

T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TİP 2 DİABETES MELLİTUS HASTALARINDA
PPAR γ GENİNİN MLPA (MULTIPLEX LIGATION-
DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) YÖNTEMİ
İLE GENETİK ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

DR. KADRİ MURAT ERDOĞAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. FÜSUN DÜZCAN

DENİZLİ-2009

T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TİP 2 DİABETES MELLİTUS HASTALARINDA
PPAR γ GENİNİN MLPA (MULTIPLEX LIGATION-
DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) YÖNTEMİ
İLE GENETİK ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ

DR. KADRİ MURAT ERDOĞAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ.DR. FÜSUN DÜZCAN

DENİZLİ-2009

Doç. Dr. Füsün DÜZCAN danışmanlığında Dr. Kadri Murat ERDOĞAN tarafından yapılan "Tip 2 Diabetes Mellitus Hastalarında PPAR- γ Geninin MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) Yöntemi ile Genetik Analizi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Üye : Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞIFOĞLU

Üye : Doç. Dr. Füsün DÜZCAN

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

01/06/2009


Prof. Dr. Zafer AYBEK
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŐEKKÜR

BaŐta tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Füsün Düzcan olmak üzere eğitimin boyunca desteklerini veren Prof. Dr.Gülseren Bağcı ve Prof Dr. Hüseyin Bağcı'ya; eğitimimde emeği geçen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Hacettepe Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, tez çalışmam boyunca yardımlarından dolayı Dr. Emre Tepeli ve Doç. Dr. Semin Fenkçi'ye; hayatım boyunca her zaman varlıklarından onur duyduğum aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
DİABETES MELLİTUS.....	3
Diabetes Mellitus Tanımı.....	3
Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi.....	3
Diabetes Mellitus Tanısı.....	4
Diabetes Mellitus Sınıflaması.....	4
Etiyolojik Sınıflama.....	5
TİP 2 DİABETES MELİTUS.....	6
Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi.....	6
İnsülin Direnci.....	8
β Hücre Fonksiyon Bozukluğu	8
Tip 2 Diabetes Mellitus Etiyolojisi.....	9
Çevresel Faktörler.....	10
Genetik Faktörler.....	11
Aday Geni Yaklaşımı.....	12
Tüm Genom Taramaları Yaklaşımı.....	12
PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVASYONLU RESEPTÖR.....	13
PPAR Yapısı.....	13
PPAR Regülasyonu.....	16
Transkripsiyonal Regülasyon.....	16
Translasyon Sonrası Regülasyon.....	17
PPAR'ların Hedef Gen Ekspresyonunu Düzenleme Mekanizması.....	17

PPAR İzotipleri ve Fonksiyonu.....	17
PPARα.....	19
PPARβ/δ.....	19
PPARγ.....	20
PPARγ Fonksiyonu.....	20
PPAR γ izoformları.....	21
PPARγ Ligantları.....	21
PPARγ Gen Yapısı.....	21
PPARγ GENİ VARYANTLARININ TİP 2 DİYABET VE DİYABETLE BAĞLANTILI HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ.....	22
MLPA YÖNTEMİ.....	26
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
Gereçler.....	30
Kullanılan Gereçler.....	30
Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	31
Yöntem.....	31
Materyal Seçimi.....	31
FUJIFILM Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Cihazı Kullanarak DNA İzolasyonu.....	32
DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi.....	33
Salsa MLPA P224 PPARG Prob Kitinin Özellikleri....	35
Değerlendirme.....	40
BULGULAR.....	42
Olguların Demografik Özellikleri.....	42
Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları.....	44
TARTIŞMA.....	49
SONUÇLAR.....	65

ÖZET.....	66
YABANCI DİL ÖZETİ.....	68
KAYNAKLAR.....	70

TABLolar ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Tablo-1	Diabetes mellitus'un tanı kriterleri.....	4
Tablo-2	Glukoz Toleransının Sınıflaması (ADA 1997).....	5
Tablo-3	PPAR izoformlarının metabolik rolleri.....	18
Tablo-4	PPAR γ genetik varyantlarının fenotipik etkileri.....	24
Tablo-5	SALSA MLPA P224 PPAR γ probmiksinin özellikleri...	37
Tablo-6	P224'de 3p25 problemlerinin kromozomal lokasyona göre sıralanışı.....	38
Tablo-7	Olguların cinsiyetlerine göre yaş ve tanı anındaki yaşlarının ortalaması.....	42
Tablo-8	Olguların vücut kitle endeksine ve cinsiyete göre sınıflandırılması.....	43
Tablo-9	Akrabalarında tip 2 diyabet öyküsü olan olgu sayısı.....	44
Tablo-10	Normal bir olgunun doz oranı analiz görüntüsü.....	47
Tablo-11	Tip2 diyabetli bir olgunun doz oranı analiz görüntüsü....	48

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Şekil-1	β -hücre fonksiyonu ve insülin sensitivitesi arasındaki hiperbolik ilişki.....	7
Şekil-2	Tip 2 diyabette hiperglisemi ve dolaşımdaki artmış yağ asitlerinin patofizyolojisi.....	9
Şekil-3	PPAR yapısı.....	14
Şekil-4	DNA bağlayan bölgedeki çinko parmakların şematik gösterimi.....	14
Şekil-5	Transaktivasyon mekanizması.....	15
Şekil-6	Gen ekspresyon regülasyonu mekanizması ve PPAR izoformlarının fonksiyonları.....	18
Şekil-7	PPAR γ gen yapısı ve PPAR γ proteini izoformlarının şematik gösterimi.....	22
Şekil-8	PPAR γ proteini PPAR γ varyantlarının bölgeler üzerindeki dağılımı.....	23
Şekil-9	MLPA probunun yapısı.....	27
Şekil-10	MLPA yönetimde hibridizasyon, ligasyon ve PCR amplifikasyon basamaklarının şematik gösterimi.....	28
Şekil-11	ABI 310 yürütme koşulları.....	39
Şekil-12	Normal bir olgunun analiz görüntüsü.....	46
Şekil-13	Tip 2 diyabetli bir olgunun analiz görüntüsü.....	46

