

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TİP 2 DİABETES MELLİTUS HASTALARINDA NEUROGENİN
3 VE SIRTUİN 1 GEN POLİMORFİZMİ VE GEN
EKPRESYONU'NUN PATOGENEZDEKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Erhan ÖNALAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emir DÖNDER

**ELAZİĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi Standartları'na uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Tez Danışmanı

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime bilgi ve tecrübeleriyle emeği geçen ve bu tezin oluşmasında katkısı olan Dahiliye Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir DÖNDER başta olmak üzere diğer tüm saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran ve her konuda destek olan Tıbbi Genetik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Murat KARA'ya, Fırat Üniversitesi Tıbbi Genetik Bilim Dalı Arş. Gör. Dr. Kürşad KARGÜN'e ve tezimin istatistiklerinin yapılması ve sonuçlarının yorumlanma safhasında emeği geçen Dr. Celal ALANDAĞ'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım dostluklarını esirgemeyen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, iç hastalıkları bilim dallarında çalışan tüm hemşire ve personellere teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ayrıca her türlü desteğini esirgemeyen ve varlığıyla güven veren eşim Rojda'ya teşekkür ederim.

ÖZET

Diabetes Mellitus (DM) tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıklardan biridir. İnsülin hormon sekresyonu ve insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik metabolizma hastalığıdır. DM; pankreasın salgıladığı iki hormondan biri olan insülinin salgılanmaması, yetersizliği veya etkisizliği sebebi ile kan şekeri düzeyinin normalin üzerinde bulunması sonucu teşhis edilir. SIRT-1 geni, glukoneogenez geninin indüksiyonunda ve glikolitik genin regresyonunda gereklidir. Yapılan çalışmalara göre SIRT-1 geni iskelet kasında insülin duyarlılığının geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Pankreatik adacık hücre diferansiyasyonu ve rejenerasyonu için temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü neurogenin 3 (Ngn3) kritik role sahiptir. Elde edilen sonuçlarla Tip 2 DM hastalığına yatkınlık, Tip 2 DM hastalarında tedavinin etkinliği ve bunlara yönelik tedbirlerin alınması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Neurogenin 3 ve SIRT-1 Gen polimorfizmi ve ekspresyonu ile Tip 2 DM hastalığına yatkınlık, tedavide etkinliği ve kontrol arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışma Elazığ ili civarındaki Tip 2 DM tanısı almış 30 yaş üzeri gönüllü ve sadece oral antidiyabetik tedavi alan 10 erkek ve 10 bayan ve ilaç tedavisi almayan gönüllü 10 erkek ve 10 bayan toplam 40 hasta ve 30 yaş üzeri gönüllü 20 erkek ve 20 bayan toplam 40 kişilik kontrol grubu alındı. Çalışma gruplarında rutin kan tetkiklerine ek olarak Neurogenin 3 (Ngn3) ve Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonu çalışıldı. Çalışmamızda Tip 2 DM (n=40) ve kontrol (n=40) grupları SIRT1 rs7895833 geni ve Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizimleri açısından karşılaştırıldı. SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizimi oranları açısından bu iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0,383$).

Sirtuin1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 ekspresyon düzeyleri ve Tip 2 DM durumu ile SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 gen polimorfizimleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Fakat daha önce yapılan bazı çalışmalarda bu parametreler arasında ilişki tespit edilmiştir.

Çalışmamız bölgemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olması açısından önemlidir. Sonuç olarak; SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 SNP bölgeleri ekspresyonu ve polimorfizmi açısından Tip 2 DM ve kontrol grubu arasında anlamlı

farklılık saptanmamıştır. Fakat her iki gen ekspresyonu ile BMI arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Yapılan fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklemesi ve Ngn-3'ün pankreas öncülünden beta hücreye dönüşümde önemli bir kritik rol üstlenmesi gelecekteki yeni nesil farmasotiklerin Ngn-3 ve SIRT 1 ekspresyonunu negatif veya pozitif olarak etkileyen yolların hedef olarak kullanacaklarını göstermektedir.

Sirtuin1 ve Ngn3 geni polimorfizmi genotip oranlarını ortaya koyması bakımından ileride yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 DM, SIRT1 polimorfizm, Ngn3 polimorfizm, SIRT1 ekspresyonu, Ngn3 ekspresyonu

ABSTRACT

IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS NEUROGENIN 3, THE SIRTUIN 1 GENE EXPRESSION AND POLYMORPHISM

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most common endocrine diseases in the world. As a result of insulin hormone secretion and the shortage of insulin effect, it is a chronic metabolism disease causing disorders in carbohydrate, protein and fat metabolism. DM is diagnosed through determining the blood glucose level above normal due to the failure, shortage or ineffectiveness in secreting insulin which is one of the two hormones secreted by pancreas. SIRT-1 gene is necessary for the induction of gluconeogenesis gene and the regression of glycolytic gene. The studies in literature report that SIRT-1 gene plays an important role in the development of insulin sensitivity in skeletal muscle. Neurogenin 3 (Ngn3), the basic helix-loop-helix transcription factor, has a critical role for pancreatic islet cell differentiation and regeneration. Through the obtained results, the susceptibility to Type 2 DM disease and the effectiveness of the treatment in Type 2 DM patients are aimed to be examined and measures for them are aimed to be taken.

The presents study examines the susceptibility to Type 2 DM disease, the effectiveness of treatment and its relation with control through Neurogenins 3 and SIRT-1 Gene polymorphism and expression. The present study included volunteered 40 patients who live around Elazığ Province, who were diagnosed with Type 2 DM and who aged over 30 years (10 male and 10 female who received only oral anti-diabetic treatment and 10 male and 10 female who received no medication) and volunteered 40 individuals in control group (20 male and 20 female) who aged over 30 years. In the study groups, in addition to routine blood examinations, Neurogenins 3 (Ngn3) and Sirtuin1 (SIRT-1) gene polymorphism and gene expression were examined.

The study compared Type 2 DM (n=40) and control (n=40) groups in terms of SIRT1 rs7895833 gene and Ngn3 rs4536103 gene area polymorphisms. There was no significant difference between these two groups in terms of SIRT1 rs7895833 and Ngn3 rs4536103 area gene polymorphisms rates ($p=0,383$).

The study determined no significant difference between SIRT1 rs7895833 and Ngn3 rs4536103 expression levels, and Type 2 DM state, and between SIRT1

rs7895833 and Ngn3 rs4536103 gene polymorphisms. However, some of previous studies determined relationship between these parameters.

The present study is important for being the first to examine this subject in the study area. In conclusion, the study determined no significant difference between Type 2 DM and control groups in terms of the expression and polymorphism of SIRT1 rs7895833 and Ngn3 rs4536103 SNP areas. However, a negative correlation was determined between both two gene expression and BMI. In addition to the functional studies conducted, genetical and pharmacological inhibition of SIRT1 induces insulin resistance and plays a significant role in the transformation of Ngn-3 from pancreas precursor to beta cell, which all indicates that new generation pharmaceuticals in future will be used is the target of pathways negatively or positively affecting Ngn-3 and SIRT 1 expression.

Sirtuin1 and Ngn3 gene polymorphism is thought to contribute future studies since it reveals genotype rates.

Keywords: Type 2 DM, SIRT1 polymorphism, Ngn3 polymorphism, SIRT1 expression, Ngn3 expression

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	2
1.1.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı ve Sınıflaması	3
1.1.3.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflaması	4
1.1.4. Tip 1 Diabetes mellitus	5
1.1.5. Tip 2 Diabetes Mellitus	6
1.1.6. Gestasyonel Diabetes Mellitus	7
1.1.7. Sekonder Diyabet	8
1.1.8. Genetik	9
1.1.9. DNA'nın Yapısı	9
1.1.10. Replikasyon, Transkripsiyon ve Translasyon	10
1.1.11. DNA'nın Sınıflandırılması	10
1.1.11.1. Gen Düzeyinde Mutasyonlar	11
1.1.11.2. Gen Polimorfizmleri	13
1.2. Sirtuin 1	13
1.2.1. Sirtuin 1'in DNA tamirindeki rolü	13
1.2.2. Sirtuin 1 ve hücre ölümü	14
1.2.3. Sirtuin 1'in metabolik regülasyonundaki rolü	15
1.2.4. Sirtuin 1 ve ilişkili hastalıklar	16
1.3. Neurogenin 3 (Ngn 3)'ün Adacık Hücre Differansiyasyonundaki Rolü	18

1.3.1. Neurogenin3'ün Endokrin Pankreas Farklılaşması Esnasındaki Önemi	19
1.3.2. Neurogenin3 Geni Ekspresyonunun Düzenlenmesi	21
1.3.4. Gen ekspresyonunun Ngn3 ile düzenlenmesi	25
1.3.5. Ngn3'ün β Hücre Rejenerasyonuna Uygulanması	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gen Ekspresyonu ve Polimorfizmin Çalışılması	28
2.2. Genomik DNA İzolasyonu (İnvitrogen™ PureLink™ genomik DNA kitleri)	28
2.3. mRNA'nın Magnacompact ile izolasyonu	29
2.4. SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 Genotipinin Saptanması	29
2.5. SIRT1 ve Ngn3 Geninden Eksprese olan mRNA Düzeyini Ölçme Yöntemi	30
2.6. İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR	31
3.1. Genel Popülasyon	31
3.1.1. SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmi	31
3.1.1.1. SIRT1 rs789583	31
3.1.2. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi	32
3.1.3. Ngn3 rs4536103 Gen Ekspresyonu (mRNA Düzeyi)	32
3.1.4. SIRT1 rs7895833 Gen Ekspresyonu (mRNA Düzeyi)	33
3.1.5. Tüm çalışma gruplarında Ngn3 rs4536103 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	33
3.1.6. Tüm çalışma gruplarında SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	34
3.2. Hasta Grubu	34
3.2.1. SIRT1 rs7895833 ile Ngn3 rs4536103'nin genotiplerinin ki-kare karşılaştırması	34
3.2.2. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi	35
3.2.2.1. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi	35
3.2.2.2. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi	35
3.2.3. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi	35

3.2.3.1. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi	35
3.2.3.2. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi	36
3.2.4. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi ekspresyonu	36
3.2.4.1. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi	36
3.2.4.2. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi	37
3.2.4.3. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi	37
3.2.5. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi ekspresyonu	38
3.2.5.1. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi	38
3.2.5.2. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi	38
3.2.5.3. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi	38
3.2.5.4. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi	39
3.2.5.4. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi	39
4. TARTIŞMA	40
5. KAYNAKLAR	46
6. ÖZGEÇMİŞ	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri	3
Tablo 2.	Bozulmuş Glukoz Toleransı ve Bozulmuş Açlık Glukozu	4
Tablo 3.	Diyabet'in Etyolojik Sınıflandırılması	5
Tablo 4.	ADA ve WHO'ya Göre GDM Tanı Kriterleri	8
Tablo 5.	rs12979860 gen bölgesi polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırması	31
Tablo 6.	Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırması	32
Tablo 7.	Hasta ve kontrol gruplarının Ngn3 rs4536103 gen ekspresyonu düzeyleri açısından karşılaştırılması	33
Tablo 8.	Hasta ve kontrol gruplarının SIRT1 rs7895833 gen ekspresyonu düzeyleri açısından karşılaştırılması	33
Tablo 9.	Tüm çalışma gruplarında Ngn3 rs4536103 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	33
Tablo 10.	Tüm çalışma gruplarında SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması	34
Tablo 11.	SIRT1 rs7895833 ile Ngn3 rs4536103'nin gen bölgelerinin polimorfizmlerinin ilişkisi	34
Tablo 12.	SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi	35
Tablo 13.	SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi	35
Tablo 14.	Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi	36
Tablo 15.	Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi	36
Tablo 16.	Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM'u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi	37
Tablo 17.	Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM'u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi	37
Tablo 18.	Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM'u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi	37
Tablo 19.	SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM'u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi	38

Tablo 20. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi	38
Tablo 21. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi	39
Tablo 22. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi	39
Tablo 23. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	SIRT1'in Farklı Dokularda İnsülin Sinyal Yollarını Düzenlemesi	18
Şekil 2.	Gelişen pankreasta endokrin farklılaşması işlemi.	19
Şekil 3.	Proendokrin hücrelerinin farklılaşmasının önerilen modeli.	24
Şekil 4.	Ngn3'ün endokrin hücreler üzerindeki etki mekanizması.	26
Şekil 5.	SIRT1 rs789583 gen bölgesi polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki oranları	31
Şekil 6.	Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki oranları.	32

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACAT-1	: Açıl CoA-Kolesterol açıl transferaz-1
ActRI	: Aktivin reseptör tip 1
ActRII	: Aktivin reseptör tip 2
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
AMPK	: Adenozin Monofosfat Aktive Protein Kinaz
Anti-GAD	: Anti glutamik asit dekarboksilaz antikor
Anti-IAA	: Anti insülin oto antikor
Anti-ICA	: Pankreas adacık hücre antikor
Anti-ICSA	: Anti adacık hücresi yüzey antikor
APG	: Açlık Plazma Glukozu
AR24J	: Sıçan pankreas hücresi
ATP	: Adenozin trifosfat
BAG	: Bozulmuş Açlık Glukozu
BGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
bHLH	: Temel sarmal döngü sarmal alanı
DCCT	: Diabetes Control and Complications Trial
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EASD	: Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
FFA	: Serbest yağ asidi
FOXO	: Forkhead box class O
GDM	: Gestasyonel Diyabet Mellitus
HAPO	: Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study
HbA1c	: Glikozile Hemoglobin
HDL-K	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HES	: Saçlı ve split tipi protein
HGF	: Hepatosit büyüme faktör

HL	: Hiperlipidemi
HOMA-IR	: Homeostasis Model Assessment İnsülin Rezistansı
HT	: Hipertansiyon
IDDM	: İnsüline Bağımlı Diyabetes Mellitus
IDF	: Uluslararası Diyabet Fedarasyonu
IFCC	: Uluslararası Klinik Kimyacılar Federasyonu
İκB	: İnhibitör of κB kolestrol transportunu sağlayan nükleer reseptör
JNC-VII	: The Seventh Report of the Joint National Committee
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KB	: Kan Basıncı
KKY	: Konjestif Kalp Yetmezliği
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LADA	: Erişkin Geç Otoimmün Diyabeti
LDL-K	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LXR K	: AMP-aktive protein kinaz
MAPK	: Mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz
MI	: Miyokard infarktüsü
MKK3	: Mitojen etkinleştirilmiş protein kinaz kinaz 3
MODY	: Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	: Messenger ribonucleic acid
NCEP, ATP III	: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NeuroD1	: Neurogenic Differentiation 1
NF-KB	: Nükleer faktör kappa B
Ngn3	: Neurogenin 3
NGSP	: National Glycohemoglobin Standardization Program
NHANES III	: National Health and Nutrition Examination Survey III
NIDDM	: İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabetes Mellitus
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PG	: Plazma Glukozu
PGC1a	: Peroxisome proliferator– activated receptor gama-coactivator 1α

PI3K	: Fosfatidil inozitol-3 kinaz
PP	: Pankreatik polipeptid
PPARγ	: Peroksizom proliferatör aktive reseptör-gama
RFLP	: Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmleri
SIRT1	: Sirtuin 1
SNP	: Tek nokta değişimleri
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences Software
TGF-B	: Transforming growth faktör beta
TKŞ	: Tokluk Kan Şekeri
TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
TURDEP-II	: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması - II
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
WAT	: White adipose tissue
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM); kronik hiperglisemi ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır. İnsülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve / veya insülin direnci sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluklarıyla karakterizedir. DM'da kronik hiperglisemi akut metabolik komplikasyonların yanısıra, uzun dönemde vücudun çeşitli organ ve sistemlerinde özellikle gözler, böbrekler, kalp ve kan damarlarında olmak üzere hasarlara ve fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. DM klinikte polidipsi, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifaji gibi belirtilerle ortaya çıkar. Nonketotik hiperozmolarite veya ketoasidoz gibi daha ağır formlarında hızlı ve etkin tedavi yapılmadığı takdirde stupor, koma ve ölüme yol açabilir. Semptomlar genellikle hafiftir bazen de yoktur. Çoğu kez klinik açıdan farkına varılamayan hiperglisemiler organ ve sistemlere hasar verir ve tanı sırasında hastada komplikasyonlara rastlanır (1, 2). Diyabet yaşam boyu süren, hastayı olduğu kadar, yakınlarını ve toplumu ilgilendiren, oluşturduğu komplikasyonları pahalı olan, yaşam kalitesini bozan ve sıklığı giderek artan bir hastalıktır (3).

Ülkemizde Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması) verilerine göre diyabet sıklığının %13,7 olduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra; toplumda bilinen diyabetik birey kadar, bilinmeyen diyabetik bireylerin de bulunduğu düşünülerek bu oranların daha yüksek olabileceği tahmin edilmektedir (4).

Tip 1 diabet otoimmün bir hastalık olup pankreas beta hücrelerinin yıkımı sonucu ortaya çıkar. Tip 2 diabet ise insülin direnci ve pankreas beta hücrelerinin insülini salgılamasında görülen bozukluğun bir arada bulunması sonucu olur (5).

Bu çalışmada, diyabetik hastalarda, Neurogenin 3 (Ngn3) ve Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmaktadır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Tanım

Diabetes Mellitus tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıklardan biridir. İnsülin hormon sekresyonunun ve etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat,

protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik metabolizma hastalığıdır (6, 7). Diabetes mellitus'ta görülen semptomlar poliüri, polidipsi, kilo kaybı ve bazen de polifaji ve görme bozukluğundan oluşmaktadır. Ketoasidoz ve nonketotik hiperosmolar koma diyabetli hastalarda yaşamı tehdit eden akut komplikasyonlardır. Uzun dönem komplikasyonlar ise retinopati, nefropati, nöropati, gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler semptomlara yol açan otonom nöropatiyi içerir (8).

