH, Brancati F, Coresh J, Rami TM, Hanis CL, et al. SNP43 of CAPN10 and the risk of type 2 Diabetes in African-Americans, The Atherosclerosis Risk in Communities Study, Diabetes. 2002; 51(1): 231–237.

25. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. Physiol. Rev. 2003;83:731-801.

26. Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A. Comment: CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. Endocrinol. 2002; 87: 3971-3976.

27. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D *ve ark*. Free fatty acid-induced insülin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. Diabetes. 1999;48:1270–1274.

28. Guroff G. A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. J. Biol. Chem. 1964;239:149-155.

29. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, *ve ark*. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. Nature Genet. 1996;13: 161-166.

30. Hatemi H, Urgancıoğlu İ. Endokrin sistemi hastalıları. In: Öbek Aydoğan editör. İç Hastalıkları. Bursa, Korkmaz Ofset, 1986;p. 64-65.

31. Hilton DJ, O'Rourke PK, Welborn TA, Reid CM. Diabetes detection in Australian general practice: a comparison of diagnostic criteria. Med J Aust 2002;176: 104-107.

32. Hoffstedt J, Naslund E, Arner P. Calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced beta(3)-adrenoceptor function in human fat cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002a; 87: 3362-3367.

33. Hoffstedt J, Ryden M, Lofgren P, Orho-Melander M, Groop L, Arner P. Polymorphism in the Calpain 10 gene influences glucose metabolism in human fat cells, Diabetologia. 2002b; 45(2):276–282.

34. Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M *ve ark*. Genetic variations in Calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of Type 2 Diabetes in Japanese. The journal of clinical endocrinology & metabolism. 2003;88(1):244-247.

35. Horikawa Y, Oda N, Yu L, Imamura S, Fujiwara K, Makino M, *ve ark*. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associadet with type 2 diabetes mellitus. Nature Genet. 2000;26:163-170.

36. Horikawa Y. Calpain-10 (NIDDM1) as a susceptibility gene for common type 2 diabetes. Endocrine Journal. 2006;53(3),567-576.

37. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+}-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. EMBO J. 1999;18:6880–6889.

38. http://eu.idtdna.com/Home/Home.aspx

39. Huang Y, Wang KKW. The calpain family and human disease. Trend Mol Med. 2001;7:355-362.

40. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. Nature. 2003; 426(6968):789-96.

41. International HapMap Consortium. Integrating ethics and science in the International HapMap Project. Nat Rev Genet. 2004; 5(6):467-75.

42. Itani S, Zhou Q, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle resistance and obesity. Diabetes. 2000;49:1353–1358.

43. Kifagi C, Makni K, Mnif F, Boudawara M, Hamza N, Rekik N. Association of calpain-10 polymorphisms with type 2 diabetes in the Tunisian population. Diabetes & Metabolism. 2008;34: 273–278.

44. Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, *ve ark*. Variation in the Calpain-10 gen affects blood glucose levels in the British population. Diabetes. 2002;51:247-250.

45. Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, *ve ark*. Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. J. Biol. Chem. 2001;276:28525-28531.

46. Malecki MT, Moczulski DK, Klupa T, Wanic K, Cyganek K, Frey J, et al. Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population, Eur J Endocrinol. 2002; 146(5):695–699.

47. Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice, 2005;S10-S21.

48. Martinez E, Conget I, Lozano L *ve ark*. Reversion of metabolic abnormalities after switching from HIV-1 protease inhibitors to nevirapine. AIDS. 1999;13-805-810.

49. McCarthy MI, Froguel P. Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002;283: E217-E225.

50. Molvalılar S. Endokrin sistem. In: Molvalılar S. İç Hastalıkları. 2. Baskı, İstanbul, Alfa, 1997;392-396.

51. Neufeld ND, Raffel LJ, Landon C, Ida Chen Y-D, Vadhem CM. Early presentation of type 2 diabetes in Mexican-American youth. Diabetes Care, 1998;21:80-86.

52. Orçun A, Küçükercan İ, Çakır Madenci Ö, Kolcu N, Tekçe B. Diabetes Mellitus tanı kriterlerinin karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Derg., 2003;2: 69-74.