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

ABCA1	ATP binding cassette protein A1, ATP-bağlayan kaset protein A1
ABCC8	ATP Binding Cassette, Subfamily C Member 8, ATP Bağlayıcı Kaset, Subfamilya C, Üye 8
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
AF-1	Activation Fonksiyonu 1, 1. aktivasyon bölgesi
AF-2	Activation Fonksiyonu 2, 2. aktivasyon bölgesi
ARA70	Androgen Receptor Coactivator 70-KD, androjen reseptör koaktivatör 70-KD
aP2	adiposit P2
CAPN10	Calpain-10
CBP/300	CREB Binding Protein, CREB-bağlayan protein
CREB	cAMP Response Element binding Protein, CAMP cevap elemanı bağlayan protein
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DRIP	Vitamin D Receptor-Interacting Protein, D vitamini reseptörüyle etkileşen protein
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FABP4	Fatty Acid Binding Protein, yağ asidi bağlayan protein 4
FAM	N-(3- fluoranthyl) maleimide
FATP	Fatty Acid Transport Protein
GCK	Glukokinaz
HNF-1 α	Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, Hepatosit Nukleer Faktör-1 Alfa
HNF-4 α	Hepatocyte nuclear factor-4 alpha, Hepatosit Nukleer Faktör-4 Alfa
HAT	Histon asetil-transferaz
HDL	High density lipoprotein
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus, insüline bağımlı diyabet
IFN- γ	İnterferon- γ

IL-1	İnterlökin-1
IRS-1	İnsülin reseptör sübstrat 1
IRS-2	İnsülin reseptör sübstrat 2
KCNJ11	Potasyum Channel, ,Inwardly Rectifying, Subfamily J, Member 11, Hücre İçi Potasyum Kanalı Düzenleyici, Subfamilya J, Üye 11
KIR6.2	Potassium inward rectifier 6.2, hücre içi potasyum düzenleyici 6.2
LBB	Ligand bağlayan bölge
LDL	Low Density Lipoprotein, okzide düşük dansiteli lipoprotein
LPL	Lipoptotein lipaz
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MODY	Maturity Onset Diabetes ofthe Young 3, Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet 3
NCoR	Nukleer reseptör korepressör
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus, İnsüline bağımlı olmayan diyabet
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
PBP	PPAR Binding Protein, PPAR bağlayan protein
P/CAF	P300/CBP-Associated Faktör, P300/CBP-ilişkili faktör
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu
PPAR	Peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör
PPARγ	Peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör gama
PPARα	Peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör alfa
PPARβ/δ	Peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör beta/delta
PPP1R3	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3, protein fosfataz düzenleyici altünite 3
PPRE	PPAR Response Element, PPAR cevap elemanı
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments
RAR	Retinoik Asit Reseptör
RCAD	Renal Cysts And Diabetes
RIP140	Receptor-Interacting Protein 140, reseptörle etkileşen protein 140

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RXR	Retinoid X Reseptör, 9- <i>cis</i> retinoik asit
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1, steroid reseptör koaktivatör 1
SUR1	Sülfanilüre reseptör 1
TCF2	Transkripsiyon faktör 2
TCF7L2	Transkripsiyon faktör 7-like 2, transkripsiyon faktör 7-benzeri 2
TNFα	Tümör nekroze edici faktör alfada
TRAP	Tumor Necrosis Factor Related Activation Protein, tümör nekroz faktörü-ilişkili aktivasyon faktörü protein
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
UCP	Uncoupling Protein
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
WHO	World Health Organisation
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
15d-PGJ2	15d-Prostoglandin J2
9-HODE	9-Hidroksi Okta DekadiEnoik asit
13-HODE	13-Hidroksi Okta DekadiEnoik asit

GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) plazma glukoz oranının yüksek olduğu ve tüm dünyada 171 milyondan fazla insanı etkileyen metabolik bir hastalıktır. Tip 2 diyabet, DM olgularının %90'undan sorumlu olup, çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır (1,2). Tip 2 diyabet hem insülin sekresyonunun hem de kas, karaciğer gibi hedef dokulardaki insülin direncinin varlığıyla karakterizedir (3).

Tip 2 diyabet'e genetik olarak yatkınlığı olan birçok hastanın kilo almaya da yatkınlığı vardır. Ayrıca obezite de tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörüdür (4). Her ne kadar tip 2 diyabet ile ilişkili olan bazı aday genler tespit edilmiş olsa da, bulunan çoğu aday genin tip 2 diyabet ile ilişkisi yapılan farklı çalışmalarda gösterilememiştir (5).

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA); kısaca multipliks gen dozajı analizi yapabilen kolay bir yöntem olarak tanımlanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) temelli bu yöntem sayesinde, tek reaksiyonda yaklaşık olarak 45 gen bölgesi incelenebilmektedir. İncelenecek gen bölgelerine özgün olarak dizayn edilmiş probmikks kullanılarak, bu genlerde oluşmuş delesyon ve/veya amplifikasyonlar saptanabilir (6,7). Peroksizom proliferatör aktivasyonlu reseptör gama (PPAR γ) geni ve tip 2 diyabet arasındaki ilişkiyle ilgili olarak çok fazla sayıda çalışma vardır (8,9). Ancak MLPA yönteminin PPAR γ genindeki mutasyonları saptamadaki kullanılabilirliği bilinmemektedir.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'da gerçekleştirilen bu çalışmaya Üniversitemiz Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğinde, klinik ve biyokimyasal çalışmalarla tip 2 diyabet tanısı almış 150 olgu dahil edildi. Olguların periferik kanlarından elde edilen DNA örneklerinde, tip 2 diyabet hastalarına yönelik dizayn edilmiş "Salsa MLPA Probemix P224 PPARG" kitleri kullanılarak, PPAR γ_1 transkriptini kodlayan 8 ekzondaki delesyon ve/veya amplifikasyonların varlığı açısından incelendi.