1.1.2. Epidemiyoloji

Günümüzde genetik özelliklere çevresel ve kültürel faktörlerin eklenmesi özellikle Tip 2 DM prevalansında artmaya neden olmuştur. DM' un sinsi seyirli olması nedeniyle prevalansının saptanması kayıtları en iyi tutulan ülkelerde bile mümkün olmamaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) verilerine göre 20 yaş ve üzeri nüfusta 2002 yılında 18 milyon diyabetli bulunurken, 2007'de 23,5 milyon Amerikalıda diyabet saptanmıştır (9).

Türkiye'de diyabet taramaları ile ilgili veriler, ilk kez 1960'lı yılların başında Türk Diyabet Cemiyeti'nin başlattığı taramalarla bildirilmeye başlamıştır. O dönemde glukozürinin sıklığı ile başlatılan çalışmalarda 18 yaş üstünde ortalama %1,5-2 aralığında bir prevalans bildirilirken, bu rakam ilerleyen dönemlerde sürekli artış göstermiştir. Türkiye'de popülasyona dayalı ilk diyabet taraması 1999–2000 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) tarafından yapılmış ve diyabetin prevalansı erişkin yaş nüfusta %7,2 ve bozulmuş glukoz toleransının prevalansı %6,7 olarak bildirilmiştir (10).

Her iki bozukluk da kadınlarda erkeklere göre, şehirde yaşayanlarda kırsal kesimlere göre anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuştur. Ocak 2010 - Haziran 2010 tarihleri arasında 15 ilden 540 merkezde tamamlanan TURDEP-II çalışmasının verilerine göre Türk erişkin toplumunda diyabet sıklığının %13,7, bunun içinde yeni tanı konan diyabetli oranının %45, tedavi gerektiren toplam diyabetli oranının %55 ve bozulmuş glukoz toleransı oranının da %7,9 olduğu bildirilmektedir (6).

1.1.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı ve Sınıflaması

1979 yılında Ulusal Diyabet Çalışma Grubu tarafından diyabetin sınıflamasına yönelik ilk konsensus kararı alınmış ve 1980 yılında WHO tarafından küçük değişikliklerle kabul edilmiştir. Temel olarak dünya çapında diyabet popülasyonunun yaklaşık %5'ini oluşturan pankreas hücrelerinin otoimmün harabiyeti sonucunda yaşam boyu insülin tedavisine gereksinim duyulan Tip 1 DM (insüline bağımlı DM) ve diyabet popülasyonunun yaklaşık %95'ini oluşturan sıklıkla insülin direnci ile tanımlanan prediyabetik durumdan aşikar diyabete ilerleyen Tip 2 DM (insülden bağımsız DM) formları bulunur. Ancak Tip 2 DM'lu hastaların bir kısmının da zamanla insüline gereksinim duyması, nadir görülen bazı diyabet tiplerinin tanımlanması ve diyabetin patogenezinin ait bilgilerin artması ile 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) yeni tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamış ve 1999 da WHO bu kriterleri küçük revizyonlarla kabul etmiştir. Daha sonra 2003 yılında, bozulmuş açlık glukozu (BAG) tanısı için ADA tarafından küçük bir revizyon yapılmıştır. WHO ve IDF tarafından 2006 yılı sonlarında yayınlanan raporda ise 1999 kriterlerinin korunması benimsenmiştir. Buna karşılık, ADA ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD) 2007 yılında yayınlanan son konsensus raporlarında ise 2003 yılındaki düzenlemenin değişmemesi gerektiğini savunmaktadır (11-13).

Son olarak 2010 yılında ADA, HbA1c'nin DM tanısında kullanılmasını önermiştir.2010 yılında yeniden düzenlenen ADA'nın diyabet tanısı için belirlediği kriterler Tablo 1' de belirtilmiştir (14).

Tablo 1. Diabetes mellitus tanı kriterleri

-
1. Diyabet semptomlarıyla beraber, günün herhangi bir saatinde ve son yenen yemekten sonra geçen zaman dikkate alınmaksızın plazma glukozunun ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) olması. (Diyabet semptomları poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybıdır) veya
 2. Açlık plazma glukozunun ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l) olması. (Açlık; kalori almaksızın geçen en az 8 en fazla 14 saat olarak tanımlanır) veya
 3. OGTT' de 2. saat plazma glukozunun ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) olması. (OGTT; WHO'nun tanımlandığı, 3 günlük yeterli karbonhidrat (150 gr/gün) alımından sonra, açlık durumunda suda çözünen 75 gr glukoz ile yapılmalıdır.) veya
 4. HbA1c değerinin $\geq 6,5$ olması (bu test DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) tahlili ile standardize edilmiş ve NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) onaylı metodu kullanan laboratuvarlarda yapılmalıdır.)
-

Yukarıdaki kriterlerden biriyle tanı konulabilir, ancak daha sonraki bir gün yine bu kriterlerden biriyle tanı doğrulanmalıdır. Herhangi bir enfeksiyon, travma, miyokard enfarktüsü ve stres gibi akut gelişen durumlarda ortaya çıkan ağır hiperglisemi, DM tanısı için yeterli kabul edilmez. Bu yüzden, akut geçici durum düzeldikten sonra, doğrulayıcı testler yapılarak kesin tanıya gidilmelidir. ADA, EASD, IDF ve Uluslararası Klinik Kimyacılar Federasyonu (IFCC) temsilcilerinin oluşturduğu Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi 2008 yılında yaptığı toplantı sonucunda, uluslararası standardizasyon kurallarına uyulması koşulu ile diyabet tanısı için HbA1c kesim noktasını %6,5 olarak belirlemiştir. Bununla beraber HbA1c'nin her merkezde rutin olarak yapılamaması, teknik sorunları ve standardizasyonundaki eksikler ve maliyeti dikkate alındığında, testin tanı amaçlı kullanımının, pek çok toplumda olduğu gibi; ülkemiz içinde şu anda uygun olmadığı düşünülmektedir (14).

Diyabet tanısı konulması için yeterli olmayan, fakat normalden yüksek kan glukoz düzeyi olan bireylerin bulunduğu bir ara grup tanımlanmıştır (15). Bozulmuş açlık glukozu (BAG) ve bozulmuş glukoz toleransı (BGT) olarak adlandırılan bu ara grup günümüzde Pre-diyabet olarak adlandırılmaktadır (Tablo 2). Bunun nedeni epidemiyolojik kanıtların bu düşük düzeydeki karbonhidrat intoleransının bile makrovasküler komplikasyonlarla birlikteliğini ve sıklıkla diyabete ilerlediğini göstermesidir (16).

Tablo 2. Bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu (15)

Açlık plazma glukoz seviyesi
< 100 mg/dl (<5,6 mmol/l) = Normal glisemi
100 - 125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) = Bozulmuş açlık glukozu (BAG)
≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) = Diabetes mellitus
75 gr. OGTT' de 2. saat plazma glukoz seviyesi
< 140 mg/dl (<7,8 mmol/l) = Normal glisemi
140-199 mg/dl (7,8-11,1 mmol/l) = Bozulmuş glukoz toleransı (BGT)
≥200 mg/dl (11,1 mmol/l) = Diabetes mellitus

1.1.3.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflaması

Diyabet, 2010 yılında ADA (American Diabetes Association)'nın belirlediği sınıflandırmaya göre, tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, diğer özel tipler ve gestasyonal

diyabet olarak 4 ana kategoriye ayrılmıştır (Tablo 3) (17). Tablo 3'te DM'un sınıflaması görülmektedir.

Tablo 3. Diyabet'in etyolojik sınıflandırılması

1. Tip 1 Diabetes Mellitus
Tip1 A (immün aracılı)
Tip1 B (idiyopatik)
2. Tip 2 Diabetes Mellitus
İnsülin resistansı (relatif insülin eksikliği)
İnsülin sekresyon bozukluğu (insulin rezistansı)
3. Diğer spesifik Tipler
Beta hücre fonksiyonunda genetik hata
İnsülin etkisinde genetik hata
Ekzokrin pankreas hastalıkları
Endokrinopatiler
İlaçlar, kimyasal maddeler
Enfeksiyonlar
Nadir görülen immün aracılı diyabet
Diğer genetik sendromlar
4. Gestasyonel Diabetes Mellitus

1.1.4. Tip 1 Diabetes mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus, insüline bağımlı (insulin-dependent diabetes mellitus-IDDm) veya juvenil diyabet olarak adlandırılır (18, 19). Tip 1 diyabet, tüm diyabetlilerin yaklaşık %7-10'unu oluşturmaktadır. Olguların çoğu, her yaşta görülebilmeye rağmen en çok 30 yaşın altında ortaya çıkar. Çocukluk çağında en sık görülen kronik hastalıklardan biridir (17).

Heterojen, penetransı düşük ve farklı cinsiyetlerde değişik klinik tablo ortaya koyan bu poligenik hastalık; insülin eksikliğine, katabolik metabolizmaya eğilime, kilo kaybına ve diyabetik ketoasidoza yol açar. Olguların çoğu immün etyolojiye sahiptir. Tip 1 Diyabet, etyolojik olarak otoimmün ve idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır. Otoimmün Tip 1 diyabet Tip 1 A ve otoimmün olmayan idiyopatik Tip 1 diyabet ise Tip1 B olarak adlandırılır (20).

Otoimmün Tip1 diyabeti (Tip1 A) diğer diyabet formlarından ayıran en önemli belirteç, anti-adacık otoantikörlerinin varlığıdır. Dolaşımdaki otoantikörlerin çoğu IgG tipindedir ve serumda yüksek oranda (%65-85) saptanır. Genetik yatkınlığı

olan bireylerde tetikleyici çevresel faktörlerin etkisi ile beta hücrelerine yönelik otoimmün harabiyet başlar ve bunu insülinitis izler. İdiyopatik Tip 1 diyabette (Tip1 B) , beta hücre immün yanıtı ve İnsan Lökosit Antijen (Human Leukocyte Antigen-HLA) birlikteliği gözlenmemektedir. Bilinen etyolojik bir sebep yoktur. Otozomal dominant kalıtım gösterir. Hastalık ketoasidoz atakları ile seyrederek. Ataklar arasında değişik derecelerde insülin eksikliği görülür (21).

Tip 1 diyabetin, çok sayıda monogenik ve poligenik formları tanımlanmıştır. Ailelerde yapılan genetik çalışmalar, ilgili genlerin tanımlanmasını sağlamıştır (22).

1.1.5. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 Diabetes Mellitus, insüline bağımlı olmayan (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) veya erişkin diyabet olarak adlandırılır (23, 24).

Tip 2 diyabet, insülin direncinin ve insülin sekresyon bozukluğunun bir arada bulunması ile ortaya çıkan bir hastalıktır (25). Çoğunlukla 30 yaş sonrası ortaya çıkar, ancak obezite artışının sonucu olarak özellikle son 10-15 yılda çocukluk veya adolesan çağlarında ortaya çıkan Tip 2 diyabet vakaları artmaya başlamıştır (15). İleri yaş, obezite, fiziksel aktivite azlığı, gestasyonel diyabet öyküsü, hipertansiyon (HT) ve hiperlipidemisi (HL) olan kişilerde daha sık görülür. Sıklıkla kuvvetli bir genetik yatkınlık görülür, ancak genetiği komplekstir (poligenik) ve tam olarak tanımlanamamıştır. Tüm diyabetli hastaların %85-90'lık kısmını oluşturur. Hastaların çoğu obezdir (25). Obezite, diyabetin açığa çıkmasına, var olan diyabetin daha da kötüleşmesine neden olur. Tip 2 diyabetin patogenezi karmaşık olup başlıca üç patofizyolojik fenomen ile karakterizedir. Bunlar;

- İnsülin duyarlılığında azalma veya insülin direnci
- Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu (insülin salgılanma defekti)
- Karaciğerde glukoz üretiminde artış (26)

Beta hücrelerinde monogenetik defektlerle ilişkili diyabet formları arasında MODY (Maturity Onset Diabetes Young) ve Mitokondriyal Diyabet yer almaktadır. MODY sıklıkla erken yaşta (genellikle 25 yaş öncesi) başlayan orta derecede hiperglisemi ile karakterizedir. İnsülin etkisinde ya hiç defekt yoktur ya da minimal defektler vardır. Bunun yanında insülin sekresyon bozukluğu da mevcuttur.

Otozomal dominant geçişli olup diğer aile bireylerinde de diyabet öyküsü vardır. Otoantikorlar negatiftir (27). Mitokondriyal Diyabette DNA nokta mutasyonları gösterilmiştir. Bu hastalarda DM yanında; sağırılık, miyopati, tiroid disfonksiyonu, hiperkalsemi ve büyüme hormonu eksikliği bulunur (26, 28). Diyabet tanısı konulduktan sonraki dönemlerde insülin direnci artışı ve beta hücre fonksiyonunda azalma progresif olarak devam etmektedir. Faz I adını alan bu dönemde, yaşam kalitesini artırıcı yöntemler ve bazı oral ilaçlar uygulanarak glisemik kontrol elde edilmeye çalışılmakta, daha sonraki faz II döneminde glisemik kontrol sağlanması çeşitli oral ilaç kombinasyonları ile mümkün olabilmektedir. Son dönemde ise insülin replasman tedavileri uygulanması gerekmektedir. Tip 2 diyabetiklerde sekonder direnç adını alan bu döneme geçişin %2-5 hasta/yıl olduğu bildirilmektedir (29).

1.1.6. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel diyabet ilk kez gebelik sırasında ortaya çıkan değişik derecelerde glukoz intoleransdır (30). Bu tanım insülin veya medikal nutrisyonel tedavi kullanılmasından ya da glukoz intoleransının doğum sonrası devam edip etmemesinden bağımsızdır (31).

Gebeliğin bitiminden 6 hafta veya daha fazla zaman geçtikten sonra hastanın yeniden değerlendirilmesi gerekir. Vakaların büyük çoğunluğunda glukoz regülasyonu doğumdan sonra normale döner. GDM, anne ve fetusun mortalite ve morbiditesini artırır ve sonraki gebeliklerde tekrarlayabilir. Bu hastaların uzun dönem takiplerinde Tip 2 DM sıklığının arttığı bildirilmiştir (32). Erken dönemde tanınıp gerekli müdahalenin yapılması GDM'a bağımlı perinatal mortalite ve morbiditeyi azaltırken, diğer taraftan maternal komplikasyonların önlenmesini sağlayabilir (33).

Gestasyonel diyabette tanı oral glukoz tolerans testine dayalıdır. Test öncesi ilk prenatal vizitte tüm gebelere risk değerlendirmesi yapılmalıdır. İleri yaş, ailede DM öyküsü, obezite, etnik köken, makrozomik bebek doğurma öyküsü, önceki gebeliklerde glukoz intoleransı gibi klinik özellikleri bakımından yüksek risk altındaki gebeler mümkün olan en kısa zamanda glukoz tolerans testi ile değerlendirilmelidir (17). Bu ilk taramada glukoz toleransı normal olan gebeler

gebeliklerinin 24-28. haftalarında yeniden değerlendirilmelidir. Ortalama risk taşıyan kadınlar gebeliğin 24-28. haftalarında test edilmelidir. Düşük risk grubuna giren gebelere glukoz yüklemesi yapılmasına gerek yoktur (34). 50 gr. glukozlu tarama testinde gebeliğin 24-28. haftalarında rasgele bir zamanda (açlık-tokluk durumuna bakılmaksızın) 50 gr. glukozlu sıvı içirildikten 1 saat sonra kan glukoz düzeyi ≥ 140 mg/dl ise normal değildir.

75 gr. glukozlu OGTT; WHO'ya bazı otörler, gebelerde de gebe olmayan erişkinler gibi 75 gr. glukozlu, 2 saatlik OGTT yapılmasını yeterli görmektedir. WHO gebelerde OGTT değerlendirmesinin tıpkı gebe olmayan yetişkinlerdeki gibi yapılmasını önermektedir (25). HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study) çalışmasının verilerine dayanılarak 2011 ADA önerilerinde gestasyonel diyabet tanı kriteri değişmiştir. Yeni tanı kriterine göre 24-28. hafta arasında her gebeye 75 gr. OGTT yapılması önerilmektedir. Testte her hangi bir değer yüksek çıkması halinde gebelik diyabeti tanısı konur, ilave olarak 100 gr. OGTT yapmaya gerek yoktur. Ancak henüz tüm ülke ve merkezlerde rutin uygulama yeri bulunmamıştır (17).

Tablo 4. ADA ve WHO'ya göre GDM tanı kriterleri (17)

	Açlık	1. st	2. st
ADA kriterleri			
75 gr. glukoz ile OGTT (en az 1 patolojik değer tanı koydurur)	≥ 92	≥ 180	≥ 153
WHO kriterleri			
75 g glukoz ile OGTT (en az 1 patolojik değer tanı koydurur)	≥ 126	-	≥ 200

75 gr. OGTT uygulama şartları: En az 8 saatlik açlığı takiben önce AKŞ için kan alınır. Sonra 75 gr. glukoz içeren sıvı 5 dakika içinde içirilir. Sıvı içimini takiben 1 ve 2 saat sonra kan glukoz değerlerine bakılır. Buradaki kan olarak ifade edilen plazmadır. Kapiller kan örneği kullanılmaz, venöz kandan ölçüm tercih edilir (17).

1.1.7. Sekonder Diyabet

Diyabetin değişik hastalıklarla birleştiği bir durumdur. Bunlara örnek olarak pankreas harabiyeti, endokrin hastalıklar (Cushing sendromu, feokromasitoma, akromegali vb.), bazı ilaç ve kimyasal maddeler (diüretikler, glukokortikoidler, oral

kontraseptifler, antineoplastik ajanlar) ve bir takım genetik hastalıklar (kistik fibrozis, glikojen depo hastalıkları) gösterilebilir (34).