53. Ortho-Malender M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lidgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insülin resistance and elevated free fatty acid level. Diabetes. 2002;51:2658–2664.

54. Özkan S. Psikiyatrik ve psikososyal açıdan diyabet. Psikiyatrik Tıp: Konsültasyon-Liyezon Psikiyatrisi, İstanbul, 1993.

55. Perrin BJ, Huttenlocher A. Molecules in focus Calpain. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2002;34:722–725.

56. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance, N Engl J Med. 1996; 334:777–783.

57. Rasmussen SK, Urhammer SA, Berglund L, Jensen JN, Hansen L, Echwald SM, *ve ark*. Variants within the Calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to Type 2 Diabetes, insulin resistance and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians. Diabetes. 2002;51:3561-3567.

58. Ray SK, Matzella DD, Wilford EL: Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury: calpain inhibitor provides neuroprotection. Neurochem Res. 2000;25: 1191-1198.

59. Saez ME, Gonzalez-Sanchez JL, Ramirez-Lorca R, Martinez-Larrad MT, Zabena C, Gonzalez A, *ve ark*. The CAPN10 gene is associated with insulin resistance phenotypes in the Spanish population. PloS ONE. 2008;3(8):e2953.

60. Salman F. Diabetes Mellitus'ta egzersiz tedavisi. In: Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA, editörler. Diabetes Mellitus'un modern tedavisi. 2. Baskı. İstanbul, Özlem grafik matbaacılık, 2004;93-98.

61. Satman İ. Diabetes Mellitus'un epidemiyolojisi. In:Yenigün M, Altuntaş Y, editörs. Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; p. 69-83.

62. Shima Y, Nakanishi K, Odawara M, Kobayashi T, Ohta H. Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese. Clinica Chimica Acta. 2003;336: 89–96.

63. Shore AC, Evans JC, Frayling TM, Clark PM, Lee BC, Horikawa Y, et al. Association of calpain-10 gene with microvascular function. Diabetologia. 2002; 45: 899-904.

64. Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S. Are variants in the CAPN10 gene related to risk of Type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. Am. J. Hum. Genet. 2004;74:208–222.

65. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. Biochem. J. 1997; 328:721-732.

66. Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. J Biochem. 2001;129:653-664.

67. Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. J Cell Physiol 1994;159 (2) :229-37.

68. Sreenan SK, Zhou YP, Otani K *ve ark.* Calpains play a role in insülin secretion and action. Diabetes. 2001;50:2013-2020.

69. Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber H, Masumoto H, Nakagawa K *ve ark*. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:588–592.

70. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation and biology of calpain. Diabetes. 2004;53: S12-S18.

71. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T: Calpain: Novel family members, activation, and physiologic function. Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1995;376:523- 529.

72. Swapan KR, Edward LH, Naren LB. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. Brain Res. Reviews 2003;42: 169-185.

73. Tahmiscioğlu G. Birinci basamak sağlık kuruluşunda takip edilen tip 2 diabetes mellituslu hastaların glisemik kontrollerinin, lipid profillerinin ve yaşam kalitelerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı. Adana.2008.

74. Tamer N. Diabetes Mellitus ve hipoglisemi. In: Kadayıfçı A, Karaaslan Y, editörler. İç hastalıkları el kitabı. Ankara, MedicoGraphics Ajans ve matbaası, 1998;267-278.

75. Tonyukuk Gedik V. Tip 2 Diabetes Mellitus. Actual Medicine. 2007;15(8):32-36.

76. Tsai HJ, Sun G, Weeks DE,Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST *ve ark*. Type 2 Diabetes and three Calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: No Evidence of Association. Am. J. Hum. Genet. 2001;69:1236–1244.

77. Turhan H. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda tedavi şekline ve hastalık süresine göre depresyon ve anksiyete. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörü. İstanbul. 2007.

78. Williams G, Pickup JC. Diyabet el kitabı. 3. Baskı. Blackwell publishing. 2004.

79. Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA: Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. Journal of Neuroscience Res.2003;73: 95-104.

80. Wu B, Takahashi J, Fu M, Cheng H, Matsumura S, Taniguchi H. Variants of calpain-10 gene and its association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. Diabetes Research and Clinical Practice. 2005;68:155–161.