Bu alışma ile tip 2 diyabet gelişiminde PPAR γ genindeki b \ddot{u} y \ddot{u} k delesyon ve/veya amplifikasyonların varlığı ve bu değişikliklerin MLPA y \ddot{u} ntemiyle saptanabilirliğinin araştırılması hedeflendi. Sonuçlar literat \ddot{u} rdeki PPAR γ ve diyabet ilişkisini açıklamış olan veriler eşliğinde tartışıldı. Ayrıca MLPA'da kullanılmak \ddot{u} zere ticari olarak hazırlanmış olan probmiks kitinin, PPAR γ genindeki mutasyonların saptanmasındaki yeterliliği irdelendi.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus Tanımı

Diabetes Mellitus, insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize, karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet, klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi belirtiler ile ortaya çıkar. Bununla birlikte retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlarla da seyredebilir (10). Hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları diyabetin tıbbi ve sosyoekonomik yükünü belirler. Diyabet bu özellikleri ile hastalarda belirgin psikososyal sorunlara da yol açmaktadır (2,10).

Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi

Tüm dünyada 2000 yılı ölçümlerine göre diyabetin 171 milyon insanı etkilediği, 2030 yılında ise 366 milyon kişiyi etkilemesi beklenmektedir (1). Diyabet sinsi seyirli bir hastalık olduğu için prevalansının saptanması da güçlük yaratmaktadır. Tüm toplumlarda görülebilmesine karşın diyabet prevalansı, etnik kökene bağlı olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Hindistan, Çin ve Amerika tüm dünyada diyabet prevalansının en yüksek saptandığı üç ülkedir (1,11). Gelişmekte olan ülkelerde yaşam süresinin 65 yaşından fazla olması sebebiyle diyabet prevalansı gün geçtikçe artmakta olup, obez beyaz erişkinlerin %4'ünde diyabet saptanırken, %21'inde bozulmuş glukoz toleransı görülmektedir (1,12).

1997-1998 yıllarında yapılan ‘‘Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması (TURDEP)’’na göre, ülkemizde 20-80 yaş grubunda tip 2 diyabet prevalansı %7,2 olarak saptanmıştır (13).

Diabetes Mellitus Tanısı

Amerikan Diyabet Birliği'ne (American Diabetes Association, ADA) göre; venöz plazmada arka arkaya yapılan en az iki ölçümde, açlık kan şekerinin 126 mg/dl veya üzerinde olması ile diyabet tanısı konur. Bununla birlikte günün herhangi bir saatinde, açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın ölçülen venöz plazma kan şekerinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması ve buna polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi semptomların eşlik etmesi de tanı koymak için yeterlidir (Tablo-1) (14).

Tablo-1. Diabetes mellitus'un tanı kriterleri

1. Diyabete özgü semptomlara ek olarak günün herhangi bir saatinde ölçülen plazma glukoz değerinin ≥ 200 mg/dl olması Diyabet semptomlarının varlığı; poliüri, polidipsi, açıklanamayan kilo kaybı
2. En az 8 saatlik tam açlık sonrası açlık plazma glukoz değerinin ≥ 126 mg/dl olması
3. Oral glukoz tolerans testi sırasında, bakılan 2. saat plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl olması

Açlık plazma glukoz düzeyi 110-126 mg/dl arasında olan hastalarda "Bozulmuş Açlık Glisemisi" tanımı söz konusudur ve bu hastalarda diyabet tanısı Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) yapılarak konulur. Testin 2. saatindeki kan şekerinin 200 mg/dl ve üzerinde olması ile diyabet tanısı konur (Tablo-2) (14).

Diabetes Mellitus Sınıflaması

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ=WHO, World Health Organisation), 1985 yılında diyabet hastalığını insüline bağımlı diyabet (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) ve insüline bağımlı olmayan diyabet (Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) olarak ayırmış ve klinik bir sınıflama yapmıştır. Ancak bu sınıflamanın genel uygulanabilirliğinde sınırlayıcı yönleri söz konusudur. Çünkü diyabet heterojen bir hastalıktır; IDDM ve NIDDM arasında ve kendi içlerinde etiyolojik ve fenotipik farklılıklar söz konusudur (10).

Tablo-2. Glukoz Toleransının Sınıflaması (ADA 1997)

Açlık Plazma Glukozu Normal <110 mg/dl Bozulmuş açlık glukozu \geq 110 mg/dl ve <126 mg/dl Diyabet \geq 126 mg/dl
OGTT sırasında 2. saat plazma glukozu Normal <140 mg/dl Bozulmuş glukoz toleransı \geq 140 ve <200 mg/dl Diyabet \geq 200 mg/dl

1997 yılında ADA etiyolojik bir sınıflama yaparak, IDDM ve NIDDM yerine de sırasıyla tip 1 ve tip 2 diyabet terminolojisini önermiştir (10,15).