1.1.8. Genetik

Genetik eski Yunanca'da "Genesis" kelimesinden kökenini almakta olup, "üremeye yahut doğuma ait" anlamına gelmektedir. Vucuttaki bütün hücrelerin çekirdeklerinde bulunan genlerin anne ve babadan çocuklara kalıtımı kontrol ettiği bilinir. Ancak aynı genlerin vucuttaki hücrelerin fonksiyonlarını her gün kontrol ettikleri unutulur. Kromozomlar DNA'dan, DNA ise gen adı verilen birimlerden oluşur. İnsanda 23 çift kromozom vardır. Kromozomlarda yer alan ve sayıları 30 bin ile 35 bin arasında olduğu tahmin edilen genlerin oluşturduğu zincir, kişinin göz renginden boyuna, yaşam süresinden yakalanacağı hastalıklara kadar pek çok şeyi programlar. 1865 yılında Gregor Mendel yaptığı bitki çalışmaları ile ilk olarak kalıtım ile ilgili biyolojik kurallar tarif etmiştir. 1944'de Oswald Theodore Avery, Colin McLeod ve Maclyn McCarty DNA'yı izole etmeyi başarmışlardır. James D. Watson ve Francis Crick 1953'de DNA'nın sarmal (helikal) kararlı yapısının olduğunu göstermişlerdir. 1977'de PCR metodunun geliştirilmesine bağlı olarak Kary Banks Mullis, 1983'de DNA izolasyonunu ve DNA parçalarının istenen bölgelerinin çoğaltılmasını başarmıştır. 1990'lı yıllarda uluslararası bir konsensüs ittifakıyla "İnsan Genom Projesi" başlatılmıştır. 1995 yılı tarihin en önemli bilimsel gelişmelerinden biri olarak kabul edilen söz konusu harita sayesinde ölümcül hastalıkları önceden teşhis ederek önleme, kişiye özel ilaç ve tedavi yöntemleri geliştirilebilme yolunda çok önemli katkılar sağlamıştır. Bugün, genetik bilimi sayesinde birçok hastalığın erken teşhisi mümkün olabilmekte, bunun yanında tedavi metodlarının geliştirilmesinde de önemli bilgiler sağlanmaktadır (35, 36).

1.1.9. DNA'nın Yapısı

Kalıtsal bilginin taşıyıcısı, DNA (Deoksiribonükleik Asit) molekülüdür. DNA'nın temel birimi, nükleotiddir. Bir nükleotidin üç bileşeni vardır; baz, şeker ve fosfat. Nükleotidlere farklılık kazandıran kısım olan baz, pürin yada pirimidin yapısındadır. DNA'nın yapısına giren pürinler adenin (A) ve guanin (G), pirimidinler de sitozin (S) ve timin'dir (T). İkinci bileşen şeker ise halka formunda 5 karbon atomlu bir pentozdur. Fosfat grubu bu pentozun 5. karbon atomuna bağlıdır. Watson-

Crick Modeli: 1953 yılında tanımlanan bu modelin üç ana unsuru vardır; 1- Çift sarmal yapı (double heliks): DNA tek bir iplik halinde değil, iki ayrı ipliğin ortak bir eksen etrafında birbirine dolanmış olduğu çift sarmal bir yapı halinde bulunur. 2- Antiparalellik: Çift sarmalları oluşturan ipliklerin serbest 3' OH ve 5' fosfat grupları dikkate alındığında birbirlerine göre ters yöne doğru uzanmaktadır. 3- Komplementerlik: Çift sarmal DNA, burkulmuş bir ip merdivenine benzetilebilir. Merdivenin basamakları komplementerlik ilkesine göre karşı karşıya gelmiş olan baz çiftlerini oluşturur. Eşleşme yalnızca adenin ile timin yada guanin ile sitozin arasında olur (37).

1.1.10. Replikasyon, Transkripsiyon ve Translasyon

Replikasyon, bir hücrenin bölünmesi sırasında DNA'nın bir kopyasının çıkarılması işlemine denir. Replikasyon, çift sarmaldaki ana ipliklerin, yavru iplik sentezinde kalıp görevi gördüğü bir işlemdir. Sentezi yürüten DNA polimeraz yavru ipliği oluştururken, komplementerlik ilkesine bağlı kalır. Transkripsiyon, çift sarmal DNA'nın kalıp alınarak RNA polimeraz enzimi varlığında RNA sentezlenmesi işlemidir. Burada da komplementerlik ilkesi geçerlidir. Translasyon ise transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin, bir protein veya polipeptit zinciri haline dönüştürülmesidir. Protein sentezinin üç komponenti mRNA, tRNA ve ribozomlardır.

1.1.11. DNA'nın Sınıflandırılması

İnsan haploid genomunda 3×10^9 baz çifti vardır. Bunun %75'i, aralarında genlerin bulunduğu tek kopyalı (tekrarlanmayan) DNA dizileridir. "İnsan Genomu Projesi"nden elde edilen yeni verilere göre 30-35 bin civarında gen olduğu gösterilmiştir. İnsan genomunun yalnızca %2'si protein kodlamaktadır. Tekrarlanan DNA dizileri ise, genomun %25'ini oluştururlar. Bunlar iki gruba ayrılırlar;

1. Yüksek düzeyde tekrarlanan diziler: Satelit DNA olarak da bilinirler ve bunlar belli kromozomal bölgelerde daha yoğun olarak bulunurlar. Kopya sayıları bireyden bireye göre farklılıklar gösterir. Minisatellit ve mikrosatellit olan diziler 10-60 ve 2-5 baz çifti uzunluğundaki bloklardan oluşmuşlardır.

2. Orta düzeyde tekrarlanan DNA dizileri: Bunlar tek kopyalı diziler arasında dağılmışlardır ve genomun %15'ini oluştururlar. "Line" ve "Sine" diye iki önemli alt

gruba ayrılırlar. “Line” dizisinin en önemli bölümü L1 ailesi olarak bilinen dizilerdir. En sık rastlanan “Sine” dizisi ise Alu ailesidir. Bazı genler, her hücre için yaşamsal önemi olan temel işlevlerden sorumludurlar. Bunlara “Housekeeping” genler denir. Bir hücrede eksprese olan genlerin yaklaşık %90’nı bu gruptadır. Belirli dokulara özgü işlevleri yürüten genlere ise, dokuya özel genler denir. Örneğin yalnızca hepatositte aktif olan albümin kodlayıcı gen gibi. Mitokondriyal DNA: Hücrede çekirdek DNA’dan başka mitokondrionlarda da DNA bulunmaktadır. Mitokondrionlar hücrenin enerji santralleri olup oksidatif fosforilasyon olarak bilinen bir dizi reaksiyon neticesinde ATP üretirler. Bu reaksiyonlarda rol alan enzimlerin bir kısmı çekirdek DNA’sı, bir kısmı da mitokondrial DNA tarafından kodlanmaktadır. Mitokondrial DNA, oksidatif fosforilasyon ve mitokondrial solunum zincirinde rol alan 13 proteine ilaveten, 2 adet rRNA ve 22 adet de tRNA kodlayan gene sahiptir. Yapısı çeşitli yönlerden çekirdek DNA’sından farklılıklar gösterir. Halkasal yapıda olması, intron içermemesi, genetik şifrenin bazı farklılıklar göstermesi gibi. Ayrıca, spermde mitokondrial DNA bulunmamasına karşılık, ovum mitokondrial DNA’dan zengindir. Bu nedenle mitokondrial DNA mutasyonlarının yol açtığı hastalıklar yalnızca anne tarafından kalıtılır (38, 39). 2. 3. ve 4. mutasyonlar insan genomundaki DNA’nın baz diziliminde oluşan her türlü değişiklik mutasyon olarak tanımlanabilir. Bu değişiklik yalnızca tek bir bazın değişikliğe uğraması (substitüsyon) şeklinde olabileceği gibi bir kromozomun tamamını ilgilendirecek kadar büyük de olabilir. Mutasyonlar; gen düzeyinde mutasyonlar, yapısal kromozom anomalileri ve sayısal genomik mutasyonlar olmak üzere üç büyük grupta toplanabilir (40).

1.1.11.1. Gen Düzeyinde Mutasyonlar

Tek veya birkaç bazlık delesyon ve insersiyonlar bu grup içerisinde değerlendirilen substitüsyonlardır.

a. Nükleotid Substitüsyonları: İnsan genomundaki en sık mutasyonlar, bir nükleotidin başka bir nükleotid ile yer değiştirdiği substitüsyonlardır. Nokta mutasyonları olarak da bilinirler. Nükleotid değişiklikleri hem protein kodlayan bölgede ve hem de kodlamayan bölgelerde olabilir (intron, ekzon bölgeleri). Bu nedenle nükleotid değişimleri ile olan mutasyonların üç sonucu olabilir:

1. Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar: Aminoasit değişimine yol açarlar. Örneğin orak hücreli anemide, β globin zincirinin 6. aminoasidi olan glutamini kodlayan GAG kodonunda adenin yerini timidin almıştır (GAG→GTG). Oluşan yeni kodon (GTG) glutamini değil valini kodlamaktadır. Dolayısıyla hastalıktan ve belirti bulgularından bu tek baz değişikliği sorumludur.

2. Anlamsız (nonsense) mutasyonlar: Bu tür mutasyonlar erkenden durdurucu kodon oluşmasına yol açarlar. Bundan dolayı sentezlenen protein normalden kısa olur ve proteinin yapısal değişikliği fonksiyonel bozukluğa neden olursa buna bağlı olarak hastalıklar oluşur.

3. Sessiz (silent) mutasyonlar: Genetik kodun önemli bir özelliği, bir amino aside karşılık gelen birden fazla kodon olmasıdır. Bu nedenle bir baz değişikliği neticesinde oluşan yeni kodon aynı aminoasidi kodlamaya devam edebilir. Örneğin hem CGU hem de CGC kodonları arginini kodlamaktadır; dolayısıyla CGU→CGC mutasyonu kodlanan proteinin aminoasit dizilimini değiştirmez. Ancak bu sessiz mutasyonlar, çevresel faktörler ile etkileştiği (radyasyon, oksidatif stres vb.) zaman, kodlanan aminoasitlerin hangi yönde, nasıl bir değişim gösterdikleri henüz tam olarak bilinmemektedir (40).

b. Delesyonlar, İnsersiyonlar: Delesyonlar 5 nükleotidden daha az baz kayıpları olarak bilinir. Kodlanan aminoasit yapısını kısmen değiştirirler. Her delesyonda değişiklik olmaz. İnsersiyonlar ise 20 ya da daha az sayıda nükleotidin araya girmesi ile olan mutasyonlardır, daha nadir görülürler ve aminoasit yapısını dramatik olarak değiştirirler.

c. Trinükleotid tekrar dizilerinin uzaması: Bunlar dinamik mutasyonlar olarakta adlandırılırlar. Hastalıktan sorumlu gende, normalde de bulunan ve tekrar sayısı kişiden kişiye değişebilen (yani polimorfik) üçlü tekrar dizileri (CAGCAGCAG.....CAG ya da CGGCGGCGG.....CGG gibi) mevcuttur. Bu diziler bir sonraki kuşağa aktarılırken kayma ve hatalı eşleşme nedeniyle sayıları artarsa (ekspansiyon) ve tekrar sayısı kritik bir düzeyi geçerse hastalık tablosu oluşur. Yapısal kromozom anomalileri: Bu mutasyonlar kromozomal yeni düzenlemeler olarak da bilinir. Kromozomlar arası karşılıklı parça değişimleri (translokasyon) ve büyük parça kayıpları (kromozomal delesyonlar) sonucu oluşurlar. Sayısal genomik mutasyonlar: Kromozomdaki sayısal değişim yapan

mutasyonlara denir (anöploidi, diploidi gibi). Down sendromu (trisomi 21), Turner sendromu gibi durumlar bu tip mutasyonlar ile oluşur.

1.1.11.2. Gen Polimorfizmleri

Gen polimorfizmleri, genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Hücre metabolizması için önemli olan yolaklarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu polimorfizmlerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır (41).

Deoksiribo nükleik asit polimorfizmlerinin yaklaşık %90'ı tek nokta değişimleri (SNP) şeklinde gerçekleşmektedir (36). Bu SNP'lerden bazıları bir restriksiyon endonükleazının kesim bölgesinde meydana gelerek kesimin olmamasına ya da daha önce olmayan bir kesim bölgesinin oluşmasına neden olur. Bu tür polimorfizmlere restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmleri (RFLP) adı verilir (42).

1.2.Sirtuin 1

1.2.1. Sirtuin 1'in DNA tamirindeki rolü

Sirtuinlerin genomik bütünlüğü sağlamadaki rolleri yakın zamanda model organizmalarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Maya Sir2'nin ribozomal DNA rekombinasyonunu inhibe etmesinin yanında DNA kırıklarının olduğu bölgelerde relokalizasyonu sağladığı görülmüştür (43).

Memeli sirtuin 1'in genomik stabiliteyi etkilediği görülmüştür. SIRT 1 DNA hasarının tamirinde görev yapan Werner helikaz ve NBS1 dahil olmak üzere değişik faktörleri deasetile eder(44).

Sirt1^{-/-} embriyolarda artan kromozal aberasyonlar ve DNA tamirindeki yetersizlik SIRT1'in genomik bütünlükteki rolünü doğrulamıştır (45)

Oksidatif stres sonrası SIRT1'in oluşan DNA kırıklarını düzelttiği gözlenmiştir. Bununla birlikte benzer düzeltici etki genomik instabilite de önemlidir. Bu yanıt daha önce genlerin deprese olması ile birliktedir (46).

Gözlemler maya Sir2 ve SIRT1'in epigenetik baskılanma, kromatin modifikasyonunu düzenlediği göstermiştir. Bunu modifiye edici enzimleri örneğin metiltransferaz SUV39H1 gibi enzimleri regüle ederek yapar (47).

1.2.2. Sirtuin 1 ve hücre ölümü

Memeli sirtuinleri hücrenin strese karşı direncinde ve hücre ölümü için oluşturulan eşik modülasyonunda önemli role sahiptir. Strese karşı bu direnç kısmen Forkhead box class O (FOXO) gibi bir transkripsiyon faktörü ile etkileşime girilmesiyle olmaktadır. Bu memeli transkripsiyon faktörleri hem enerji durumunu hem de stres direncini regüle etmektedir. Bu iki özelliği de sonuçta yaşam süresini etkilemektedir. SIRT 1 FOXO3a'ya bağlanabilmekte ve deasetile edebilmektedir. Bu da selektif olarak FOXO'nun etkileştiği stres direnç genlerinin etkisini artırmaktadır (48). Bir çalışmada SIRT 1'in strese karşı hücreyi ısı şok yanıtla koruduğu rapor edilmiştir. (49). SIRT 1 ve p53 arasındaki etkileşim ile dışarıdan gelen strese karşı hücre için ölüm eşiği modüle edilmektedir (50). Aslında FOXO proteinleri ve p53 stres durumlarında direkt birbirleri ile etkileşmektedirler (51) ve p53 SIRT 1 proteinlerinin ekspresyonunu p53 bağımlı mikroRNA vasıtası dahil olmak üzere farklı şekillerde regüle etmektedir (52). P53 dışında SIRT 1 Ku70, E2F1 ve TGF- β sinyal yolağı gibi hücre ölümü ilişkili diğer hedefleri de regüle etmektedir (53). SIRT 1 NF-KB kompleksinin komponentlerini deasetile ederek apoptozise neden olmaktadır (54).

Sirtuinler ve yaşlanma arasında kurulan bu ilişki bu proteinlerin hücre yaşlanması ve kök hücre fonksiyonları arasındaki aracı rolü üzerinde araştırmacıların ilgisinin yoğunlaşmasına neden olmuştur. SIRT 1 ekspresyonunu fare embriyonik fibroblast hücrelerinde zorunlu onkojen ekspresyonunu antagonize ederek yaşlanmayı antagonize etmiştir (55).

Sirtuinlerin yaşlanmayı engelleyici bu memnun edici etkileri yanında *Sirt1*^{-/-} fare embriyonik fibroblastlarda yapılan bir çalışmada zıt sonuçlar elde edilmiştir (56). Sirtuinlerin farklılaşma üzerindeki etkisine bakarsak sirtuinlerin adipogenezini

PPAR- γ (peroxizome proliferatif activated receptor γ) modüle ederek inhibe ettiği ve kas ile nöral farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir (57, 58). Yakın zamanda fare embriyonik kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada SIRT 1'in reaktif oksijen bileşiklerinin hemostazında ve farklılaşmadaki rolünü göstermiştir (59).

1.2.3. Sirtuin 1'in metabolik regülasyonundaki rolü

Memelilerde kan glikoz konsantrasyonu farklı fizyolojik durumlarda dar bir aralıkta tutulmaya çalışılır. Açlık durumunda serum glikozunun belirtilen düzeyi hepatic glikoneogenez ile sağlanmaktadır. Sürdürülen çalışmalar sirtuinlerin bu fizyolojik adaptasyonda rol aldığını göstermektedir. Peroxizome proliferator – activated receptor gama-coactivator-1 α (PGC-1 α) SIRT 1 bağımlı deasetilasyon için bir hedef gözükmektedir (60).

Bu koaktivatör karaciğerde glukoneogenezin düzenlenmesi ile yağ asidi oksidasyonunda esas rolü oynamaktadır. PGC-1 α bu iki yol üzerindeki modüle edici rolü için sirtuinlere gereksinim duymaktadır (61).

Kısa süreli (<6 saat) ve uzun süreli (>18 saat) açlık durumlarında protein asetilasyonu ve sirtuin deasetilasyonun karaciğerin oluşturduğu yanıtın düzenlenmesindeki farklı rolleri incelenmiştir (62).

Hepatic glikoneogenez üzerindeki etkileri yanında sirtuinler kan glikozunu pankreatik insülin salınımını düzenleyerek de modüle etmektedirler. Fare β hücresine aktarılan SIRT1 overeksprese genin glikozun stimüle ettiği insülin sekresyonunu artırdığı ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında glikoz toleransını ilerlettiği görülmüştür (63). Buna karşın *Sirt1*^{-/-} farelerde glikozun stimüle ettiği insülin sekresyonu bozulmuştur (64).