81. Yenigün M, Ener N. Diabetes mellitus'un tarihçesi. In: Yenigün M, Altuntaş Y, editörler. Her yönüyle diabetes mellitus. 2. baskı. İstanbul, Nobel tıp kitabevi, 2001;3- 6.

82. Yenigün M. Diabetes Mellitus fizyopatolojisi. In:Yenigün M, Altuntaş Y, editörs. Her yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001;p. 85-128.

83. Yenigün M. Diabetes Mellitus fizyopatolojisi. Kardiyovasküler Diabet. İstanbul, İ.Ü. Matbaası, 1997;p. 104-116.

84. Yılmaz MT, Kepekçi Y. Diabetes Mellitus'un modern tedavisi. 2. Baskı. İstanbul, Özlem grafik matbaacılık, 2004.

85. Yoshimura N *ve ark*. Two distinct Ca^{2+} proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. J. Biol. Chem. 1983; 258:8883-8889.

9. EKLER

EK-A: CAPN10 Tüm Gen Dizisi

```
   1 aatgggagac tagcgggccg gcgtactggc ctggtccagc acctgcgggg ccctcgggct
  61 tggagggctg ggccgggcgg ggaacgggcg gggcgggccg gaggcggcgg cggctgactc
 121 gccttctctc cggggctgcg accccgaggc aaccggctgc agatgggagc ccgcggagcc
 181 gaggatgcgg gcgggccggg gcgcgacgcc ggcgagggag ctgttccggg acgccgcctt
 241 ccccgccgcg gactcctcgc tcttctgcga cttgtctacg ccgctggccc agttccgcga
 301 ggacatcacg tggaggcggc cccaggtggg gccgtgtggg gtgcggtggg cgccgtttct
 361 ggtttctgag atctccgctc ctcgcaggga gcggggcggg gtgggcggcc agggtagctc
 421 cgaacgcagg gtccgccgtt gttctcctca gaagtgggcg cccggccccc tcttttcgta
 481 cctccttcat acccccgccc agaacgagca ggactcggcg ctaccctaag gacgctaaac
 541 taggtcgtgg cctccgcctg cgagagctcc aatccaggag gctcagagcg ctgcgagagg
 601 cgttttaaca gagccccaaa ccccgcccca cctgtttgct ttcgccctga agagcgtttg
 661 tgtctgctcc tcccgcagag agggccgctc gtgcccctct gaagtggcta ggccgagccc
 721 acaaagcaaa gcgtgataga atttcagttt tggattttgt gcacctgcct ttccagttgt
 781 aacacctaga aatggcacct ccaagggatg ccctggccga gtgctgtgtt catattttta
 841 gaaatggttt atctgctgaa taagactgcc cagggagcaa ccttgcccta agtggatgcg
 901 gtcttagcgg agacaactga tggccgccag tcttcgaaca gagctggaac ttctgggctc