Etiyolojik Sınıflama

Diabetes mellitus'un etiyolojik sınıflaması (ADA 1997)

I-Tip 1 Diyabet

- 1) İmmünolojik
- 2) İdiyopatik

II-Tip 2 Diyabet

III- Diğer Spesifik Tipler

- 1) Beta hücre fonksiyonunda genetik defekt
- 2) İnsülin etkisinde genetik defekt
- 3) Ekzokrin pankreas hastalıkları
- 4) Endokrinopati
- 5) Enfeksiyonlar
- 6) İmmün diyabetin bilinmeyen formları
- 7) İlaç ya da kimyasallara bağlı
- 8) Diyabetle bazen birlikteliği olan genetik sendromlar
- 9) Gestasyonel diyabet (10,15).

TIP 2 DİABETES MELLİTUS

Tip 2 diyabet tüm dünyadaki insidansı ve aynı zamanda neden olduğu akut ve kronik komplikasyonlardan dolayı günümüzde hala en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. Tip 2 diyabet genel olarak orta yaş grubu ve yaşlılarda görülen, çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır (1,2). Bununla birlikte tip 2 diyabetin genç erişkin ve adolesan yaş gruplarında da görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (2).

Tip 2 diyabetliler, tüm diyabetiklerin ortalama olarak %90'ını oluşturmaktadır. Bununla birlikte tip 2 diyabet prevalansı etnik gruplara göre farklılıklar göstermekte olup Çin toplumunda %2 olan prevalans, Pima Kızılderililerinde %50'ye kadar artabilmektedir (1). Klinik olarak asemptomatik bir dönem çoğunlukla mevcut olup, şikayetler genellikle 45 yaş civarında başlar. İlk tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar çoğu zaman mevcuttur (10).

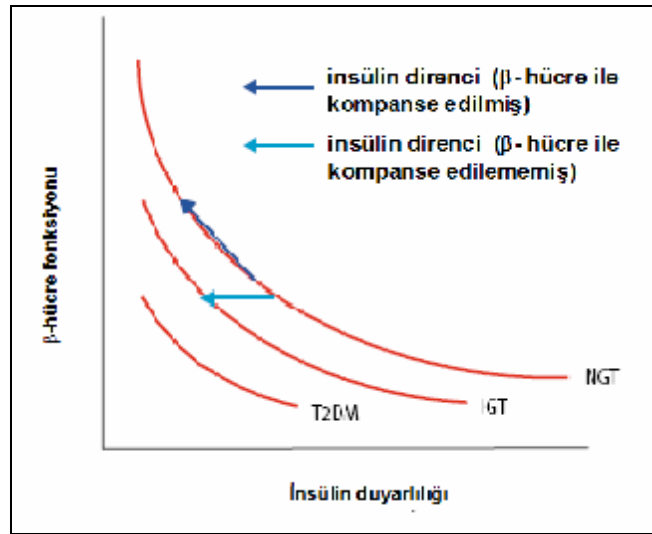
Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi

Normal glukoz metabolizması insülin duyarlılığı ve insülin salınımının dengeli ve dinamik etkileşimi sayesinde korunmaktadır. Tip 2 diyabet patogenezinde iki temel metabolik bozukluk rol almaktadır. Bunlar; beta hücre fonksiyon bozukluğu ve insülin direncidir (5).

Tip 2 diyabette, primer patolojinin beta hücre fonksiyon bozukluğu veya insülin direnci olmasında değişik faktörlerin etkili olduğu ve bunlardan bir kısmının yaş, etnik köken, obezite olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu faktörler daha çok insülin direnci üzerinden etkilidir. İnsülin salınımını etkileyen faktörler ise fazla bilinmemektedir. Hem insülin direnci hem de bozulmuş insülin sekresyonu tip 2 diyabetin patogenezinde genetik olarak kontrol edilen faktörlerdir. Bunlardan hangisinin primer ağırlıkta rol oynadığı ise henüz açık değildir, ancak insülin direncinin daha ön planda yer aldığı düşünülmektedir (16). Aile öyküsü birçok hastada olmasına rağmen hastalık henüz tek bir genetik zemine oturtulamamıştır (5).

Tip 2 diyabetten sorumlu hücrel ve moleküler mekanizmayı anlamak için gliseminin kontrol edildiği sistemi kavramak gerekir. İnsülin, kan şekeri regülasyonunda anahtar rol oynayan hormondur ve normoglisemi genellikle insülin duyarlılığı ve insülin sekresyonunun birbirleriyle olan dengeli etkileşimiyle korunur. Normal pankreatik β -hüresi, insülin duyarlılığındaki değişikliklere adapte olabilir. Örneğin insülin duyarlılığının azalması halinde insülin sekresyonu artar. Şekil-1’de normal β -hücre fonksiyonu ve insülin duyarlılığı arasındaki eğrisel ilişki gösterilmektedir. Bozulmuş glukoz toleransı olan ve tip 2 diyabetli hastalarda bu eğriden sapma gözlenir. Yani insülin direnci durumunda, pankreatik β -hücreleri insülin sekresyonunu arttıramaz. Böylelikle β -hücre fonksiyon bozukluğu da tip 2 diyabet patojenezinde kritik rol oynamaktadır (5).

Tip 2 diyabetli hastaların çoğunda, plazma kan glukoz seviyesine göre insülin salınımında rölatif düşüklük vardır. Tip 2 diyabete de tip 1 diyabetteki kadar olmasa da ilerleyici β hücre harabiyeti eşlik etmektedir (16).



Şekil-1: β -hücre fonksiyonu ve insülin sensitivitesi arasındaki hiperbolik ilişki

Normal glukoz toleranslı (NGT) kişilerde β -hücre fonksiyonu ve insülin duyarlılığı arasında hiperbolik benzeri bir ilişki bulunur. Bozulmuş glukoz toleransı (Impaired Glucose Tolerance, IGT) ve tip 2 diyabetli (T2DM) hastalardaysa bu hiperbolden sapma olur. Stumvoll M. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (5).