Sirtuinlerin glikoz hemostazının düzenlenmesinden ziyade metabolizma üzerinde daha geniş bir rolü vardır. Daha önce belirtildiği gibi SIRT 1 PPAR- γ ve PGC-1 α üzerindeki düzenleyici etkileri ile yağ mobilizasyonu ve oksidasyonu üzerinde önemli rol oynar (55, 65).

Peroxisome proliferator activated receptor gama coactivator 1 α aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkileri sirtuinlerin yeni mitokondri sentezi üzerinde rolleri olduğunu düşündürmektedir. PGC- α mitokondri biyogenezinde anahtar role sahiptir.

Bu gözlemler yakın zamanda SIRT 1 ile otofaji arasındaki bağlantılar ile birleştirilmiştir (66).

Sirtuinler PGC- α üzerinden hücrelerdeki mitokondri sentez ve yıkımı arasında bir denge kurmaktadır. Sirtuinlerin metabolik düzenleme üzerindeki etkileri üzerine olan çalışmalar karaciğer, pankreas gibi anahtar organlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Gönüllü olarak kalori kısıtlaması yapılan kişiler üzerinde yapılan çalışmalar SIRT 1'in kas ve mononükleer hücrelerde de arttığını göstermiştir (67, 68).

Sirtuin1 ile sirkadiyen ritm arasındaki ilişki sirtuinlerin metabolik düzenlemede ne kadar etkili olduğunu gösteren ilgi çekici bir etkidir (69).

1.2.4. Sirtuin 1 ve ilişkili hastalıklar

Sirtuinler ile glikoz hemostazı ve insülin sekresyonu arasında ilişkiyi gösteren bilgiler bu proteinlerin insülin direnci ve diabet oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada transgenik SIRT 1 overekpresyon yapılan ve yağlı diyet alan hayvanlarda glikoz toleransını artırdığı gösterilmiştir (70, 71).

Bu iki çalışmada SIRT 1 miktarında ılımlı artışın bazal enerji hemostazı üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonu insülin direncini indüklediği görülmüştür (72).

Bu bilgi bize sirtuinin aktivitesindeki manipulasyonlarla metabolik bozuklukların önlenmesinde kullanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde insanlarda SIRT 1'deki farklı genetik varyasyonlarla enerji tüketimi ve obezite arasında ilişki tespit edilmiştir (73). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda sirtuin aktivatörü resveratrolün diete bağlı obezite ve glikoz intoleransına karşı koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (74). Resveratrol aynı zamanda AMPK'yı aktive etmektedir. AMPK sirtuin aktivitesi ile yakından ilişkilidir (75).

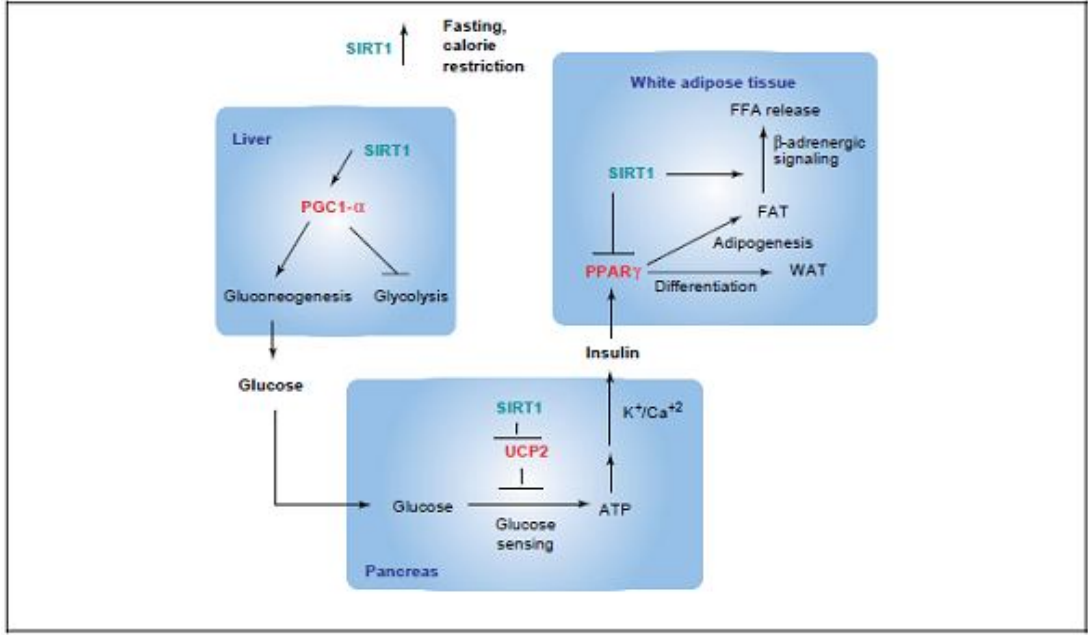
Sirtuinler ile metabolik hastalıklar arasındaki ilişki yoğun biçimde çalışılmıştır. Benzer ilişki sirtuinler ile yaş ilişkili hastalıklar arasında da bulunmuştur. SIRT1'in p53'ü aktive edebilme yeteneği sirtuinleri tumörögenizde

potansiyel etkenler içerisine sokmaktadır. Bu bağlamda yapılan tartışmalarda SIRT1'in kanser riskini hem artırabileceği hem de azaltabileceği yönündedir (76).

Sirtuinler vasküler biyolojide de etkin rol alıyor ve yaş bağımlı aterosklerozisi regüle ediyor gözükmektedir. Lipid ve kolesterol metabolizmasını regüle ederek, tersine kolesterol transportunu sağlayan nükleer reseptör LXR aktivitesini modüle ederek yapabilmektedir (77). Endotel hücresinde oluşan sirtuin delesyonunda iskemik sonuca yanıt olarak anjiogenik yanıtın bozulduğu gösterilmiştir (78).

Sirtuin1 ayrıca vasküler tonusunun ayarlanmasında anahtar rol oynayan endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) deasetile etmekte ve enzim aktivitesini regüle etmektedir (79). Sirtuinlerin nörolojik hastalıklardaki rolleri yakın zamanda ortaya çıkarılmıştır. İlk raporlar SIRT1'i nöron dejenerasyonu için iyi bir model olarak sunmuş (80) bununla birlikte takip eden çalışmalarda bu modellerde gözlenen nörolojik patolojilerin sirtuinden bağımsız yollarla olabileceğini düşündürmüştür (81). SIRT1 genelde oksidatif strese karşı koruyucu olarak bilinmektedir. Hem invitro hem de invivo çalışmalardan elde edilen kanıtlar bunun beyin için bu şekilde olmadığını yönündedir (82).

Sirtuin farklı dokularda insülin sinyal yollarının düzenlenmesini sağlar. Şekilde karaciğer, pankreas ve yağ dokusunda SIRT1 ile yolların düzenlenmesi gösterilmektedir. Her doku mavi bir kutu ile temsil edilmektedir. Karaciğerde (sol üst), SIRT1, PGC1-a'yı deasetilleyerek artmış glukoneogenez ve azalmış glikolize yol açmıştır. Pankreasta ise (alt orta), SIRT1 UCP2'nin hücre içi sentezini bastırmıştır. UCP2 böylece, mitokondrial solunumu önleyerek glikozdan ATP sentezini önlemektedir. Azaltılmış UCP2 proteini aracılığıyla SIRT1 glikozdan ATP sentezini baskılayıp insülin salgılanmasının iyileştirilmesini geliştirir. WAT (üstte sağda) ise, SIRT1; PPARgama'nın transkripsiyonel aktivitesini bastırarak sonuç olarak azaltılmış yağ sentezi ve azaltılmış yağ hücre farklılaşmasına neden olur. SIRT1 ayrıca yağ hücrelerinden FFA (serbest yağ asidi) salınımını artırır. Kutuların arasında gösterilen glikoz ve insülin, bu faktörleri sistemik dolaşıma yansıtmaktadır. Glikoz ve insülinin doku etkileşimleri SIRT1'in tespit edilen spesifik etkileriyle sınırlıdır (83).



Şekil 1. SIRT1'in farklı dokularda insülin sinyal yollarını düzenlemesi

1.3. Neurogenin 3 (Ngn 3)'ün Adacık Hücre Differansiyasyonundaki Rolü

Pankreatik adacık hücre diferansiyasyonu ve rejenerasyonu için temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü neurogenin 3 kritik role sahiptir. Endokrin hücre gelişiminin primer ve sekonder ayrışması esnasında ortaya çıkan Ngn3 başarılı dalgaları glukagon, insülin, pankreatik polipeptit ve somatostatin eksprese eden alfa, beta, pankreatik polipeptit ve gama hücrelerin belirmesini sağlar. Ngn3'ün endokrin pankreas gelişimindeki düzenleyici rolü beta hücre kitlesini ve fonksiyonlarını arttırarak Ngn3 ekspresyonunu genişleten terapötik yaklaşımlar için önemli olabilir (84).

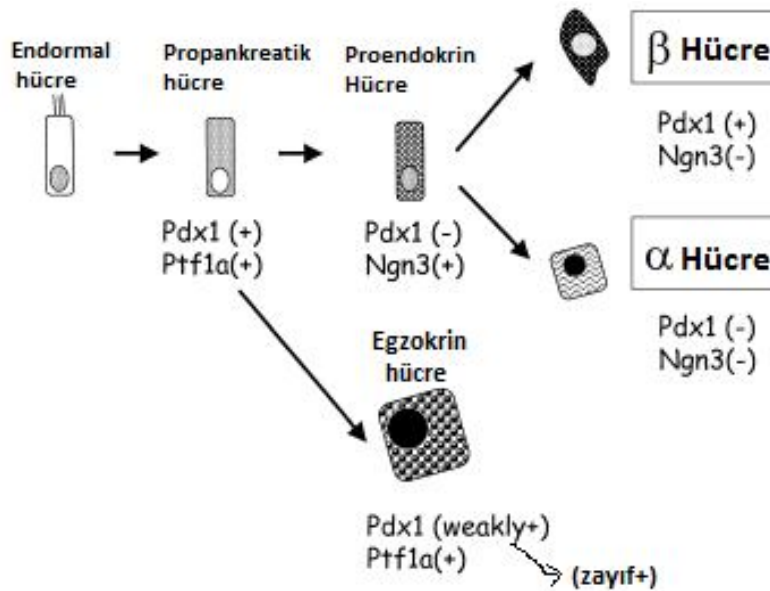
Dünya genelinde diyabet prevalansı hızlı bir şekilde artmaktadır ve ülkelerdeki en yaygın epidemik hastalıklardan biri haline gelmektedir. İnsülin sekresyon ve sensitivitesini arttıran birçok farmasötik müdahalelere rağmen, pankreasın Langerhans adacıklarında insülin üreten hücre kitlesinin potansiyelinin öğrenilmesi konusunda alınacak çok yol var. Pankreas ve adacık hücrelerinin hasara cevap olarak rejenerasyon potansiyelinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca böyle bir rejenerasyonun nasıl olduğu kesin değildir. Son zamanlardaki bazı çalışmalar bu bulmacaya ve erişkin pankreas hücrelerindeki stem cell ve stem cell benzeri hücre bulunmasına yeni bakış açıları katmışlardır. Bu çalışmalar pankreastaki selüler

rejenerasyonun embriyogenez sırasında pankreas gelişimindeki yolları reaktifte ediyor olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmalar proendokrin rejenerasyon olan pankreastaki transkripsiyon faktörü Neurogenin-3 varlığını ve adacıklardaki yeni endokrin hücre farklılaşmasındaki önemi çevresinde odaklanmıştır. Bu çerçevede neurogenin-3'ün gelişen ve rejenerasyon olan pankreastaki konumu endokrin kitle artışı için muhtemel Ngn-3 temelli tedavileri tartışma konusu haline getirmiştir (84).

1.3.1. Neurogenin3'ün Endokrin Pankreas Farklılaşması Esnasındaki Önemi

Neurogenin-3 kendi DNA-bağlayıcı alanı gibi bir temel-sarmal-döngü-sarmal alanı (bHLH) içeren transkripsiyon bir faktördür. bHLH proteininin pankreatik hücre işlevinde bulunması ilk önce insulin promotör analizi ile gösterilirdi (85, 86). Pdx1-bağlayıcı alana bitişik olan korunmuş CANNTG uyumları farklı organizmaların insulin promotörlerinde bulunur (87). Bu uyum E-box olarak adlandırılır ve temel insulin promotör aktivitesi için önemlidir. Genel olarak, hücre özellikli bHLH proteinleri (B sınıfı) hazır bir şekilde ifade edilen E47 ve E12 (A sınıfı) gibi bHLH transkripsiyon faktörleri olan dimerleri oluşturur, E-box uyumuna bağlarlar ve hücre özellikli gen ekspresyonunda bulunurlar.



Şekil 2. Gelişen pankreasta endokrin farklılaşması işlemi.

Her bir basamak için farklılaşmanın durumu ve anahtar transkripsiyon faktörlerinin ifadesi arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Olgun (matür) β hücrelerinde, NeuroD1 çoğunlukla ifade edilen β transkripsiyon faktörü ve insulin transkripsiyonun temel regülatörlerinden biri gibi görünür (88). Pankreasta, NeuroD1 tüm endokrin hücreleri ile ifade edilir, fakat yalnızca postmitotik gelişim aşamasında da ifade edilir (89). NeuroD1'in hedeflenmiş endokrin hücre sayılarında bir düşüşe neden olur, fakat bu endokrin hücrelerinin farklılaşmasına engel olmadan apoptozis artışına neden olur (90). İnsulin gen ekspresyonunun ötesinde, NeuroD1 aynı zamanda hücrenin endokrin pankreas farklılaşma sürecinde bulunan genlerin ekspresyonunu düzenlemiş gibi görünür. NeuroD1 aynı zamanda gelişimsel nöronda ifade edilir ve nörojenezde önemli bir rol oynar (91, 92). Mayojenez ve nörojenezde, farklı bHLH proteinleri farklı alt nesilleri belirlemenin yanı sıra verilen bir hücrenin neslinin gelişimindeki ardışık aşamaları kontrol ederler. Farklı organizmalarda, NeuroD alt ailesinden ayrılabilen bir nörojenin bir alt aile olan Drozofilia atonal homolog pronöronal hücrelerle ifade edilir (93). Nörojen alt ailesi nöronların kaderini belirler ve nöronların son farklılaşmasını düzenleyen NeuroD'i harekete geçirir (94). Nörojenezde benzer olan nörojenin alt ailesi pankreas gelişimi esnasında endokrin hücre farklılaşmasını kontrol eder (94).

Neurogenin3 dejenerat RT-PCR metodu ile türetilmiş Monc-1 hücrelerinden olan RNA'yı kullanarak bulunmuştur. Aynı aileye ait olan Ngn 1 ve 2'den farklı olarak, Ngn 3 nöral hücrelere ilaveten gelişen pankreas ile ifade edilir (95). Pankreatik gelişimde Ngn3'ün önemi Ngn3 geni eksik farelerin çalışmaları ile gösterilmiştir. Ngn3 ekspresyonu pankreatik hormon gösteren hücrelerde gözlenmemiştir ve bu fareler apoptotik olaylarda bir artış göstermeden herhangi bir pankreatik endokrin hücreleri üretmeyi başaramamıştır (96). Böylece endokrin hücrelerinin eksikliği yanlış kodlanmadan dolayı olup Ngn3 endokrin hücrelerine doğru farklılaşma için gereklidir. Üstelik bu fareler NeuroD1, Pax4 (97) ve Pax6 (98, 99) dahil endokrin pankreatik gelişimin sonraki aşamalarında işlev gören birkaç transkripsiyon faktörlerini göstermezler. Bu transkripsiyon faktörleri Ngn3'ün ya doğrudan ya da dolaylı hedefleri gibi görünür. Bu incelemelere göre, gelişen pankreaslarda Ngn3 gösteren hücreler, Ngn3 kaybolmasından sonra α , β , δ ya da pankreatik polipeptid hücrelerine doğru farklılaşmaya başlayan endokrin prekürsör

hücreleri olarak düşünülür. Bu konsept hücre izleme deneyleri ile de desteklenir (100).

Neurogenin3 yalnızca endokrin hücrelerinin farklılaşması için gerekli bir faktör değildir. Pankreasta herhangi bir hücreyle farklılaşma yeteneği olan Ngn3'ün multipotent pankreatik hücrelerinde aşırı olması glukagon-üreten hücrelerin farklılaşmasına neden olur (101, 102). Bu eylem NeuroD1 ile paylaşılmış görünür ve benzer bir sonuç endodermden Ngn3'ün geçici ekspresyonuyla elde edilmiştir. Böylece, Ngn3-NeuroD1 eksenini endokrin hücrelerinin farklılaşmasını kontrol etmek için yeterli gibi görünür (103).

Endokrin hücre farklılaşmasının kontrolünde Ngn3'ün önemi aynı zamanda endodermden türetilen mide ve bağırsakta görülebilir. Gastrointestinal epitelyal hücrelerinin tüm çeşitleri kriptaların temelinde bulunan kök hücrelerden türetilir. Kriptlerden villinin uçlarına doğru göç ederken kök hücreler gastrointestinal epitelyal hücrenin her bir çeşidiyle farklılaşır. İntestinal enteroendokrin hücrelerin en az 15 farklı hücre çeşitlerinde olduğu bilinir. Ngn3 gen eksikliği bulunan fare araştırmalarına göre, enteroendokrin hücreleri Ngn3-gösteren öncül hücrelerinden türemiştir. İntestinal enteroendokrin hücreleri Ngn3 olmadan farklılaşmazlar. Aksine Ngn3'ün olmayışı gastrik enteroendokrin hücrelerinin farklılaşmasını bozmaz. Bu sonuçlar endokrin hücre farklılaşmasının kontrolü için Ngn3 ekspresyonunun öneminin, her dokuda transkripsiyon faktörlerinin konumuna bağlı olduğunu göstermiştir (104, 105).