 961 tcgtgactga gatggctttg acaggccacc tggtttcctt ggacaacact gaagggcctg
1021 ggaggaggca agggtcagac catgtagagc cttgtcattg gaatttgggt tttattttgt
1081 taaaagattg attttaggtg cagctggagg ccactagagg gttttggtag aggagtggtt
1141 ctcttggatg tgtgttttta caagctcact cttgctgctg ggtgggaagt gggttgtcgg
1201 ggcaagaatg caagggtcca ttgtagtggt cctggagaaa gatgaagggg ctcagattag
1261 cttgacgact gttaggatgt gggtttggag tagattggtt tgagacgtac cttgcagggg
1321 ggatcgagag gccatagtga ctgattgaaa tagagggtga ggatagtgga gggatcaaca
1381 tgccttctgg gtttctggcc tgaacaggtg ggtggatggt ggtcctggga cagagcctgg
1441 gggtgaccta gagttgggct ttgctctcac gtcttcaggt ggagctgtcc tggaggcagg
1501 tggatctgtc ctggaggcag gtggatacgg agcagggata ggctagaggc attcttctgg
1561 gaggcggagc atattagatg gtttacagtc cacagcctgg gagagtgtct cgggggagta
1621 tcagtaaaga agaagggggc cttggggctg agccttgagg aaccctaaca tttcttgggg
1681 tcaggcaggt gccctgacag atagacttga gaagcagcag gcagtgaggg agaggacacc
1741 cggggagcat gcggcctcac agaagctgag tggggaccac ctcaggggca gcagatggct
1801 gttctgctgt tgtgaatgct gctgagtagt tggggaagag agttgggacc aagagaagcc
1861 cagtgggttt gataacatag aggtgacagc gacattgatc gaggcagttt aggggccatg
1921 attggctcag aagctagagg agcctgtgtg gagagtgaat gggaagcagg tagtgggcat
1981 ggcagctctt tcaagagctg taatgaagag aagcctgaag gagactatgg tgctgagaga
2041 taatgtctta aagaacatgg gggtgggatt ctgcccgggg agctggaagg gaaggagttg
2101 tgagaggagc ccaggctctg agggcaggag agagggtcag gtccagaagc aggaggcaag
2161 gtcgaagctc agaggggtgg gcaagggcag tgtggatgtt ttgagtagac ggggagaaag
2221 gggaaggtat atgatagtta gggggtgtgg gaaatggagc ctgctagaga aacagatttc
2281 cagcaggatg gaggacacat ttgagattta ccagcatgag taaaaagtga aacttttcga
2341 agccaacatt tagctgtttt gagaaggagc ttgctagagt ttgggatttt tccagtaagg
2401 aaggaaggca ccccagaatt aagctggaca gaggcatttg aagccaggag ctgaaggaca
2461 cccgctgcag gaaaccacct tcctgtccct ttttgggtaa cactgatgat cggaaaagct
```