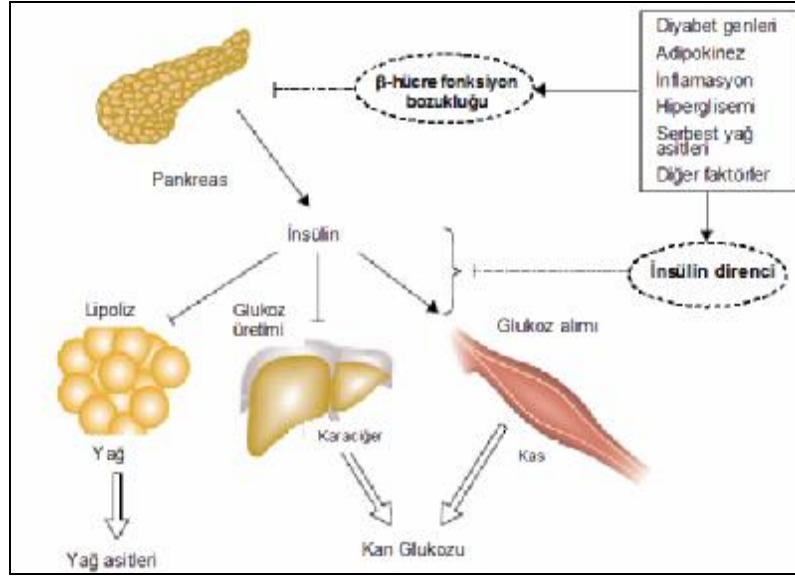
İnsülin Direnci

İnsülin direnci, belli bir konsantrasyondaki insüline normalin altında bir biyolojik yanıt alınmasıdır. Glukoz homeostazını sağlamada insülinin etkisi bozulmuştur ve insüline verilen yanıtta azalma söz konusudur (5,17). Metabolik açıdan insülin direnci, insülinin hücre düzeyindeki metabolik olaylara etkisinin azalması veya hücrenin insüline karşı normal duyarlılığının azalması olarak tanımlanır. Normal şartlarda insülin, karaciğerde glikoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek, hepatik glukoz üretimini baskılar. Ayrıca glukozu kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşır ve bu dokularda glikojenin depolanmasını ya da enerji üretmek üzere okside olmasını sağlar. İnsülin direncinde ise; insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki bu etkilerine karşı direnç oluşur. Tip 2 diyabet ve bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda endojen glukoz üretimi hızlanmıştır (18,19). Bu artma hiperinsülinemi durumunda olduğu için, tip 2 diyabetin en azından erken ya da ara hastalık evrelerinde, hepatik insülin direnci nedeniyle hiperglisemi olmaktadır (Şekil-2) (5).

β Hücre Fonksiyon Bozukluğu

Tip 2 diyabetli hastalarda çeşitli insülin sekresyon anomalileri görülmektedir. Bazal insülin konsantrasyonları özellikle obez hiperglisemik hastalarda, normal değerlere göre kabaca iki kat artabilir. Ancak bu, muhtemelen artmış hiperglisemi nedeniyledir. Benzer şekilde tip 2 diyabetli hastalarda yemek sonrası plazma insülin konsantrasyonları, artmış plazma glukoz değerleri yüzünden, normalden yüksek olur. Gerçekte ise tip 2 diyabetli hastalarda, diyabet olmayan kişilere göre insülin sekresyonu belirgin olarak azalmıştır (20). Yüksek kan glukoz düzeyinin, pankreas β hücresi üzerinde toksik etkisi olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte ciddi hiperglisemi gelişmesinden önce, bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu olan bireylerde insülin salınım defektleri gösterilmiştir (21). Ayrıca tip 2 diyabet olan ebeveynlerin normoglisemik çocuklarında ve diyabet olan hastaların normoglisemik ikizlerinde bile insülin sekresyon defekti gösterilmiştir. Bu nedenlerle tip 2 diyabette insülin sekresyon defektinin genetik bir nedenle gelişebileceği

düşünülmektedir (22). Obezitenin, akut hastalığın ya da yaşlanmanın, genetik olarak yatkınlığı olan bireylerde ilerlemiş diyabete neden olabileceği ileri sürülmektedir (20).



Şekil-2: Tip 2 diyabette hiperglisemi ve dolaşımdaki artmış yağ asitlerinin patofizyolojisi

Pankreastan insülin sekresyonu, normalde karaciğerden glukoz çıkışını ve yağ dokusundan yağ asidi salınımını azaltır. Tip 2 diyabet patogenezinde katkıda bulunduğu gösterilmiş çeşitli faktörler, hem insülin sekresyonunu hem de insülin duyarlılığını etkiler. Azalmış insülin sekresyonu sonucu hedef dokulardaki insülin sinyal iletimi azalır. Hedef organlardaki insülin direnci nedeniyle, hiperglisemi ve dolaşımdaki yağ asitleri miktarında yükselme olur. Hiperglisemi ve artmış yağ asitleri ise insülin sekresyonunu azaltıp, insülin direncini de artırarak mevcut durumu daha da kötüleştirir. Stumvoll M. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (5).

Tip 2 Diabetes Mellitus Etiyolojisi

Tip 2 diyabet, etiolojisinde birçok genin ve çevresel faktörün olduğu, multifaktöriyel kalıtım özelliği gösteren bir hastalıktır. Bu hastalıkta birden fazla genin poligenik olarak birbirleriyle ve hastalık sürecini tetikleyen, hızlandıran çeşitli çevresel faktörlerle etkileşimini içeren karmaşık bir süreç söz konusudur (23). Etiyolojisinde yer alan faktörler 2 gruba ayrılarak açıklanmıştır.