1.3.2. Neurogenin3 Geni Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Neurogenin3, pankreatik prekürsör hücrelerinden pankreatik proendokrin hücrelerine kadar farklılaşmayı artırır. Pankreatik tomurcuk içinde dağılmış hücreler endokrin hücre olmak için nasıl seçilirler? Nörojenezde pronöral bHLH genlerinin ekspresyonu anti-nöral bHLH genleri olarak tanımlanan saçlı ve split (HES) tipi proteinlerin arttırıcıları ile düzenlenirler (106-108). HES1-eksikliği olan fareleri kullanan çalışmalar göstermiştir ki HES1'in pankreatik gelişimde bir rolü vardır. Bu fareler glukagon-üreten hücrelerin hızlandırılmış farklılaşmasıyla neden olunan aşırı pankreatik hipoplazi göstermiştir (109). HES1 eksikliği olan farelerin pankreatik fenotipi, pankreatik tomurcularda bulunan Ngn3 aşırı ekspresyonu ile benzerdir. Bu

sonuçlar HES1'in Ngn3 ekspresyonunu sınırladığını ve böylece pankreasta farklılaşmamış bir durumda hücreleri düzenlediğini göstermiştir. Ngn3 geni promoter analizi aynı zamanda bu incelemeyi desteklemektedir. Bu promoter (aktifleştirici) TATA kutu uyumuna bitişik olan en az üç HES1-bağlayıcı alanlar içerir ki bu elektoforetik değişimi analiz ile doğrulanmıştır ve HES1 ekspresyonu HES1-bağlayıcı alanlar içeren uyuma bağlı bir tarzda olan Ngn3 geni promoter aktivitesini güçlü bir şekilde sınırlar (110). Pankreastaki rolünün ötesinde HES1-Ngn3 ekseninin önemi safra kesesinde hücre yapısının belirlenmesi için gösterilmiştir. Bu, ventral pankreatik tomurcuğun olduğu alana yakın ön mideden yükselir. Hes1-eksiğı olan farelerde biliyer epitelyal hücreler ektopik Ngn3 gösterir ve pankreatik endokrin ve ekzokrin hücreleriyle farklılaşırlar. Bu sonuçlar Hes1 ekspresyonunun muhtemelen Ngn3 ekspresyonunu bastırarak biliyer epitelyuma doğru hücreleri hedeflemede kilit rol oynar (111).

Nörojenez esnasında 'lateral inhibisyon' olarak adlandırılan bir hücre-hücre sinyalleşme yolu farklılaşmanın durumunu kontrol eder. Farklılaşmaya başlayan hücreler komşularının nöral farklılaşma yoluna girmelerini engellerler. Yalnızca nöron oluşturmaya yeterli hücelere nöral farklılaşmaya giden yoldan ilerlemeye izin verilir (112).

Bu işlemdeki kilit moleküller bir hücre yüzeyi reseptörü olan Notch ve onun iki membran bağlı ligandları olan Delta ve Serrate'dir. Delta ve Serrate ligandları Notch'a bağlanır ve böylece bir sinyalleşme yolu açar. Notch'un (Notch ICD) hücre içi alanı, transkripsiyonel aktivasyon alanı olmayan bir DNA-bağlayıcı proteini olan RBP-Jx ile etkileşime başlar ve sonra çekirdeğe doğru yer değiştirir. Notch ICD'in bir transaktivasyon alanı var gibi görünür ve bu yüzden Notch ICD/RBP-Jk kompleksi Hes1 promoterini bağlar ve aktive eder. Notch sinyalini kabul eden hücreler farklılaşmayan bir durumda kalırlar. Benzer bir mekanizma pankreas gelişimi esnasında endokrin hücre kaderini yönlendirir. Delta-türü gen 1 (Dll 1) veya hücre içi medyatör RBP-Jk eksikliği olan fareler pankreatik endokrin hücrelerin hızlandırılmış farklılaşmasını göstermiştir (102). Diğer bir yandan Notch1 ICD aşırı ekspresyonu olan fareler hem endokrin hem de ekzokrin hücrelerin inhibite edilmiş farklılaşmasını gösterir (113). Bu sonuçlar Dll1-Notch1-Hes1 sinyali transdüksiyon yolunun pankreatik gelişme esnasında farklılaşmayan durumun bakımında önemli olduğunu

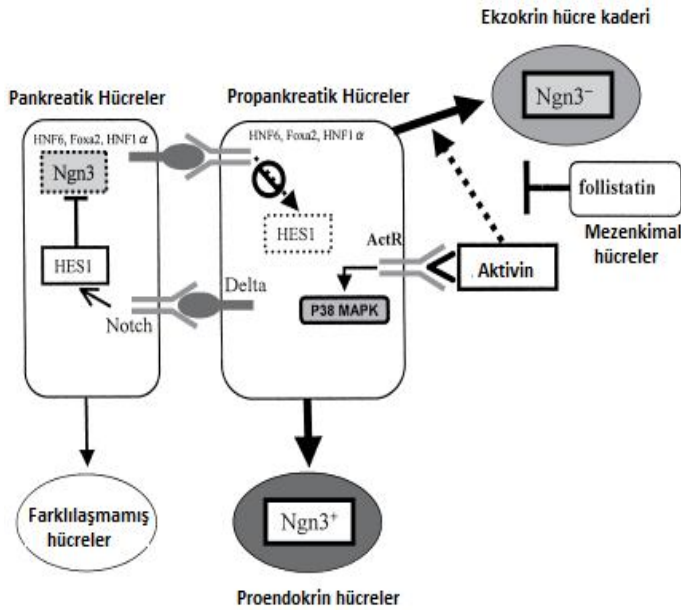
göstermiştir ve bu sinyallerden kaçan hücreler Ngn3 göstermeye başlarlar ve sonra endokrin hücreleri olurlar (114).

Bitişik hücrelerden gelen sinyallere ilaveten komşu dokulardan gelen sinyaller de pankreatik gelişimin her sürecinde önemlidir. İlk farklılaşma sürecindeki rolleri, sözde ‘‘başlatma işlemi’’ tanımı yoğun şekilde Kim ve Hebrok (115) tarafından incelendi ve görüşüldü. Ayrıca pankreatik tomurcukların oluşumundan sonra merkezi epitelial hücrelerini sarmalayan mezenkimal doku ekzokrin pankreas oluşumunda induktif bir etki ve endokrin pankreas gelişiminde ise bastırıcı bir etkiye sahiptir (116). Follistatin TGF-B ailesinin üyelerinin eylemlerini kısıktır ve pankreasta hücrelerin farklılaşmasında mezenkimin etkilerini taklit ettikten sonra mezenkim ile üretilir (117, 118). Bu sonuçlar göstermiştir ki, TGF-B ailesi üyeleri pankreatik endokrin hücrelerinin düzgün farklılaşması için gereklidir. Aday moleküllerden biri aktivindir. Transmembran sinyalleşme için aktivin, aktivin reseptör tip 1 (ActRI) ve tip II (ActRII) (119) olan serin/treonin kinaz alanı bulunduran iki tür reseptör gerektirir. Aktivin doğrudan ActRII’ye bağlanır ve bu kompleks sonra ActII (120) kinaz aktivitesi ile ActRI’nin fosforilasyonu ile sonuçlanarak ActRI ile bağdaşır. ActRIIB geni bozulmuş, heterozigot fareler (ActRIIA+/-IIB+/-) aksiyal kusur göstermeden hipoplastik pankreatik adacıklar geliştirirler (121). Transgenik farelerde dominant-negatif tip II aktivin reseptörün pankreatik ekspresyonu adacık hipoplazi ile de sonuçlanır (122, 123).

Sıçan pankreas hücresi (AR24J) orijinal olarak kimyasal endüklenmiş bir pankreatik tümörden türemiştir ve hem ekzokrin hem de nöroendokrin özelliklerine sahiptir. Aktivin A tedavisinde AR42J hücrelerin büyümesini durdurur ve aksonları büyütür. Aktivin A artı betaselulin veya hepatosit büyüme faktörünün varlığında (HGF), bu hücreler insulin-gösteren hücrelerle farklılaşırlar (124, 125). Böylece, AR42J hücreleri β hücresi farklılaşmasının moleküler mekanizmalarını incelemek için bir model sağlar. Bu hücre hattında aktivin A ve HGF Ngn3 ekspresyonunu kısıktırabilir ve kendi öncüsünü aktive edebilir (117). Ngn3 promoterin A 5’ delesyonu Ngn3’ün -402 bp ve -326 bp arasındaki bölgeyi aktivin A- ve HGF-responsif DNA uyumu olarak tanımlamıştır. Bu bölge AR42J hücrelerinde bir represör gibi işlev görür ki aktivin A ve HGF böyle baskıyı kısıktırır (117).

Transforming growth faktör beta ailesi reseptörler yoluyla sinyalleşme ilişkili faktör Smad4'e bağlanan Smad2 veya Smad3 gibi reseptör etkinleşmiş Smadların fosforilasyonuna yol açar ve çekirdekle yer değiştirir. Çekirdeğin içine girdiğinde, bu Smad kompleksi hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşirler (120). Diğer yandan, Ngn3'ün aktivin-responsif aktivasyonu Smad-ilişkili yol ile ilişkili değildir. Yerine, TGF- β etkinleştirilmiş kinaz 1- mitojen-etkinleştirilmiş protein kinaz, kinaz 3 (MKK3)- p38 mitojen-etkinleştirilmiş protein kinaz (p38MAPK) yolu Ngn3 promoterin kritik bir bölgesinin fonksiyonunu düzenler, muhtemelen -402 bp ve -326 bp arasındaki transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyerek düzenler (126).

Komşu hücreler ve dokulardan gelen sinyaller proendokrin hücrelerde Ngn3'ün ekspresyonunu başlatacak kadar yeterli değildir, çünkü Notch ve ActR-responsif elementler içeren bölgeden daha uzun bir promoter uyumu pankreastaki proendokrin hücreleri ile kendi ekspresyonunu yönlendirmek için gereklidir (110). HNF6 (57, 127), HNF1 ve Fox A (39, 110) ailelerinin endodermal transkripsiyonal aktivatörleri bu Ngn3 promotere bağlanırlar ve Ngn3 ekspresyonunda önemli bir rol oynayabilir (Şekil 2). En azından HNF6'nın durumunda, Ngn3 genini düzenlemedeki önemi HNF6 geni-bozuk fareler kullanan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki Ngn3 ekspresyonu bu farelerde ciddi bir şekilde hasar görmüştür ve yalnızca birkaç olgun endokrin hücre gözlenmiştir (127).



Şekil 3. Proendokrin hücrelerinin farklılaşmasının önerilen modeli.

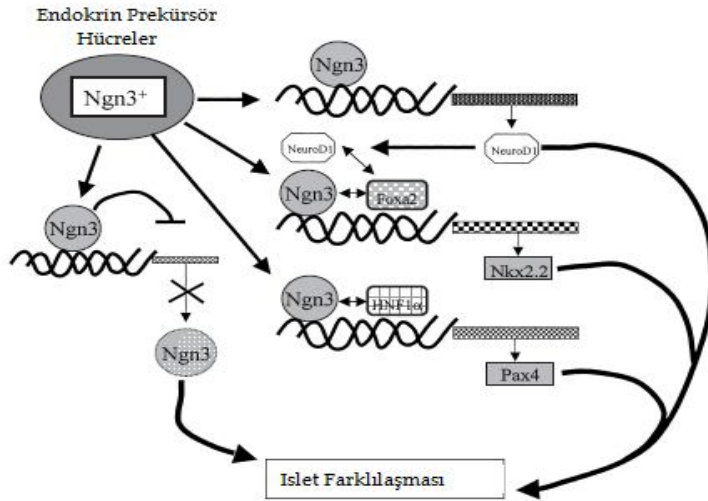
Neurogenin 3 komşu hücrelerden (epitelyal-mezenkimal hücre etkileşimleri) gelen sinyaller ile düzenlenir. İç endodermal transkripsiyon faktörleri ayrıca gereklidir (Şekil 3).

1.3.4. Gen ekspresyonunun Ngn3 ile düzenlenmesi

Neurogenin 3 bir transkripsiyon faktörüdür ve işlevini daha iyi anlamak için doğrudan düzenlediği faktörleri tanımlamak gerekir. NeuroD1 aday faktörlerden biridir, çünkü nörojenin ailesinin nörojenez boyunca NeuroD1 ailesinin proteinlerini düzenlediği bilinmektedir. Aslında Ngn3 mRNA'nın *Xenopus* embriyolarına enjeksiyonunu NeuroD1'in ektopik ekspresyonunu başlatır. Yerli NeuroD1 ekspresyonunu ele alan promoter parçalar 17 E kutuları içerirler. Aralarında iki E-box uyumları NeuroD1 ekspresyonu için önemlidir, çünkü Ngn3, proksimal E kutuları ile NeuroD1 promoteri bağlayıp aktive eder (128) .

Neurogenin 3 pankreas farklılaşması esnasında proendokrin hücreler ile geçici olarak ifade edildiği için, NeuroD1 gibi pankreasta bulunan Ngn3'ü gösteren faktörler Ngn3'ün direkt hedefi gibi olur. Böyle bir faktör, homeodomain transkripsiyon faktörü Pax4 ile eşlendirilebilir. Pax4 geninin bozulması β ve δ hücre farklılaşmasını zedeler, fakat α hücre farklılaşmasını etkilemez (97). Pankreas gelişimi esnasında, Pax4'ün doruğu ikincil geçiş aşaması etrafında gözlenir ve Ngn3 ile kısmi co-ekspresyonunu gösterir (129). Bununla birlikte, kendi ekspresyonu olgun β hücrelerinde gözlenmez. Farelerde ve hücre hatlarındaki raportör gen analizi göstermiştir ki Pax4 geninin transkripsiyon başlangıç alanından olan -1900 bp etrafındaki bölgenin hücre-özellikli ekspresyonu için önemli olduğunu göstermiştir (97).

Hepatosit nükleer faktör-4 bağlayıcı alan, HNF1-bağlayıcı alan ve E box bu bölgede bulunur ve Pax4'ün ekspresyonunda önemli bir rol oynar (130). Onlar arasında, mutasyonun HNF1-bağlayıcı alanı veya E box içindeki girişi kendi geliştirici aktivitesini neredeyse tamamen yok eder. HNF1 α ve Ngn3 her alana bağlanır, fiziksel olarak etkileşime girer ve sinerjik olarak promoteri aktive eder. Bu bilgiler göstermiştir ki Ngn3, HNF1 α ile işbirliği yapar ve transkripsiyonel bir aktivatör alır. Pax4 ekspresyonunu aktive eder (131) .



Şekil 4. Ngn3'ün endokrin hücreler üzerindeki etki mekanizması.

Neurogenin 3, NeuroD'in ekspresyonunu aktive edebilir. Nkx2.2 ve Pax4'ün düzenlenmesi için, Ngn3 fiziksel olarak endodermal transkripsiyon faktörleriyle etkileşimde bulunur ve sinerjik her bir hedef genin prometerini aktive eder. İlginç bir şekilde, Ngn3'ün güçlü bir represyon alanı olmadığı halde kendi öncüsünü baskılar.

Bu sonuçlar gösteriyor ki, Nkx2.2, Ngn3'ün olası direkt hedefidir. Ngn3 ve Pax4'den farklı olarak Nkx2.2'nin ekspresyonu ayrıca olgun adacık hücrelerinde gözlenir. Nkx2.2 geni bozulması α ve β hücrelerinin farklılaşmasını zedeler ve bu genin analizi göstermiştir ki Nkx2.2 en azından 3 alternatif öncül eksonlara (eksonlar 1a, 1b, 1c) sahiptir (132). Bu eksonların 5 sınırdaş bölgelerinin uyumu her parçanın bir promoter olarak işlev gördüğünü göstermiştir. Bakteriyel LacZ genini yürüten üç promoterin her biriyle ilgili transgenik fareler üzerindeki çalışmalar, 1b promoterin özellikle islet prekürsörlara olan ekspresyonu sınırladığını göstermiştir. Diğer bir yandan, 1a promoteri (ekson 1a'dan yukarı uyumu) ağırlıklı olarak olgun islet hücrelerindeki ekspresyonunu yönlendirir. Proendokrin hücrelerinden farklılaşmış endokrin hücrelerine geçiş gen ekspresyon programında bulunan ilerleyici değişimlerde bulunur. Nkx2.2 geni içindeki farklı uyumları kullanarak endokrin farklılaşmasının farklı aşamalarında olan hücreler Nkx2.2 gösterirler. 1a promoter ekspresyonu, transkripsiyon başlangıç alanı yakınsal bulunan Foxa-bağlayıcı alana ve E box dayanır (132).

Forkhead box A2 (Foxa2) ve Ngn3 veya NeuroD1 her alana bağlanır, etkileşimde bulunur ve sinerjik olarak promoteri aktive ederler. Bu sonuçlar göstermiştir ki Ngn3 veya NeuroD1 transkripsiyonel bir co-aktivatör alıp Nkx2.2

ekspresyonunu aktive etmek için Foxa2 ile işbirliği yapar. Ngn3-NeuroD1 aksının ekspresyonunun zamanlaması dikkate alındığında, Ngn3 Nkx2.2'in gelişmiş ekspresyonunu harekete geçirebilir. Ngn3'ün kaybolmasından sonra, NeuroD1, Nkx2.2'nin ekspresyonunu düzenlemek için harekete geçebilir (133).