2521 ccaccccaac tcctgtcatc tagagccttg ggttcttagt ttgaagggtt ccacagcagg
2581 catgatctaa ctctggacaa ctttctgtat ctcaggagat ttgtgccaca ccccggctgt
2641 ttccagatga cccacgggaa gggcaggtga agcaggggct gctgggggat tgctggttcc
2701 tgtgtgcctg cgccgcgctg cagaagagca ggcacctcct ggaccaggtg cggggcccct
2761 tccctgtgtt tgtcctggag ccggtttctt tttgcgtttc tccagcctgc tgagtaccag
2821 gaggccttgc gaaagcagag ctgtgccgca gccggatctc ctgctgtgtt gggggaaggc
2881 aggagagttc caaggcagag gctgaggact gcactctgtc cctctgctgc aggggggggt
2941 gccttggcct cgccagaagg ctccatcagg gaggttcgcc ctgctctgtg ctctcctgac
3001 ccccggactc catggagtca gatcaccacg tttagaataa agagacaaat gtgccagctc
3061 acaggaggac ggggctggct ggcagcctct gcctcagatc tctcctcagc tagctcgctg
3121 gttttcttac aggttttgaa tataagtttg caaaaagtta ttaaacctgt ttctgtgggt
3181 agacagatac tctgggagga gaaggccttc tcaggttttc cttacctggg agtgttcacc
3241 gttttatgct tggcttgttg ctaagtgttg ctgattaatg cagcggcgtc aacagtgtga
3301 cctcattcag agtttcactc atgtcccagg ccccatggta agcgtgtcac agtcactggc
3361 tttcagacac atggtcttac cagctttgac ttttttttta aacgagagtg ctaaaatcac
3421 tgccattgtg tttctggccg taaagtggca gagccaggac cgcaccaggt gcctggtgcc
3481 cagcctgcac tcccccgatg ctgggtcaga atgcttaccc ctgaaggagc cctgcggtgg
3541 acgctgtggg tgcaagcagc tggcccagtg tcggggcgcc aggctcccag cagcaggagg
3601 ggctgctgtt cctgtggtga cgtgttgctt gcagccagct cggtcaagaa ctgggtcact
3661 catgcccttg aatgtcacat ttgttttggc ttcaggtcag atgcttttag tgagggcagc
3721 agagtgtgtc ccgggatatg tggctccctc ggtgtggtcc tcaagttttg caatgagagg
3781 tctgttaatt tcatgtgggt gatgcagccc tgtgcaggcg ccgacatcca ggtgtgccga
3841 agagttctct gcgacatcca ggtgtgccgt agagttctct gcgacatcca ggtgtgccgt
3901 agagttctct gcgacatcca ggtgtgccgt agagttctct gcgacatcca ggtgtgcgtt
3961 agagttctct gcagaccgcg gtgcctgtgg agcactcagc tgtggccaca ccgcggccgg
4021 gacactggag tagcgccggg tggtgcttat atcacgctcg ccttttgctt ctccctgtgc
4081 atggcaggtc attcctccgg gacagccgag ctgggccgac caggagtacc ggggctcctt
4141 cacctgtcgc atttggcagt ttggacgctg ggtggaggtg accacagatg accgcctgcc
4201 gtgccttgca gggagactct gtttctcccg ctgccagagg gaggatgtgt tctggctccc
4261 cttactggaa aaggtctacg ccaagtgcgt gtgctggggg ctgaagggcc tggcctgggg
4321 caagtgggag ctgccactac catgggctgc cccaggaggg tctctgctca ctctgggctg
4381 cagagccccc ttcagttctg agggtctggc agctcattct gtgagtcagg ctgacaggcc
4441 aggtgcagag attcttcttt tgggcctgtg gattgcccac tccctgcttt cccttccctt
4501 gttccaaagc ccagcgtgga gtcgttctcc acagagaaca tgtgtgccgt cctccttatt
4561 ttatcggccc cagcaagaaa gatgcttctt tatatttgtt gtggagtggt tgggacaggc
4621 agactcattg tgtagtcgtt ggggaggaat gaggctaccc cagcatacca acacttgtgt
4681 atcacggtgc ttgctggctc aggggaccag gaccctcacc atgagtcata attgaatagc
4741 cttccctctt agaatgcatt tgtcttcttg ccaaaggcaa ctggactgac aggcaggcag
4801 ggaagctggt gaacatggga aggctggctg gtgacatcag tgcccagtga gcccttccat
4861 cccaagggct gttttaggaa aagcagggtt ggagcttgag agccaaggga tgtgggcatc
4921 catagcttcc acgcctcctg ccctgctcct gtgcccacac cggatgccag agagtttctg
4981 tgtgtgggca gaggactgca gggcgctcac gcttgctgtg aagtaaggcg tttgaaggtg
5041 aggctaagcc ttgacttggt gaggatgagg aagaaggcag aggggagtaa agaggtggga
5101 ttgaggcagc ggttggacga tttggggtgc tacagaccat gggaatcaga gaggggccca
5161 tgctcaatgc cagaggctca ctcccatggt gattgtgtcc cctagggtcc atgggtccta
5221 cgagcacctg tgggccgggc aggtggcgga tgccctggtg gacctgaccg gcggcctggc