A) Çevresel Faktörler:

Çevresel faktörler arasında etnik köken, cinsiyet, kentsel yaşam, fiziksel aktivite ve obezite yer almaktadır. Örneğin, etnik kökenin diğer faktörlere ek olarak tip 2 diyabet gelişim prevalansını arttırılabileceğini gösteren çalışmalar vardır (24). Yine cinsiyetin tip 2 diyabet gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tip 2 diyabet sıklığının; Afrika'lı popülasyonda kadınlarda, Meksika'lı popülasyonda ise erkeklerde daha yüksek olduğu bulunmuştur (25,26). Diyabetin farklı coğrafyalarda kırsal ve kentsel yerleşimle ilişkisine bakıldığında; çoğu zaman kentsel yerleşimin kırsal yerleşime göre prevalansı arttırdığı gözlenmiş olup, diğer bazı çalışmalarda ise böyle bir ilişki kurulamamıştır (24,27). Brezilya'da yaşayan Japonlarda, Japonya'da yaşayanlara göre tip 2 diyabet prevalansının daha yüksek olması, coğrafik değişikliğin tip 2 diyabet gelişiminde rolü olduğu görüşünü desteklemektedir (28). Benzer şekilde Hawaii ve Los Angeles'ta yaşayan Japonlarda, yerli Japonlara göre tip 2 diyabet prevalansı daha yüksektir (29). Bu saptamalar, çevresel faktör olarak coğrafyanın da tip 2 diyabet etiolojisinde etkili olabileceğini göstermektedir. Kırsal ve kentsel bölgelerde diyabet prevalansının farklı olması iki sebebe bağlanmıştır. Birincisi; kentsel bölgede yaşayan kişilerin ekonomik durumlarına bağlı olarak beslenme alışkanlıklarının kırsal kesime göre hazır gıda tüketimi ağırlıklı olması, diğeri ise kırsal kesimde yaşayanların fiziksel aktivitelerinin daha fazla olması şeklinde yorumlanmıştır (30). Düzenli fiziksel aktivitenin insülin duyarlılığı ve glukoz toleransını arttırıcı etkisi olduğu, tip 2 diyabet gelişimini ise azalttığı gösterilmiştir (31,32). Amerika'da yaşayan Afrika kökenli popülasyonda yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabet prevalansının sedanter yaşam ve obeziteyle arttığı gösterilmiştir (30). Tip 2 diyabete genetik yatkınlığı olan birçok hastanın kilo almaya da yatkınlığı olduğu bilinmektedir. Ayrıca obezite de tip 2 diyabet için büyük bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (4). Diyabet hastası olan 3299 olgu üzerinde yapılan bir çalışmada, diyabetik kadınların %57,7'si obez ve %30,2'si ise kilolu bulunmuştur (33). Yüksek Vücut kitle indeksi (VKİ), birçok etnik grupta tip 2 diyabet gelişim riskini direkt olarak arttırmaktadır (30). Subkutan yağdan ziyade abdominal yağ miktarı diyabet gelişiminde önemlidir (34).

Diyetin tip 2 diyabet gelişiminde etiyolojik faktör olarak yerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, Meksikalı'larda yüksek yağlı, düşük karbohidrat ve lifli besin tüketiminin, diyabet prevalansını arttırdığı gösterilmiştir (26).

Fazla ve uzamış stresin, glukoz tolerans bozukluğuna (glukoz intolerance) neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek ve uzamış stres sonrası adrenal hormonların (özellikle glukokortikoid hormon) aktivasyonu söz konusudur. Bu hormonların aktivasyonunun artması ile glukoz tolerans bozukluğu oluşmaktadır. Bundan dolayı stresin diyabet gelişimindeki rolünün, bu hormonların aktivasyonu üzerinden olabileceği düşünülmüştür (35).

B) Genetik Faktörler:

Ailesinde tip 2 diyabet öyküsü olan bir bireyde tip 2 diyabet gelişme riski, aile öyküsüne sahip olmayan bireye göre 2.4 kat daha yüksektir (5). Birinci derece akrabasında tip 2 diyabet bulunan kişilerin %15-25'inde bozulmuş glukoz toleransı ya da diyabet gelişir. Anne ya da babası tip 2 diyabet olan, seksen yaşına kadar yaşamış bir bireyde, tip 2 diyabet gelişme riski %38 olarak hesaplanmıştır (36). Her iki ebeveyni de etkilenmiş bir bireyde ise, altmış yaşında tip 2 diyabet gelişme prevalansı %60 olarak bulunmuştur (37). Monozigotik ikizlerin dizigotik ikizlere göre gen paylaşımlarının daha fazla olması nedeniyle, diyabet için genetik ve çevresel faktörler açısından konkordans hızı hesaplamasında monozigotik ikizler tercih edilir. Altmış yaşından daha yaşlı bireylerde, diyabet için monozigotik ikizlerdeki konkordans hızı %35-58 iken, dizigotik ikizlerde %17-20'dir (38,39). Bozulmuş glukoz toleransı içinse, monozigotik ikizlerde konkordans ileri derecede artarak %88'lere ulaşır (40).

Genel olarak bir hastalıktaki genetik faktörleri araştırmak için, aday gen yaklaşımı ve tüm genom taraması olmak üzere iki metod kullanılır. Aday gen yaklaşımıyla hastalığın ortaya çıkmasından sorumlu olası genler araştırılır. Bu amaçla birbirinden bağımsız kişilerde, bir allel ile bir fenotip arasındaki ilişki araştırılır. Tüm genom taraması ya da bağlantı (linkaj) yaklaşımında ise varsayım

dayanılmaz. Bu yaklaşım ortak bir fenotipi paylaşan aile bireylerinin aynı geni içeren kromozomal bölgeleri paylaşma esasına dayanır ve böylelikle genler genomik pozisyonlarına göre lokalize edilir (5).