Neurogenin 3 ile doğrudan etkilenen aşağı etken gibi olan diğer aday Ngn3'ün kendisidir. Ngn3 proendokrin hücrelerle gösterilir, fakat kendi ekspresyonu hızlı bir şekilde kapanır. Pax4 ve Nkx2.2 promoter'den farklı olarak, Ngn3 promoteri Ngn3'ün kendisiyle gösterilir. Bu represör aktivite aynı zamanda transkripsiyon başlangıç alanına yakınsal bulunan E box ile de aracılık edilir. Bu represör etki bir başka transkripsiyon etkenin doğrudan kompetitif bağlanması ile kısmen aracılık eder gibi görünür, çünkü Ngn3'ün kendisi transkripsiyon represör etkinliğini göstermez. Böylece, Ngn3, Pax4 ve Nkx2.2 gibi islet transkripsiyon faktörlerini HNF1a ve Foxa2 gibi diğer endodermal transkripsiyon faktörleri ile işbirliği içinde, kendi promoteri baskılarken aktive eder (134).

1.3.5. Ngn3'ün β Hücre Rejenerasyonuna Uygulanması

Olgun adacık hücrelerinin oluşumundan sonra devamlı yenilenme vardır. Birkaç çalışma göstermiştir ki, pankreas adacık hücrelerinde bulunan hücreler endokrin hücrelere farklılaşabilirler (135, 136). İnsan pankreas kanal hücrelerinde bulunan Ngn3'ün aşırı ekspresyonu β hücrelerinin farklılaşmasını uyarabilir (137). Yapılan çalışmalarda; pankreatik tomurcuklar gibi olgun olmayan hücrelerde bulunan Ngn3'ün ekspresyonunun α hücrelerindeki farklılaşmayı aktifleştirdiği gösterilmiştir. Bu farklılıklar β hücresi oluşum aşamasında bulunan varyasyonlardan kaynaklanabilir (101, 102). Kojima ve arkadaşları yaptıkları çalışmada karaciğerdeki NeuroD1'in aşırı ekspresyonunun karaciğerde bulunan adacık hücrelerinin ektopik formasyonuna neden olduğunu ve böylelikle hiperglisemiye yol açtığını göstermişlerdir. Sonuç olarak yetişkin organlarında bulunan endokrin bez öncül hücrelerinden β hücrelerinin rejenerasyonunun sağlanması için NeuroD1'e gerek duyulduğu anlaşılmıştır (138).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nde ve çalışmanın etik onayı, 11.10.2012 tarih ve 01 sayılı kararı alınarak yapıldı. Çalışmaya Fırat Üniversitesi Genel Dahiliye klinik ve polikliniğine müracaat eden en az 6 aydır Tip 2 DM tanısı almış 30 yaş üzeri gönüllü sadece oral antidiyabetik tedavisi alan 10 erkek ve 10 bayan ve ilaç tedavisi almayan 10 erkek ve 10 bayan toplam 40 diabetik hasta ve 30 yaş üzeri gönüllü nondiyabetik 20 erkek ve 20 bayan toplam 40 kişilik kontrol grubu alındı. Hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcılar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamaları alındı. Çalışmaya Tip 1 DM tanısı alanlar, 30 yaşından küçük olanlar ve insülin kullananlar alınmadı.

Neurogenin 3 (Ngn3) ve Sirtuin1 (SIRT-1) gen polimorfizmi ve gen ekspresyonunun patogenezdaki rolü araştırıldı.

2.1. Gen Ekspresyonu ve Polimorfizmin Çalışılması

Her iki gruptan 3 ml periferik kan alındı. Kanlar çalışılana kadar -20 derecede saklandı. Malzemeler alındıktan sonra tıbbi genetik laboratuvarında DNA ve RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra real time PCR (RT-PCR) metodu ile Neurogenin 3 ve SIRT-1 gen polimorfizmine ve gen ekspresyonuna bakıldı. Tip 2 DM hastalığı olanlar her gen polimorfizmi ve gen ekspresyonu için kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Tip 2 DM tanısı olanların boy uzunluğu, vücut ağırlığı, vücut kitle indeksi, total kolesterol, kan glukozu ve HbA1c değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Bunlar dışında gerekli bilgiler ve laboratuvar parametreleri hasta dosyalarından temin edildi.

2.2. Genomik DNA İzolasyonu (İnvitrogen™ PureLink™ genomik DNA kitleri)

Benmari 55 °C sıcaklığa ayarlandı. Mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan örneği konulup 20 µl Proteinaz K eklendi ve 20 µl RNAaz eklendi, 10-15 sn vorteksledikten sonra 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. 200 µl lizis tamponu eklenip karıştırıldıktan sonra 10-15 sn vorteksledi. Karışım 55°C'de 10 dk bekletildi. Ependorflardaki karışım döndürme sütunlarına aktarıldı. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü yeni tüpe aktarıldı. 500 µl yıkama tamponu 1 eklendi. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü yeni tüpe aktarıldı. 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi. 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpleri atılıp yerine

1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpü eklendi. 500 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk beklendikten sonra 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası mikrosantrifüj tüplerinde saf DNA elde edilmiş oldu.

2.3. mRNA'nın Magnacompact ile izolasyonu

Edtalı tüplere alınan kan örnekleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında magnacompact'a 100 µl kadar yüklenip 100 µl RNA elde edildi. Önce cihaza kartuşlar okutturulup yerleştirildi. Tıp trayslar yerleştirildi. Kan örnekleri sample tüplere alındı. 20µl RNAaz sample tüplerine yerleştirildi. Elüsyon tüpleri de cihaza yerleştirildi, program düzenlendi ve çalışma başlatıldı. Çalışma sonunda elüsyon tüplerde 100µl RNA elde edildi.

2.4. SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 Genotipinin Saptanması

Kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'lar Light Mix amplifikasyon karışımı ve Light Cycler Fast Start DNA Master Hybridization probaları kullanılarak Light Cycler 2,0 cihazı ile çoğaltılmıştır. 5 µl örnek DNA'sı + 1.6 µl Mg₂Cl₂ solüsyonu +2 µl reagent mix +2 µl Roche master mix ve 10.4 µl steril deiyonize su ile karışım hazırlanmıştır. Liyofilize kontrol DNA'lar her reaksiyon için 10⁵ seviyesinde DNA içerecek şekilde steril deiyonize su ile sulandırılmıştır. Light Cycler cihazında 95 °C'de 10 dakika denatürasyona bırakıldı. Elde edilen DNA çoğaltılarak, floresan ışımaya ile ısının 85°C'ye yükselmesi ile erime eğrisi analizi saptandı. Ardından 40°C'de 30sn soğutma ile işlem tamamlanmıştır. Ürünlerin erime eğrisi ve erime noktası (T_m) analizleri yine aynı cihazda yapılmıştır. rs7895833 ve rs4536103 genotip bölgesi için PCR sonuçları Simple Probe probu ile analiz edilmiştir. rs7895833 ve rs4536103 tek nükleotid polimorfizmleri için örnekler homozigot alel (T/T) için 51,4 °C, heterozigot alel (C/T) için 51-59 °C ve homozigot variant alel (C/C) için 59,2 °C'de pik veren standartlar ile birlikte değerlendirilmiştir. rs7895833 ve rs4536103 tek nükleotid polimorfizmleri için kullanılan negatif kontrollerde herhangi bir pik gözlenmemiştir.

2.5. SIRT1 ve Ngn3 Geninden Eksprese olan mRNA Düzeyini Ölçme Yöntemi

Elde edilen RNA'lar nanodrop sayesinde ölçülerek cDNA eldesi için eşit konuma getirildi. Elde edilen RNA'ların üzerine 1 µl H₂O ve 1 µl random hexamer primer eklenerek 0,2'lik ependorf tüplere konuldu. PCR protokolünde 65 °C'de 10 dk bekletildi. "transcriptor first strand cDNA synthesis" kiti kullanılarak RNA'ların üzerine eklenmesi için bir miks hazırlandı. Elde edilen 4µl karışıma deoxynucleotide karışımı, transcriptor RT reaction buffer ve 0,5 µl protector RNAaz inhibitörü eklendi. 37 °C'de 60 dk ve 65°C'de 10 dk protokolü ile 0,2' lik tüpler PCR'ye konularak tekrar çalıştırıldı ve cDNA'lar elde edildi. Daha sonra lightcycler TAqMan master kiti ile miks hazırlandı. Bu miks hazırlanmadan önce kutudaki enzimden 10 µl alınarak reaksiyon miks üzerine konuldu. Sonra bir tüp alınarak miks hazırlandı. Saf sudan 10 µl, reaksiyon miksten 4µl ve Ngn3 ve SIRT1 ekspresyon assay'den 1 µl alınarak miks hazırlandı. Sonra bu miks kapiller tüplerine 15 µl olacak şekilde dağıtıldı ve üzerine 5µl RNA bırakılarak cihazın karoseline yerleştirildi. Daha sonra lightcycler PCR protokolü hazırlandı. Önce 95 °C'de 10 dk ısıtılıp ardından 40°C'de 30sn soğutulduktan sonra denatürasyon sağlandı. Bu çalışmada G6PDH detection miks kontrol olarak kullanıldı. Her örnek için tek tek kontrol kullanılıp, çalışma kontrol amaçlı tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar lightcycler rölatif kantitasyon yazılım programı sayesinde düzenlenip bilgisayara yüklendi.

2.6. İstatistiksel Analiz

Veri setinin analizinde SPSS 16 (Statistical Package for the Social Sciences, version 16, SSPS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanıldı. Çalışılan Ngn 3 ve SIRT-1 gen polimorfizmi açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki ilişki için ki-kare testi kullanıldı. Ayrıca hasta grubu tedavi alan ve almayanları karşılaştırmak için de ki-kare testi kullanıldı. Hasta ve kontrol grubuna ait sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında (bağımsız gruplarda) Oneway ANOVA testi kullanıldı. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

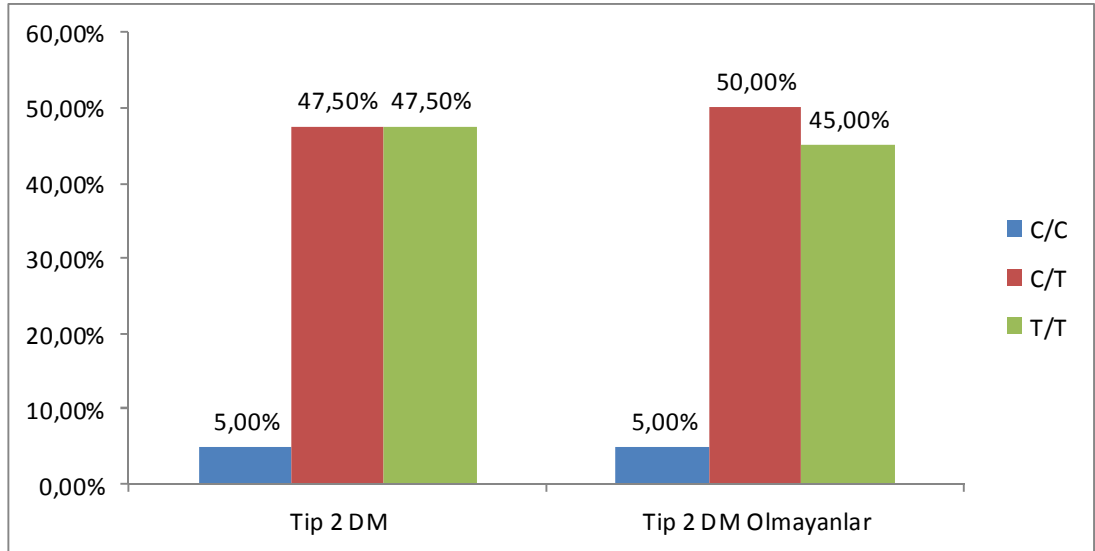
3. BULGULAR

3.1. Genel Popülasyon

3.1.1. SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmi

Tip 2 DM grubunda (n=40) rs12979860 gen bölgesi için 2 kişi homozigot (C/C), 19 kişi heterozigot (C/T) ve 19 kişi homozigot mutant (T/T) genotipi saptandı. Tip 2 DM tanısı olmayan kontrol grubunda (n=40) ise 2 kişi homozigot (C/C), 20 kişi heterozigot (C/T) ve 18 kişi mutant (TT) saptandı. Bu açıdan her iki grup arasında gen mutasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,974).

3.1.1.1. SIRT1 rs789583



p=0,974

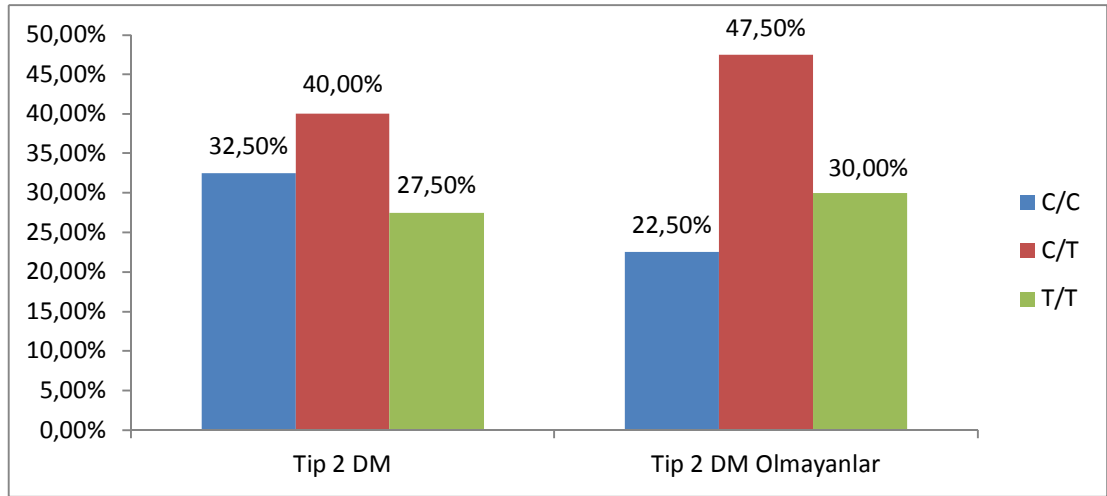
Şekil 5. SIRT1 rs789583 gen bölgesi polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki oranları

Tablo 5. rs12979860 gen bölgesi polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırması (X² testi).

SIRT1 rs789583	C/C		C/T		T/T		Toplam	P
	n	%	n	%	n	%		
Tip 2 DM Olanlar	2	5	19	47,5	19	47,5	40 %100	0,974
Tip 2 DM Olmayanlar	2	5	20	50	18	45	40 %100	
Toplam	4		39		37		80	

3.1.2. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi

Tip 2 DM hastalarında (n=40) Ngn3 rs4536103 gen bölgesi homozigot (C/C) sayısı 13 kişi (%32,5), heterozigot (C/T) sayısı 16 kişi (%40) ve homozigot mutant (T/T) sayısı ise 11 (%27,5) kişidir. Buna karşın Tip 2 DM tanısı olmayan kontrol (n=40) grubunda homozigot (C/C) sayısı 9 kişi (%22,5), heterozigot (C/T) sayısı 19 kişi (%47,5) ve homozigot mutant (T/T) sayısı 12 (%30) kişidir. İki grup arasında Ngn3 rs4536103 gen bölgesinde genotip açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p:0,597).



P=0,597

Şekil 6. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki oranları.

Tablo 6. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırması (X² testi).

Ngn3 rs4536103	A/A		G/A		G/G		Toplam	p
	n	%	n	%	n	%		
Tip 2 DM Olanlar	13	32,5	16	40	11	27,5	40 %100	0,597
Tip 2 DM Olmayanlar	9	22,5	19	47,5	12	30	40 %100	
Toplam	22		35		23		80	

3.1.3. Ngn3 rs4536103 Gen Ekspresyonu (mRNA Düzeyi)

Neurogenin3 rs4536103 geninde hangi polimorfizm olduğuna bakılmaksızın bu genden hasta ve kontrol gruplarında Ngn3 rs4536103 gen ekspresyonu düzeyleri açısından T testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarının Ngn3 rs4536103 gen ekspresyonu düzeyleri açısından karşılaştırılması (T-test).

Grup	n	Ortalama	Std. sapma	P
Tedavi alan	20	1,8945	2,60123	
Tedavi almayan	20	2,3780	3,34345	0,843
Kontrol	40	2,2405	2,45590	

3.1.4. SIRT1 rs7895833 Gen Ekspresyonu (mRNA Düzeyi)

Sirtuin1 rs7895833 geninde hangi polimorfizm olduğuna bakmaksızın bu genden hasta ve kontrol gruplarında SIRT1 rs7895833 gen ekspresyonu düzeyleri açısından T testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında ortalamalar açısından anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 8. Hasta ve kontrol gruplarının SIRT1 rs7895833 gen ekspresyonu düzeyleri açısından karşılaştırılması (T-testi).

Grup	n	Ortalama	Std. sapma	P
Tedavi alan	20	1,6100	2,74799	
Tedavi almayan	20	1,8585	2,71772	0,867
Kontrol	40	1,4900	2,33478	

3.1.5. Tüm çalışma gruplarında Ngn3 rs4536103 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tüm çalışma gruplarında Ngn3 rs4536103 gen bölgesinde C/C, C/T yada T/T genotiplerine göre Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeylerinin nasıl etkilendiğine bakıldığında bu üç grubun ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.471$).

Tablo 9. Tüm çalışma gruplarında Ngn3 rs4536103 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (One Way ANOVA).

	rs4536103	N	Ort. değer	Std. sapma	p
Ngn 3	C/C	22	2,6173	3,06478	
Ekspresyonu	C/T	35	2,2783	2,83134	0,471
	T/T	23	1,6413	2,10749	
	Total	80	2,1884	2,70662	

3.1.6. Tüm çalışma gruplarında SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Gen Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tüm çalışma gruplarında SIRT1 rs7895833 gen bölgesinde C/C, C/T ya da T/T genotiplerine göre SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeylerinin nasıl etkilendiğine bakıldığında bu üç grubun ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.305$).