5281 agaaagatgg aacctgaagg gcgtagcagg aagcggaggc cagcaggaca ggccaggccg
5341 ctgggagcac aggacttgtc ggcagctgct ccacctgaag gaccagtgtc tgatcagctg
5401 ctgcgtgctc agccccagag caggtgaggc acgtggccag catgggaggg ctgcagccag
5461 cgtgcccccc actgccaggc ctcaggcaca ctgtagcttt ttatgtgact ggctacacag
5521 ccctgtcagg actaagtggg aagaagtaag cttgttctca agggtggtgt cctcagtttg
5581 tgaccttccc ctactgtcct cttccagagg gacgtggccc ttctctcccc tgaccagtcc
5641 tttccactag tgcgaggcag gaagaggtgg caccgagtca aagcccactg tctgtgccat
5701 ccctggccca gctggcaacc tggcaaaatc aaaacctgtt ttttatttta gtgatagata
5761 acattcgtta aaaacagttt gtctccaaaa aatgaaaggg gccaggtgtg gtggctcaca
5821 cctgtaatcc cagaactttg ggaggctgag gtgggagtat cgctggagcc caggagttca
5881 agagacccgc ctgggcaaca tggcaagatc tcatctctac aaaaaatgaa ggaaaaaaat
5941 cacttagatg gaaccacatg tgacttttga gtgcgctctc agttttccat gagcacgcac
6001 ggtttacgtg ttcccttccg caccgcttct cacactgcca cacacgcgct gtcaaatgtt
6061 cgccccatga gcgggtttgc cacagtctct taatcattcc cctgatgttg gatattaaga
6121 tctctctggt tttatataat tataagcagt atcaatgaac atctttatca ttttttttcat
6181 acttaggatt attttaaaaa tatgggttaa agaatatgaa tatcacagta aactgaaaca
6241 agttgtcata ggccttggtc tgggtccccc ataagcagac cctgagatga ggttcaggag
6301 cacgttgaga ggttcagaga gcctggaggg cgtgtactcc ccgccagccc cgctggggtg
6361 ccaggaagga cgctggcctc agagcctccc acctgggagt gagggcgctg gtctggtggg
6421 cattagctcg gggagctgtt ggttttgggt gctccagggt ggggtagcgc taagtcctag
6481 cacttcaggc tttagaggaa gcccccaggc agagagagat ggcagctggc actgactgga
6541 ggtgcattgg agcctgctga ggtggcaagg ggccgcggcg tgggcgagac tgaagtcctt
6601 ccaggagacc ctcctctcta gaccgttgcc ccgccacaga tgtggccttc ctctctgttt
6661 ggctctttct tttctatgcc catctgtctc aaggtctctg gccaggtgga gctgttgccc
6721 ccctgggcct ccatgcctcc agtgggcttc tagccagggc actatctgaa tgtcctacct
6781 ctagcaggct ttgccaagag aaacactctc tagatttctg gcagttgcag atgcatctgt
6841 gcagcatgtt tgagaactgg tgctgtgcca ggcatcgtgc acagatgggt acggacgatg
6901 actgaggcct agagaagggg atgacttacc cagcaccaga cccggatggc agccgagtca
6961 ggccccgtgt gcttgctcct ggagatgctc ctgagctgat gggtcacagc tgctaagaaa
7021 ggagctctcg tggtccatgg ggatctgggg tctcccgtgt agccatagtg gggtgggctg
7081 gagcatctcc agaggaggag gcagaggcct gtgtgtcctt gtcagtttgg gactccatgg
7141 tgcccttcct gcctgtgcct gcgccattcc tcatgcaggt gcccgggagc tgggggagtt
7201 ccatgccttc attgtctcgg acctgcggga gctccagggt caggcgggcc agtgcatcct
7261 gctgctgcgg atccagaacc cctggggccg gcggtgctgg caggggctct ggagagaggg
7321 gtgagtgctg gggcctggac catgctgctg tcgggagggg ggcccagtgc cagtctggcc
7381 tgtgtcctgg tcaccttcag ctgtcaggac tgtacttggc tgtctccagc aaggcccctg
7441 agtccctgct ctcgtgacac catgcttgtc ttggctccag gcaatccttg tgaggcctgg
7501 gaccaaggtg gccattgggc ctggggtttc aatagggcag acatcatcac gggctcgggc
7561 agcagtcctg ggaagacgca tccagaggcg tgaagttcct ctgggaaaag agagggctcc
7621 agggtggccg ctgcccagaa ggccctgtgc tgcagagctg cttcgggtgt gggaggggct
7681 gcagagctgg ggcacggggt tgctggcagg aactcagggc tctctgggtc ccctccaggc
7741 ttccccccag cctgccggca agttgacact accagttctc gggaggggct tctgctgaga
7801 tgaggtttct tccaggggtg aagggtggag ccaggtagat gcagcggtag catctgagct
7861 cctgtcccag ctccaggaag gggagttctg ggtggaggag gaggagttcc tcagggagtt
7921 tgacgagctc accgttggct acccggtcac ggaggccggc cacctgcaga gcctctacac
7981 aggtagtgcc ccgaggggct gtgctgggca cgtgctctgc ctgccgaagt gaggaggctg