1-Aday Gen Yaklaşımı

İnsülin direncinde, çok fazla sayıda aday gen için farklı mutasyonlar ve polimorfizmler tanımlanmıştır. Ancak çoğunun insülin direncinde önemli bir rolü olduğu gösterilememiş ve hiçbir mutasyon tip 2 diyabetli olguların tamamında patogenezi açıklamakta tek başına yeterli bulunamamıştır. Son 20 yıldır insülin reseptör sübstrat 1 (IRS-1) geninde Gly972Arg polimorfizmi, insülin reseptör sübstrat 2 (IRS-2) geninde Gly1057Asp polimorfizmi, β 3 adrenerjik reseptörde Trp64Arg polimorfizmi, tümör nekroze edici faktör alfa'da (TNF α) -308 G/A promotör varyantı ya da adiponektin geni varyantı gibi birçok aday gen varyantlarının tip 2 diyabet ile ilişkisi araştırılmıştır (5,41,42). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda tip 2 diyabet gelişimine neden olan gen varyantlarının tek başlarına etkilerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca nedenden başlayıp hastalığın oluşmasına kadar geçen süreçte, araştırma grubunun izlendiği ve etiyolojide araştırılan faktörün normal topluma göre risk faktörü oluşturup oluşturmadığına karar verilmesini sağlayan, bağımsız kohort çalışmalarla da bu bulguların desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (23). PPAR γ 'nın P12A varyantı ve Hücre İçi Potasyum Kanalı Düzenleyici, Subfamilya J, Üye 11 (Potasyum Channel Inwardly Rectifying, Subfamily J, Member 11-KCNJ11) geni ürünü hücre içi potasyum düzenleyici 6.2'nin (Potassium inward rectifier 6.2, KIR6.2) E23K varyantı, son yıllara kadar tip 2 diyabetle ilişkilendirilen en kuvvetli aday genler olarak değerlendirilmiştir (43,44). Ancak aday gen yaklaşımıyla saptanan bu genlerin birçoğu ile daha sonra yapılan başka çalışmalarda aynı ilişki gösterilememiştir (23).

2-Tüm Genom Taramaları Yaklaşımı

Çeşitli araştırmalarda tip 2 diyabetle ilişkili bazı genomik bölgeler belirlenmiştir (1q21-24,1q31-q42, 9q21, 10q23, 11p15, 11q13-14, 12q12, 19q13 ve

20q11-q13) (45). Ancak günümüze kadar tüm genom taramaları çalışmalarından elde edilen verilerin ve bulunan sonuçların gerçekte buz dağımının sadece görünen kısmı olduğu düşünülmektedir (23).

NIDDM1 (Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1) bölgesinde bulunan Calpain-10 (CAPN10) geni diyabetle ilişkili olarak bu şekilde klonlanmış ilk genidir (46,47). CAPN10 genetik varyantlarının insülin duyarlılığını veya insülin salınımını ya da her ikisinin birbiriyle ilişkisini etkiliyor olabileceği düşünülmektedir (48-50). Tüm genom taramaları sonucunda saptanan transkripsiyon faktör 7-benzeri 2 (Transkripsiyon faktör 7-like 2, TCF7L2) geni, tip 2 diyabet gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen en kuvvetli yatkınlık genlerindedir (51-53).

PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVASYONLU RESEPTÖR (PPAR)

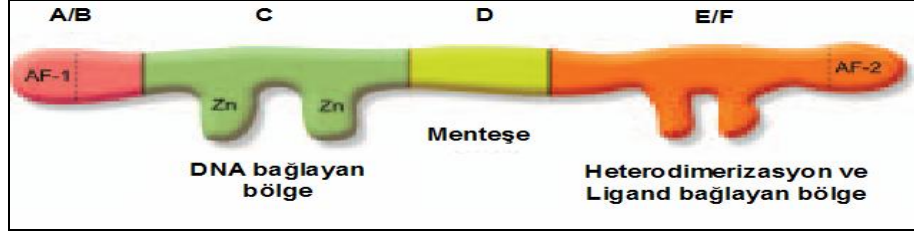
PPAR' ler nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Nükleer reseptörler, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Bu hedef genler hücre bölünmesi, organogenez, homeostaz gibi işlevlerin içinde yer almaktadırlar (54). Nükleer reseptör ailesi, vitamin D reseptörleri, tiroid hormon reseptörleri, retinoid reseptörleri, steroid reseptörler ve endojen ligandı bilinmeyen çeşitli reseptörleri içerirler. Özgün ligandların bağlanmasıyla ekstraselüler sinyallere hücrenin yanıt oluşturmalarını sağlarlar (55).

PPAR Yapısı

Yapısal olarak incelendiğinde PPAR'lerin, korunmuş fonksiyonel bölgeleri olduğu saptanmıştır (Şekil-3) (55).