Tablo 10. Tüm çalışma gruplarında SIRT1 rs7895833 Gen Bölgesi Polimorfizmine Göre Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (One Way ANOVA).

	rs7895833	N	Ort. değer	Std. sapma	p
SIRT1 ekspresyonu	C/C	5	2,0540	2,07065	0,305
	C/T	38	2,0105	2,82678	
	T/T	37	1,1432	2,17480	
	Total	80	1,6121	2,51129	

3.2. Hasta Grubu

3.2.1. SIRT1 rs7895833 ile Ngn3 rs4536103'nin genotiplerinin ki-kare karşılaştırması

Her iki polimorfizm bölgesinde tespit edilen hastaların sayısı 80 kişi, bunlardan her iki gende homozigot olan, heterozigot olan, homozigot mutant olanlar χ^2 testi ile karşılaştırıldı ve iki mutasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,383$).

Tablo 11. SIRT1 rs7895833 ile Ngn3 rs4536103'nin gen bölgelerinin polimorfizmlerinin ilişkisi (χ^2 testi).

	NEUROG3 rs4536103'nin			Toplam	p
	C/C	C/T	T/T		
SIRT1 rs7895833	C/C	2	2	4	< 0,383
	C/T	12	18	39	
	T/T	8	15	37	
Toplam	22	35	23	80	

3.2.2. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi

3.2.2.1. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi

Cinsiyet ile SIRT1 rs7895833 gen bölgesi C/C, C/T, T/T genotipleri açısından Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında bu gen bölgesi polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,847$).

Tablo 12. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi (X^2 testi).

SIRT1 rs7895833	C/C	C/T	T/T	Toplam	P
Erkek	3 60 %	18 47,4 %	19 51,4 %	40 100%	
Kadın	2 40%	20 52,6%	18 48,6%	40 %100	0,847
Toplam	5	38	37	80	

3.2.2.2. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi

Glikozile hemoglobin (HbA1c) ile SIRT1 rs7895833 gen bölgesi C/C, C/T, T/T genotipleri açısından Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında bu gen bölgesi polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,645$).

Tablo 13. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi (X^2 testi).

SIRT1 rs7895833	N	Ortalama	Std. sapma	p
C/C	5	6,7800	1,43422	
C/T	38	6,1842	1,57764	0,645
T/T	37	6,1027	1,45650	
Toplam	80	6,1838	1,50404	

3.2.3. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi

3.2.3.1. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi

Cinsiyet ile Ngn3 rs4536103 gen bölgesi C/C, C/T, T/T genotipleri açısından Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında bu gen bölgesi polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,228$).

Tablo 14. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile cinsiyet ilişkisi (X^2 testi).

Ngn3 rs4536103	C/C	C/T	T/T	Toplam	P
Erkek	14 63,6%	16 45,7%	10 43,5%	40 100%	0,228
Kadın	8 36,4%	19 54,3%	13 56,5%	40 %100	
Toplam	22	35	23	80	

3.2.3.2. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi

Glikozile hemoglobin (HbA1c) ile Ngn3 rs4536103 gen bölgesi C/C, C/T, T/T genotipleri açısından Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında iki grup arasında bu gen bölgesi polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,967$).

Tablo 15. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi polimorfizmi ile HbA1c ilişkisi (X^2 testi).

Ngn3 rs4536103	n	Ortalama	Std. sapma	p
C/C	22	6,2500	1,58738	0,967
C/T	35	6,1429	1,40426	
T/T	23	6,1826	1,63197	
Toplam	80	6,1838	1,50404	

3.2.4. Ngn3 rs4536103 gen bölgesi ekspresyonu

3.2.4.1. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi

Hasta grubundan tedavi alanların sayısı 20 ve tedavi almayanların sayısı 20 idi. Hasta grubundan tedavi alanların ve almayanların Ngn3 rs4536103 ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,613$).

Tablo 16. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi (T-test).

Ngn3 rs4536103	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi alan	20	1,8945	2,60123	
Tedavi almayan	20	2,3780	3,34345	0,613
TOPLAM	40	2,1362	2,96689	

3.2.4.2. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi

Hasta olup tedavi almayanlar 20 kişi ve kontrol grubu 40 kişiydi. Hasta grubundan tedavi almayanların ve kontrol grubunun Ngn3 rs4536103 ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü (p=0,857).

Tablo 17. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi (T-test).

Ngn3 rs4536103	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi almayan	20	2,3780	3,34345	
Kontrol grubu	40	2,2405	2,45590	0,857
Toplam	60	2,2863	2,75519	

3.2.4.3. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi

Hasta olup tedavi almayanların sayısı 20 ve kontrol grubu sayısı 40 idi. Hasta grubundan tedavi alanların ve kontrol grubunun Ngn3 rs4536103 ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü (p=0,616).

Tablo 18. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi (T-test).

Ngn3 rs4536103	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi alan	20	1,8945	2,60123	
Kontrol grubu	40	2,2405	2,45590	0,616
Toplam	60	2,1252	2,48857	

3.2.5. SIRT1 rs7895833 gen bölgesi ekspresyonu

3.2.5.1. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi

Hasta grubundan tedavi alanların sayısı 20 ve tedavi almayanların sayısı 20 idi. Hasta grubundan tedavi alanların ve almayanların SIRT1 rs7895833 ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,775$).

Tablo 19. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alan ve almayanların ilişkisi (T-test).

SIRT1 rs7895833	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi alan	20	1,6100	2,74799	
Tedavi almayan	20	1,8585	2,71772	0,775
Toplam	40	1,7342	2,70057	

3.2.5.2. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi

Hasta olup tedavi almayanların sayısı 20 ve kontrol grubu sayısı 40 idi. Hasta grubundan tedavi almayanların ve kontrol grubunun SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,588$).

Tablo 20. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi almayanlar ile kontrol grubu ilişkisi (T-test).

SIRT1 rs7895833	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi almayan	20	1,8585	2,71772	
Kontrol grubu	40	1,4900	2,33478	0,588
Toplam	60	1,6128	2,45205	

3.2.5.3. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi

Hasta olup tedavi almayanların sayısı 20 ve kontrol grubu sayısı 40 idi. Hasta grubundan tedavi alanların ve kontrol grubunun SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon

düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görüldü (p=0,616).

Tablo 21. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi - Tip 2 DM’u olup tedavi alanlar ile kontrol grubu ilişkisi (T-test).

SIRT1 rs7895833	n	Ortalama	Std. sapma	p
Tedavi alan	20	1,6100	2,74799	
Kontrol grubu	40	1,4900	2,33478	0,860
Toplam	60	1,5300	2,45732	

3.2.5.4. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi

Obez olmayanların sayısı 54 ve obez olanların sayısı 26 idi. Obez olan ve obez olmayanların SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,01).

Tablo 22. SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyi- obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi (T-test).

SIRT1 rs7895833	N	Ortalama	Std. sapma	p
Obez olan	26	0,2462	1,25514	
Obez olmayan	54	2,2698	2,70207	0,01
Toplam	80	1,6121	2,51129	

3.2.5.4. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi-obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi

Obez olmayanların sayısı 54 ve obez olanların sayısı 26 idi. Obez olan ve obez olmayanların Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,04).

Tablo 23. Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyi - obez olan ve obez olmayanlarla ilişkisi (T-test).

Ngn3 rs4536103	N	Ortalama	Std. sapma	p
Obez olan	26	0,9592	1,77345	
Obez olmayan	54	2,7802	2,88757	0,04
Toplam	80	1,1884	2,70662	

4. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus (DM) kronik hiperglisemi ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır. İnsülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve/veya insülin direnci sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluklarıyla karakterizedir. DM'da kronik hiperglisemi akut metabolik komplikasyonların yanısıra, uzun dönemde vücudun çeşitli organ ve sistemlerinde; özellikle gözler, böbrekler, kalp ve kan damarlarında olmak üzere hasarlara ve fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. DM klinikte polidipsi, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifaji gibi belirtilerle ortaya çıkar. Nonketotik hiperozmolarite veya ketoasidoz gibi daha ağır formlarında hızlı ve etkin tedavi yapılmadığı takdirde stupor, koma ve ölüme yol açabilir. Semptomlar genellikle hafiftir bazen de yoktur. Çoğu kez klinik açıdan farkına varılamayan hiperglisemiler organ ve sistemlere hasar verir ve tanı sırasında hastada komplikasyonlara rastlanır (1, 2). Diyabet yaşam boyu süren, hastayı olduğu kadar yakınlarını ve toplumu ilgilendiren, oluşturduğu komplikasyonları pahalı olan, yaşam kalitesini bozan ve sıklığı giderek artan bir hastalıktır (3).

Ülkemizde Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması) verilerine göre diyabetik sıklığının %13,7 olduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra; toplumda bilinen diyabetik kadar, bilinmeyen diyabetik bulunduğu da düşünülerek bu oranın daha yüksek olabileceği tahmin edilmektedir (4). Dünya genelinde diyabet prevalansı hızlı bir şekilde artmaktadır ve ülkelerdeki en yaygın epidemik hastalıklardan biri haline gelmektedir. İnsülin sekresyon ve sensitivitesini arttıran birçok farmasötik müdahalelere rağmen, pankreasın langerhans adacıklarında insülin üreten hücre kitlesinin potansiyelinin öğrenilmesi konusunda alınacak çok yol var. Pankreas ve adacık hücrelerinin hasara cevap olarak rejenerasyon potansiyelinin varlığı saptanmıştır. Ayrıca böyle bir rejenerasyonun nasıl olduğu kesin değildir. Son zamanlardaki bazı çalışmalar bu bulmacaya ve erişkin pankreas hücrelerindeki stem ve stem benzeri hücre bulunmasına yeni bakış açıları katmışlardır. Bu çalışmalar pankreastaki selüler rejenerasyonun embriyogenez sırasında pankreas gelişimindeki yolları reaktifte ediyor olabileceğini düşündürmektedir (84).

Gen polimorfizmleri, genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz çifti değişiklikleridir. Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler. Hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumlarda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu polimorfizmlerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski arttırmaktadır (41).

Çalışmalar proendokrin rejenerasyon olan pankreastaki transkripsiyon faktörü Ngn3 varlığını ve adacıklardaki yeni endokrin hücre farklılaşmasındaki önemi çevresinde odaklanmıştır. Bu çerçevede Ngn3'ün gelişen ve rejenerasyon olan pankreastaki konumu endokrin kitle artışı için muhtemel Ngn3 temelli tedavileri tartışma konusu haline getirmiştir. Pankreatik adacık hücre diferansiyasyonu ve rejenerasyonu için temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü Ngn3 kritik role sahiptir. Endokrin hücre gelişiminin primer ve sekonder ayrışması esnasında ortaya çıkan Ngn3; glukagon, insülin, pankreatik polipeptit ve somatostatin ekspresyon eden alfa, beta, pankreatik polipeptit ve gama hücrelerin oluşumunu sağlar. Ngn3'ün endokrin pankreas gelişimindeki düzenleyici rolü beta hücre kitlesini ve fonksiyonlarını arttırarak Ngn3 ekspresyonunu genişleten terapötik yaklaşımlar için önemli olabilir. Dünya genelinde diyabet prevalansı hızlı bir şekilde artmaktadır ve ülkelerdeki en yaygın epidemik hastalıklardan biri haline gelmektedir. İnsülin sekresyon ve sensitivitesini arttıran birçok farmasötik müdahalelere rağmen, pankreasın langerhans adacıklarında insülin üreten hücre kitlesinin potansiyelinin öğrenilmesi konusunda alınacak çok yol var. Pankreas ve adacık hücrelerinin hasara cevap olarak rejenerasyon potansiyelinin varlığı saptanmıştır. Ayrıca böyle bir rejenerasyonun nasıl olduğu kesin değildir. Son zamanlardaki bazı çalışmalar bu bulmacaya ve erişkin pankreas hücrelerindeki stem ve stem benzeri hücre bulunmasına yeni bakış açıları katmışlardır. Bu çalışmalar pankreastaki hücresel rejenerasyonun embriyogenez sırasında pankreas gelişimindeki yolları reaktif ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalar proendokrin rejenerasyon olan pankreastaki transkripsiyon faktörü Ngn3 varlığı ve Ngn3'ün adacık hücrelerindeki

yeni endokrin hücre farklılaşmasındaki önemi çevresinde odaklanmıştır. Bu çerçevede Ngn3'ün gelişen ve rejenere olan pankreastaki konumu endokrin kitle artışı için muhtemel Ngn3 temelli tedavileri tartışma konusu haline getirmiştir (84).

Neurogenin3 (Ngn3) pankreasın endokrin öncü hücrelerinden salınan bir transkripsiyon faktörüdür. Son zamanlarda Ngn3 eksikliği olan farelerde pankreatik endokrin hücreleri yokluğu ve postnatal diyabete bağlı ölüm bildirilmiştir. Okada ve arkadaşları 197 kişilik Tip 2 DM ve 216 kişilik kontrol gruplarını kapsayan Japon deneklerde yapılan çalışmalarında Ngn3 genin polimorfizmini göstermek ve bu polimorfizmleri Tip2 DM'li Japon deneklerle ilişkisini test etmek amacıyla çalışma yapmışlar. Allel frekansları hasta grupta 0.721, kontrol grubunda 0.694 saptanmış. Sonuç olarak mutasyonlar ve Ngn3 genin polimorfizmleri Tip 2 diyabet (non-insüline bağımlı) 'li Japonlarda diyabet ile ilişkili bulunmamıştır (139).

Bir çalışmada transkripsiyon faktörü Ngn3 Tip 2 diyabet gelişimi için bir aday gen olarak kabul edilmiş olup diyabet gelişiminin klinik spektrumu ve hastalık progresyonu ile Ngn3 varyasyonları ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Tip 2 diyabet riski olan deneklerin (n=552) tamamı incelenmiştir. 75 gr OGTT yapılarak açlık plazma glukoz, insülin ve proinsülin ölçümleriyle 30, 60, 90 ve 120 dakika sonraki karşılaştırma yapılmış. 3 yıl sonra tekrar aynı ölçümler yapılmış. Ngn3 SNP (Simple Nükleotid Polimorfizm), Gly167Arg ve Ser199Phe genotiplendirilmiştir. SNP Ser199Phe'de varyant genotip taşıyan tip 2 diyabetli hastalarda daha yüksek proinsülin seviyeleri mevcuttur. Proinsulin seviyesi de diyabet ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur. Hastalık durumunun ilerlemesi ile Ser199Phe varyantı arasında farklı bir ilişki saptanmıştır. Ngn3 genindeki bir genetik varyasyon diyabet patogenezinde yer alan genetik belirleyiciler arasında olabilir (140).

Bir başka çalışmada polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak 19 MODY hastası, 19 Tip1 DM hastası, 31 erken başlangıçlı ve 64 geç başlangıçlı Tip 2 diyabetli hasta grubundan oluşan 133 diyabetik hastada Ngn3'ün tek iplikli yapısı, 5 've 3' kodlama bölgesi polimorfizm açısından incelendi. Allel frekansları 377 diyabetli hastada ve 217 glukoz toleranslı kontrol grubunda bakıldı. Ngn3'ün genetik varyasyonları Tip 1 diyabet, MODY, Tip 2 diyabet ve Danimarkalı Kafkaslarda taranan deneklerdeki insülin salgısının değişiklikleriyle ilişkilendirilmemiştir (141).

Çalışmamızda Tip 2 DM (n=40) olan ve Tip 2 DM olmayan kontrol (n=40) grupları Ngn3 rs4536103 ve SIRT1 rs7895833 gen bölgesi polimorfizmleri açısından karşılaştırıldı. Gen bölgesi polimorfizmi oranları açısından bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.383) (Tablo 11).

Bizim çalışmamızda Tip 2 DM hastalarında (n=40) Ngn3 rs4536103 gen bölgesi homozigot (C/C) sayısı 13 (%32,5), heterozigot (C/T) sayısı 16 (%40), homozigot mutant (T/T) sayısı ise 11 (%27,5) kişidir. Buna karşın Tip 2 DM olmayan kontrol (n=40) grubunda homozigot (C/C) sayısı 9 kişi (%22,5), heterozigot (C/T) sayısı 19 kişi (%47,5), homozigot mutant (T/T) sayısı 12 (%30) kişidir. İki grup arasında Ngn3 rs4536103 gen bölgesinde genotip açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,597) (Tablo 6).

Obez olmayanların sayısı 54 ve obez olanların sayısı 26 idi. Obez olan ve obez olmayanların Ngn3 rs4536103 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,04) (Tablo 22).

Sirtuinler ile glikoz hemostazı ve insülin sekresyonu arasında ilişkiyi gösteren bilgiler bu proteinlerin insülin direnci ve diyabet oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada transgenik SIRT1 overekspresyon yapılan ve yağlı diyet alan hayvanlarda glikoz toleransını artırdığı gösterilmiştir (64, 65).

Bazı çalışmalarda SIRT1 miktarında ılımlı artışın bazal enerji homeostazı üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT1 'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklediği görülmüştür (72). Bu bilgi bize sirtuinin aktivitesindeki manipulasyonlarla metabolik bozuklukların önlenmesinde kullanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde insanlarda SIRT 1'deki farklı genetik varyasyonlarla enerji tüketimi ve obezite arasında ilişki saptanmıştır (73).

Memelilerde kan glikoz konsantrasyonu farklı fizyolojik durumlarda dar bir aralıkta tutulmaya çalışılır. Açlık durumunda serum glikozunun belirtilen düzeyi hepatik glikoneogenez ile sağlanmaktadır. Sürdürülen çalışmalar sirtuinlerin bu fizyolojik adaptasyonda rol aldığını göstermektedir. Peroxizome proliferator – activated receptor gama-coactivator-1 α (PGC-1 α) SIRT 1 bağımlı deasetilasyon için bir hedef gözükmemektedir (60). Bu koaktivatör karaciğerde glukoneogenezin

düzenlenmesi ile yağ asidi oksidasyonunda esas rolü oynamaktadır. PGC-1 α bu iki yol üzerindeki düzenleyici rolü için sirtuinlere gereksinim duymaktadır (61). Kısa süreli (< 6 saat) ve uzun süreli (> 18 saat) açlık durumlarında protein asetilasyonu ve sirtuin deasetilasyonunun karaciğerin oluşturduğu yanıtın düzenlenmesindeki farklı rolleri incelenmiştir (62).