8041 ggcaggtgcc tgggttcccc ctgcccaggc ccagtttggt tctcttcagc gtggagagat
8101 gattctgtcc caggagccgg gaggagggtg atgattctgt cccaggagct gggaggaggg
8161 tgggcttgtg ggaggggctg gctctgtctg tggccgtagc tgctgcttag accctgccag
8221 ggttcatgag gccaccatgg cgggaggcca gcgaggagcc gtgtcccaca gctgatgcct
8281 ggtgttttct cactagagag gctgctctgc catacgcggg cgctgcctgg ggcctgggtc
8341 aagggccagt cagcaggagg ctgccggaac aacagcggct ttcccagcaa ccccaaattc
8401 tggctgcggg tctcagaacc gagtgaggtg tacattgccg tcctgcagag atccaggctg
8461 cacgcggcgg actgggcagg ccgggcccgg gcactggtgg gtgacagtca tacttcgtgg
8521 agcccagcga gcatcccggg caagcactac caggctgtgg gtctgcacct ctggaaggta
8581 actcagcccc gtctggctca cgctcggttc agcaggtggt gtggaggccc atggaggtct
8641 gggttctagg actggctctg ccgggacaca tgtgactctg ccacgggccc caccagtctc
8701 ccccctcctt gggctgttgc acggggttga cgtctgctgg tgctcccaga cccggctctg
8761 acctgagact gcaggtcttt ctgccttgcc gtgtgcctca ttggccaaag gaaagcaaca
8821 gagtctgcag ccagggcagg acccgcagga ggggcctgga cccggggggc tcctggcagc
8881 gccgtgcctt tctgaggcaa ggaggtagag ccagcggctg aggacctgtc agggccagtc
8941 ccagctctgc agcttgctgt gtgacctggc acacatcctc tccctgcctc cctcagtctc
9001 ttcccctgca agacggggtc ctgacacgga tctcatggga ttgctctgag gcccaggcag
9061 tcccaggctc aaccactggt tcacaaagtg tgttgtttcc aggaagaaca gatgggggcg
9121 cctgagggca aagggcctga gtgtgggtcg aggatatgcc ggctgctcgc tcaggggctg
9181 ggttttcatc ttgtgtgtct tgacagggtg tgacacttgg caccacactg ttccctgtcc
9241 cttcatggat gtggcccaca tgatgttcct ttcctcttgc aaaagaagtt gctggaaggc
9301 ccactgtcca gcagccccca ggttgcctgg gccacggtgc ctttgtgggc ccagctacaa
9361 ggaggacttg caggctcgtg tctgggacag atactggcgc cagggccaag tgaagcccgg
9421 gattggtggg catctctagc tggtccctga gagagggtgg agggtgctga caggccttgg
9481 cgctttcatc tgtcaactcc agaggccctt gtgcttgcag cagggaggtc aaggccaggg
9541 cgtctgaccc cggccgctcc tccacactga gcctcctgca cgtgctcaca ggtagagaag
9601 cggcgggtca atctgcctag ggtcctgtcc atgccccccg tggctggcac cgcgtgccat
9661 gcatacgacc gggaggtcca cctgcgttgt gagctctcac cgggctacta cctggctgtc
9721 cccagcacct tcctgaagga cgcgccaggg gagttcctgc tccgagtctt ctctaccggg
9781 cgagtctccc ttaggtgaga ggaaccgcgc agtgctgctg gctctccgag gccacaggcc
9841 cttccaaggc aggatttggg cactttccct ctgtggttgg caggtgtcca tgtgggaact
9901 gaggccaccg ggaacctgct gccagcgccc tcccatgttt gtcttcttgg cagcgccatc
9961 agggcagtgg ccaagaacac cacccccggg gcagccctgc ctgcgggggа gtgggggacc
10021 gtgcagctac ggggttcttg gagagtcggc cagacggcgg ggggcagcag gaactttgcc
10081 tcatacccca ccaacccctg cttccccttc tcggtccccg agggccctgg cccccgctgc
10141 gtccgcatca ctctgcatca gcactgccgg cccagtgaca ccgagttcca ccccatcggc
10201 ttccatatct tccaggcaag ctccttgccc cagggaggga gggggagcag aaggggccct
10261 cagagaattt gcatcttggc ctccattgtc ccaacagagg gctctgggct cagtcacttg
10321 ggctcccccc gcccttcgag gcgctgccta gaacccgcac agggccctct cccatctcca
10381 acctctcaga ggcaaggccg aagatggcct ctggaagggc cgggggcctg ggaggtgggc
10441 agggctgatc caggcagggc aggtttccag aggaggtggt gagtggggag gaagggagaa
10501 gtttggagag gacaggaggc cgaggttgag accagcgggg gtgggtcgag ccctggcttg
10561 ggaacgcagg gggctgatgg actcaggagt gagaggaggg gaggcccagg ctggctggcc
10621 acagcagccc ctcgggtgtg aggaagtcca cagtcactga gctcagccag cagccccttg
10681 tccacttacc ctgactcaga atgactgtgt cccaaggttc attctctgca gacatgtgtc
10741 ccctggaatg caggggccct gacgaggaag gcactgcaac cctcggttca cagtgggctg

10801 cctggggacc cttggaccct cgctgtttgc cctgggccac cggctcaggt cccctagagc
10861 tctgaggaaa acacatgcca gggccagtgg gagcccttgg ggcgggctgg gcagtcacag
10921 gtgttaaagc ccctgatgat gtgacaggcc tccaggcggg ggccccactg ccggcacctt
10981 ctggcaaggg tggccaggcc ttggtgagga ggcgagtcca gtgtccaggc ctggcagccc
11041 ctcctcagag aaggggctgt atgtgactca agagggccaa gggcatccga gcagatggcc
11101 ctgggctggg ctccctaccc caaggctggc cccctcagtc tgagcctgcg ctttcctcag
11161 gtcccagagg gtggaaggag ccaggacgca cccccactgc tgctgcagga gccgctgctg
11221 agctgcgtgc cacatcgcta cgcccaggag gtgagccggc tctgcctcct gcctgcgggc
11281 acctacaagg ttgtgccctc cacctacctg ccggacacag agggggcctt cacagtgacc
11341 atcgcaacca ggattgacag gtggggctct gggacttggg ggcggccagc tggaggctgg
11401 ggtgctggag tcttagtgct cgcctgtccc cccacgtctc ctgcctgccc ctcaccctca
11461 agcccctatc tgtcctggca gaccagggct gtcctgccta cctggggacc cttccttgct
11521 ggtctgagcc tggaaggaga gtctagtggg aggtgggcca ggagcacaca gccacttgtg
11581 tgacaagtgc agtctgggag cgctgatctg gtgtctctcc acaggccatc cattcacagc
11641 caggagatgc tgggccagtt cctccaagag gtgtgtatgc agccccgcca gcccggctca
11701 cctgcctggg gctgcctggt ggcctagggt ctacctgcaa cctcaggcag gtggtttctg
11761 cctgggacgt gaggtgccct tgactcttcc tgtgagagcc ccgggcggtg ccttgaaggg
11821 caggggggagc tgaggctgcg tcccattccc tggctgcact cggggtgggg tgtgagaagg
11881 ggcgagtgcc accgctgccc gggcccccca tctgtctttg caggtctcca tcatggcagt
11941 gatgaaaacc taacagggtg gccccctgtg ccagctcagg tgactggagc ccgagggcct
12001 gacaggttcc cagcagctgg gccggccagc cttgcactgt gggggctggt cctgagtctt
12061 ggcctgcctc ccagccctgc caggaggctg cggcctaggg gtccacggga agcctccgtc
12121 aggagagacg cagccctggg ggccagctgg tgctgcaagg aagggtggga agcttgctgg
12181 cttctgttgc gccactgaga cggcagagac cccaggatcc cagagcttcc caggatccct
12241 cccagatcct ctgctgactc catatggagg cctcacaccc agagggtagg gcagcagatc
12301 ttctttataa ctatttattg ttcgaatcac ttttaggatg taactttata aataaacatg
12361 agcgctgatg atttgc

10. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Konya'da doğdu. İlköğrenimini 1987 – 1992 yılları arasında Konya Nesrin ve Ayşegül Kardeşler İlkokulu'nda yaptı. Ortaöğrenimini 1992 – 1995 yılları arasında Konya Karma Ortaokulu ve 1995 – 1998 yılları arasında Konya Atatürk Kız Lisesi'nde tamamladı. Üniversite öğrenimini 1998 – 2002 yılları arasında Konya Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında 6,5 ay staj yaptı. 2003 – 2006 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yaptı. 2006 yılında aynı bölümde doktora eğitimine başladı.