Hepatik glikoneogenez üzerindeki etkileri yanında sirtuinler kan glikozunu pankreatik insülin salınımını düzenleyerek de ayarlamaktadırlar. Fare β hücrelerine aktarılan SIRT1 overekspresyonunun glikozun uyardığı insülin sekresyonunu artırdığı ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında glikoz toleransını ilerlettiği görülmüştür (63). Buna karşın *Sirt1*^{-/-} farelerde glikozun stimüle ettiği insülin sekresyonu bozulmuştur (64). Sirtuinlerin glikoz hemostazının düzenlenmesinden ziyade metabolizma üzerinde daha geniş bir rolü vardır. Daha önce belirtildiği gibi SIRT1 PPAR- γ ve PGC-1 α üzerindeki düzenleyici etkileri ile yağ mobilizasyonu ve oksidasyonu üzerinde önemli rol oynarlar (55, 65). Sirtuinlerin PGC- α aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkileri yeni mitokondri sentezi üzerinde rolleri olduğunu düşündürmektedir. PGC- α mitokondri biyogenezinde anahtar role sahiptirler. Bu gözlemler SIRT1 ile otofaji arasındaki bağlantıyı göstermektedir (66). Sirtuinler PGC- α üzerinden hücrelerdeki mitokondri sentez ve yıkımı arasında bir denge kurmaktadır. Sirtuinlerin metabolik düzenleme üzerindeki etkileri üzerine olan çalışmalar karaciğer, pankreas gibi anahtar organlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Kalori kısıtlaması yapılan kişiler üzerinde yapılan çalışmalar SIRT1'in kas ve mononükleer hücrelerde de arttığını göstermiştir (67, 68). SIRT1 ile sirkadiyen ritim arasındaki ilişki sirtuinlerin metabolik düzenlemede ne kadar etkili olduğunu gösteren ilgi çekici bir etkidir (69).

Sirtuin1'deki genetik varyasyonların çeşitli toplumlarda obezite ile ilişkili fenotipleri etkilediği saptanmıştır. Pima yerlilerinde SIRT1'deki varyasyonun obezite ve Tip 2 DM'e yatkınlığı ne kadar sağladığını anlamak için bir çalışma yapılmıştır. Bu denek çalışmasında SIRT1' in 4 farklı SNP bölgesi (rs7895833, rs10509291, rs7896005 ve rs4746720) üzerinde çalışılmış ve SNP etiketleri 350 Pima Hintlisinde Tip 2 DM ve BMI ile ilişkilendirilerek popülasyon temelli genotiplendirilmiştir. Yağ dokusu biopsilerinde SIRT1 ekspresyonu BMI ile negatif ilişki içinde olduğu saptanmıştır. SIRT1'deki varyasyonun azalmış akut insülin cevabı ve artmış Tip 2 DM

riski ile ilişkili olduğu sonucuna varılmış. Yağ dokusu SIRT 1 ekspresyonunun BMI ile ilişkili olduğu saptanmış, fakat bunun obezitenin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala bilinmemektedir (142).

Bizim çalışmamızda da obez olmayanlar (n=54) ve obez olanlar (n=26) SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Obez olan ve obez olmayanların SIRT1 rs7895833 gen ekspresyon düzeyleri ortalamaları T-test ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğunu gözlemlenmiştir ve SIRT1 ekspresyonunun BMI ile negatif ilişki içinde olduğunu saptanmıştır (p=0,01).

Sonuç olarak; SIRT1 rs7895833 ve Ngn3 rs4536103 SNP bölgeleri ekspresyonu ve polimorfizmi açısından Tip 2 DM diabetikler ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı, fakat her iki gen ekspresyonu ile BMI arasında negatif bir ilişki saptanmıştır. Yapılan fonksiyonel çalışmaların yanısıra SIRT1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonunun insülin direncini indüklemesi (72) ve Ngn3'ün pankreas öncülünden beta hücreye dönüşümünde önemli bir rol üstlenmektedir. Bu da gelecekteki yeni nesil farmasotiklerin Ngn3 ve SIRT1 ekspresyonunu etkileyen yolları hedef olarak kullanılacaklarını göstermektedir (143, 144).

5. KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2005; 28: 37- 42.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus Diabetes Care 2007; 30: 42-47.
3. İmamoğlu Ş, Özyardımcı EC. Diabetes Mellitus. İstanbul: Birmat Matbaacılık, 2009: 28-29.
4. Satman İ, Alagöl F, Ömer B, Kalaca S, Tütüncü Y, Çolak N ve ark. Diyabet Çalışma Grubu, Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II) Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı, 2010: 74.
5. Özata M. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi Yayıncılık, Euromat Entegre Matbaacılık, 2011: 539-540.
6. Champe PC, Harvey RA. Lippincot's Reviews Serisinden Biyokimya 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 1997: 213-222, 295-300.
7. Altan M, Yıldızoğlu-Arı N, Öztürk Y. İnsülin, Oral Hipoglisemik İlaçlar, Glukogon ve Somatostatin. Bökesoy TA, Çakıcı I, Melli M. Farmakoloji, Türk Farmakoloji Derneği, Ankara: Gazi Kitabevi, 2000: 369-370.
8. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. Diabetes Care 2007; 30: 42-47.
9. National Diabetes Fact Sheet: General Information and National Estimates on Diabetes in the United States, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta: Georgia, 2007: 4.
10. Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). Diabetes Care 2002; 25: 1551-1556.
11. Burant CF. Tip 2 Diyabetin Tedavisi. Amerikan Diyabet Cemiyet'i. Uzel B (çevirmen) s. 3-15, İstanbul: Sigma Publishing Danışmanlık ve Organizasyon, 2004: 3-15.

12. American Diabetes Associations. Diagnosis and classication of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004; 27: 5-10.
13. Bennett Peter H, Knowler WC. Joslin Diabetes Mellitus. Yumuk V (Çeviri Editörü), Tanyolaç S (Çeviren) s: 331-338, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2008.
14. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011; 34: 62-69.
15. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu 2009: 16.
16. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes. Diabetes Care 2003; 26: 5-20.
17. American Diabetes Association: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2010; 33: 62-69.
18. Champe PC, Harvey RA. Lippincot's Reviews Serisinden Biyokimya 2. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, 1997, 213-222, 295-300.
19. Altan M, Yıldızoğlu-Arı N, Öztürk Y. İnsülin, Oral Hipoglisemik İlaçlar, Glukogon ve Somatostatin. Bökesoy TA, Çakıcı I, Melli M. Farmakoloji. Türk Farmakoloji Derneği, Ankara: Gazi Kitabevi, 2000; 369-370.
20. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183–1197.
21. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2008; 3: 35-60.
22. Nagamine K, Peterson P, Scott HS. Positional cloning of the APECED gene. Nat Genet 1997; 17: 393–398.
23. Champe PC, Harvey RA. Lippincot's Reviews Serisinden Biyokimya 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 1997: 213-222, 295-300.

24. Altan M, Yıldızoğlu-Arı N, Öztürk Y. İnsülin, oral hipoglisemik ilaçlar, glukagon ve somatostatin. Bökesoy TA, Çakıcı I, Melli M. Farmakoloji. Türk Farmakoloji Derneği, Ankara: Gazi Kitabevi, 2000: 369-370.
25. Aslan M, İliçin G, Biberöđlu K, Süleymanlar G, Sözen T, Ünal S, Ayvaz G. İç Hastalıkları, Diabetes Mellitusta Tanı ve Sınıflandırma. 2. Baskı, Güneş Kitabevi, 2003; 2: 2279-2332.
26. Goldstein JB, Müller-Wieland D. Tip 2 Diyabet. Akman C (ed), Tip 2 Diyabet Etyopatogenezi. Martin Dunitz London and New York, 2004: 3-11.
27. Yenigün M. Her Yönüyle Diyabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 51-399.
28. Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, Luxon LM, Pembrey ME, Harding AE, Trembath RC. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. Lancet 1992; 340: 1376-1379.
29. Yılmaz C, Yılmaz MT, İmamoğlu S. Diabetes Mellitus. Türk Diyabet Yıllığı 2000: 17-27.
30. Metzger BE, Coustan DR. Proceedings of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1998; 21: 1-167.
31. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2007; 30: 42-47.
32. Hod M, Perri T, Bar J. Gestational diabetes-past, present and future. Recommendations of the Fourth International Workshop Conference on Gestational Diabetes Ching (1997) and the multinational multicenter study (NIH-HAPO Study) for solving the problem. Harefuah 2000; 138: 369-373.
33. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. N Engl J Med 2005; 352: 2477-2486.
34. O'Sullivan JB, Mahan CM, Charles D, Dandrow RV. Screening criterias for high risk gestational diabetic patients. Am Obstet Gynecol 1973; 116: 895-900.
35. Hudson TJ, Stein LD, Gerety SS. An STS-based map of the human genome. Science, 270: 1945-1954.

36. Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
37. Sealy Center for Molecular Science, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas 77555-1061. Department of Chemistry. California: Stanford University, Stanford, 2004: 4305-5080.
38. Maassen JA, Kadowaki T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia* 1996; 39: 375–382.
39. Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992; 1: 368–371.
40. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1998; 265: 2037–2048.
41. Mannsmann U, Herzig M. The use of SNP profiles as clinical markers. IMBI, University of Heidelberg. <http://www.biometrie.uni-heidelberg.de/~MannsmannUlrich/>
42. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000; 19: 623-629.
43. Denu JM. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD1-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 41–48.
44. Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 2007; 27: 149–162.
45. Wang RH. Impaired DNA damage response, genome instability and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 2008; 14: 312–323.
46. Oberdoerffer P. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 2008; 135: 907–918.
47. Vaquero A. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 2007; 450: 440–444.

48. Brunet A. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303: 2011–2015.
49. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009; 323: 1063–1066.
50. Luo J. Negative control of p53 by Sir2a promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107: 137–148.
51. Brunet A. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303: 2011–2015.
52. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13421–13426.
53. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007; 404: 1–13.
54. Yeung F. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; 23: 2369–2380.
55. Langley E. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 2002; 21: 2383–2396.
56. Kawahara TL. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- κ B dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 2009; 136: 62–74.
57. Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 303–309.
58. Prozorovski T. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nature Cell Biol* 2008; 10: 385–394.
59. Han MK. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in Mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 241–251.

60. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *Biol Chem* 2005; 280: 16456–16460.
61. Rodgers JT. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 2005; 434: 113–118.
62. Liu Y. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008; 456: 269–273.
63. Moynihan KA. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2005; 2: 105–117.
64. Bordone L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *Plos Biol* 2006; 4: e31.
65. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 2008; 582: 46–53.
66. Lee IH. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 3374–3379.
67. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martinez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 672–678.
68. Civitarese AE. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *Plos Med* 2007; 4: e76.
69. Nakahata Y. The NAD⁺ dependent deacetylase SIRT1 modulates clock mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 2008; 134: 329–340.
70. Banks AS. Sirt1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008; 8: 333–341.
71. Pfluger PT, Herranz D, Velasco Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 9793–9798.

72. Sun C. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 2007; 6: 307–319.
73. Weyrich P. SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention the TULIP Study. *BMC Med Genet* 2008; 9: 1186.
74. Lagouge M. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1a. *Cell* 2006; 127: 1109–1122.
75. Canto C. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458: 1056–1060.
76. Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci* 2009; 5: 147–152.
77. Li X. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007; 28: 91–106.
78. Potente M. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007; 21: 2644–2658.
79. Mattagajasingh I. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 14855–14860.
80. Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 2004; 305: 1010–1013.
81. Fainzilber M, Twiss JL. Tracking in the Wlds—the hunting of the SIRT and the luring of the Draper. *Neuron* 2006; 50: 819–821.
82. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. Sirtuin1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab* 2008; 8: 38–48.
83. Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr Drug Targets Immune Endocrin Metabol Disord* 2005; 5: 423–437.
84. Michael Rukstalis J and Joel Habener F. *ISLETS* 2009; 3: 177-184.

85. Walker MD, Edlund T, Boulet AM. Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes. *Nature* 1983; 306: 557-561.
86. Karlson O, Walker MD, Rutter WJ, Edlund T. Individual protein-binding domains of the insulin gene enhancer positively activate beta-cell-specific transcription. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 823-827.
87. Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet* 1985; 19: 463-484.
88. Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai M. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 1995; 9: 1009-1019.
89. Jensen J, Heler RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EF, Lindsell C, Weinmaster G, et al. Independent development of pancreatic alpha and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000; 49: 163-176.
90. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes* 1997; 11: 2323-2334.
91. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 1995; 268: 836-844.
92. Lee JE. NeuroD and neurogenesis. *Dev Neurosci* 1997; 19: 27-32.
93. Lee JE. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 13-20.
94. Ma Q, Kintner C, Anderson DJ. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 1996; 87: 43-52.
95. Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. Neurogenins, a novel family of atonal-related transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 1996: 8221-241.

96. Gradwohl G, Dierich, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1607-1611.
97. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 1997; 386: 399-402.
98. Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 1997; 11: 1662-1673.
99. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997; 387: 406-409.
100. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and redistinct from duct progenitors. *Development* 2002; 129: 2447-2457.
101. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, et al. Expression of neurogenin 3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000; 127: 3533-3542.
102. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling control pancreatic cell differentiation. *Nature* 1999; 400: 877-881.
103. Grapin-Boton A, Majithia AR, Melton DA. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* 2001; 15: 444-454.
104. Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, et al. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* 2002; 21: 6338-6347.
105. Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, Kaestner KH. Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 2002; 16: 1488-1497.

106. Jan YN, Jan LY. HLH proteins, fly neurogenesis and vertebra myogenesis. *Cell* 1993; 75: 827-830.
107. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophilla* hairy and enhancer of split. *Genes Dev* 1992; 6: 2620-2634.
108. Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi K, Kageyama R. Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neuronal differentiation in the central nervous system. *Embo J* 1994; 13: 1799-1805.
109. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, et al. Control of endodermal endocrine envelopment by HES-1. *Nat Genet* 2000; 24: 36-44.
110. Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, et al. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 2001; 50: 928-936.
111. Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keinomasu K, Osawa M, et al. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet* 2004; 36: 83-87.
112. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776.
113. Hald J, Hjorth JP, German MS, Madsen OD, Serup P, Jensen J. Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate andocrine development. *Dev Biol* 2003; 260: 426-437.
114. Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14920-14925.
115. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 2001; 15: 111-127.
116. Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 1996; 122: 439-447.

117. Zhang YQ, Mahima H, Kojima I. Changes in the expression of transcription factors in pancreatic AR42J cells during differentiation into insulin – producing cells. *Diabetes* 2001; 1: 10-14.
118. Maldonado TS, Kadison AS, Crisera CA, Grau JB, Alkasab SL, Longaker MT, et al. Ontogeny of activin B and follistatin in developing embryonic Mouse pancreas: implications for lineage selection. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 269-275.
119. Mathews Ls, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 1999; 65: 973-982.
120. Massague J. TGF – beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.
121. Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, et al. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 1866-1871.
122. Shiozak S, Tajima T, Zhang YQ, Furunkawa M, Nakazato Y, Kojima I. Impaired differentiation of endocrine and exocrine cells of the truncated type II activin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 1-11.
123. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Li S, et al. Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. *J Clin Invest* 1998; 102: 294-301.
124. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, et al. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase – secreting pancreatic AR42J cells into insulin – secreting cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 1647-1654.
125. Mashima H, Shibata H, Mine T, Kojima I. Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. *Endocrinology* 1996; 137: 3969-3976.
126. Ogihara T, Watada H, Kanno R, Ikeda F, Nomiyama T, Tanaka Y, et al. p38 MAPK is involved in activin A and hepatocyte growth factor – mediated expression of pro-endocrine gene neurogenin3, AR42J – B13 cells. *Biol Chem* 2003; 278: 21693-21700.

127. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, et al. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn-3*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4445-4454.
128. Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ. Regulation of the pancreatic islet specific gene *BETA2* (*neuro D*) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3292-3307.
129. Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol* 2004; 266: 178-189.
130. Smith SB, Watada H, Scheel DW, Mrejen C, German MS. Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem* 2000; 275: 36910-36919.
131. Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, German MS. Neurogenin 3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 2003; 278: 38254-38259.
132. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, et al. Mice lacking the home domain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 1998; 125: 2213-2221.
133. Watada H, Scheel DW, Leung J, German MS. Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 17130-17140.
134. Smith SB, Watada H, German MS. Neurogenin3 activates the islet differentiation program while repressing its own expression. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 142-149.
135. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neill JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7999-8004.
136. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993; 42: 1715-1720.

137. Hermans Y, Van De Casteele M, In't Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O, et al. Recapitulation of embryonic neuro endocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 2002; 159: 303-312.
138. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 2003; 9: 596-603.
139. Okada T, Tobe K, Hara K, Yasuda K, Kawaguchi Y, Ikegami H, et al. *Diabetologia* 2001; 44: 241-244.
140. Li J, Bergmann A, Reimann M, Schulze J, Bornstein SR, Schwarz PE. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 178-183.
141. Jensen JN, Hansen L, Ekstrom CT, Pociot F, Nerup J, Hansen T, Pedersen O. *Diabetologia* 2001; 44: 123-126.
142. Dong Y, Guo T, Traurig M, Mason CC, Kobes S, Perez J, et al. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 661-665.
143. Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 2007; 56: 2938-2945.
144. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N. The ectopic expression of Pax4 in the Mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 2009; 138: 449-462.

6. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adıyaman'ın Besni ilçesinde doğdum. İlköğretimi Bingöl Vali Kurtuluş Şişmantürk İlköğretim Okulu'nda okudum. Liseyi Bingöl Anadolu Lisesi'nde okudum. 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinde tıp eğitimine başladım. 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Bingöl Devlet Hastanesi Acil Servisinde göreve başladım. 2011 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında doktora eğitimine başladım ve ihtisasıma devam etmekteyim.