A/B bölgesi içinde yer alan 1. aktivasyon fonksiyonu bölgesinin (Activation Function 1, AF-1) ligandan bağımsız bir transaktivasyon fonksiyonu vardır. A/B bölgesi değişken dizilere ve uzunluklara sahiptir (56). Bununla birlikte bu bölgede

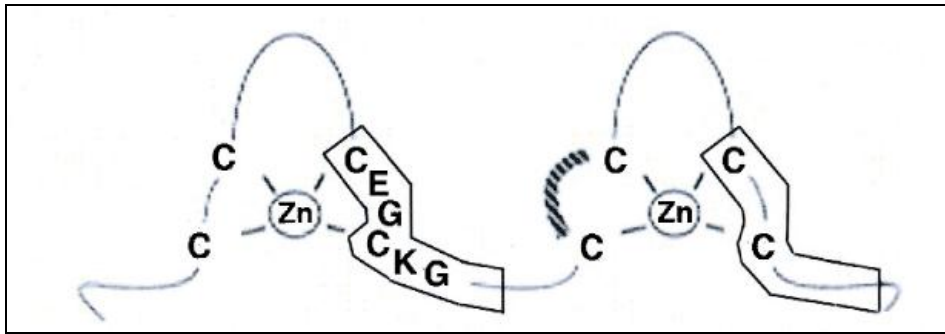
birden fazla kesip-ekleme (splicing) varyantlarının bulunması aynı nükleer reseptörlerin farklı izoformlarının oluşmasına neden olmaktadır (57).



Şekil-3: PPAR yapısı

A/B: Transaktivasyon ve fosforilasyon bölgesi, C: İki çinko parmak yapısıyla DNA bağlayan bölge, D: Mentеше bölgesi, E/F: Ligand bağlayan bölge, AF-1: 1. aktivasyon fonksiyonu bölgesi, AF-2: 2. aktivasyon fonksiyonu bölgesi. Friedmann PS. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (55).

DNA bağlayan bölge (C bölgesi), nükleer reseptörlerin içindeki en fazla korunmuş bölgedir ve iki çinko parmak oluşturacak şekilde katlantıları vardır (55). Birinci çinko katlantısı içinde, DNA majör oyuk üzerindeki dizilerle spesifik olarak eşleşebilen P-kutusu bulunmaktadır (Şekil-4) (56). PPAR P-kutusunun primer dizisi (CEGCKG) bütün PPAR proteinlerinde aynı olup, hedef genin promotor bölgesinde, PPAR cevap elemanına (PPAR Response Element, PPRE) bağlanmasından sorumludur (57). P-kutusu üzerindeki mutasyonlar transkripsiyonu durdurabilir. PPAR nükleer reseptör ailesinin başka bir üyesi olan 9-*cis* retinoik asit reseptör (RXR) ile heterodimer oluşturmakta ve bu heterodimer DNA üzerindeki PPRE'ye bağlanmaktadır. Promotor bölgesi üzerindeki PPRE, iki kopya AGGTCA dizisi motifinden oluşmakta ve bu iki kopya dizi bir nükleotidle ayrılmaktadır. Bu diziler



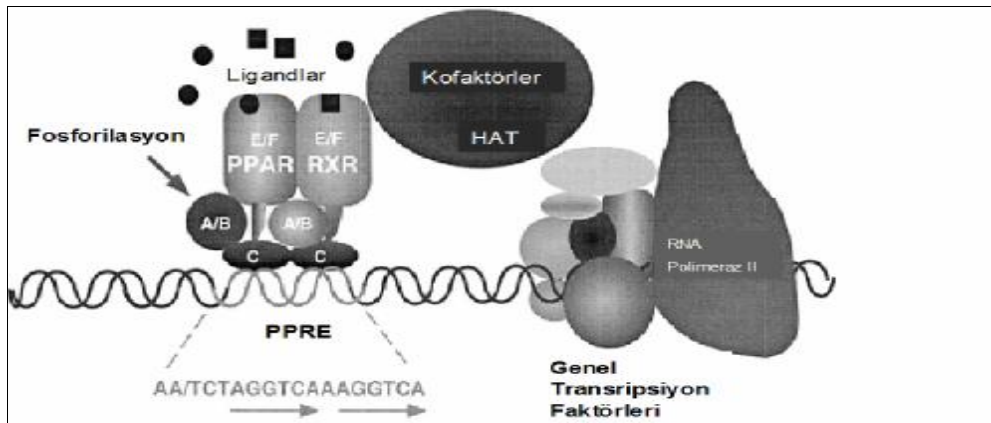
Şekil-4: DNA bağlayan bölgedeki çinko parmakların şematik gösterimi

Escher P. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (56).

DR-1 olarak da adlandırılmaktadır. PPRE'de iki kopya dizisi arasında Adenin nükleotidi olması ve 5' ucunda AA/TCT dizisi bulunması halinde, PPAR/RXR heterodimerinin bağlanma afinitesi artmaktadır. PPAR 5' ucundaki AGGTCA dizisine bağlanırken, RXR 3' ucundaki AGGTCA dizisine bağlanmaktadır (56).

DNA bağlayan bölgedeki 2. çinko parmağında, 2 sistin rezidüsü arasındaki bölgede D-kutusu bulunmaktadır. PPAR D kutusu heterodimer oluşumu ve PPRE'deki 2 kopya dizi arasındaki boşluğun tanınmasından sorumludur. PPAR D-kutusunun diğer 5 aminoasit içeren nükleer reseptörlerden farklı olarak 3 aminoasit bulundurmasının, PPAR/RXR heterodimer kompleksinin DR-1 üzerindeki özgün yerleşiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Şekil-5) (56).

Ligand bağlayan bölge (LBB-E/F bölgesi) 12 alfa heliksi içermektedir ve hidrofobik ligand bağlama cebi oluşturmaktadır. Ayrıca LBB, ısı şok proteini ve RXR ile heterodimer oluşturmadan da sorumludur. LBB içindeki 2. aktivasyon fonksiyonu bölgesinin (Activation Function 2, AF-2) transkripsiyon aktivasyon fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonu gösterebilmesi için ligand bağlanmasına ihtiyaç duyar (55).



Şekil-5: Transaktivasyon mekanizması

PPAR/RXR heterodimeri C bölgesiyle (DNA bağlayan bölge) hedef genin promotöründeki PPRE'ye bağlanır. Reseptörün aktivitesi hem A/B bölgesinin fosforilasyonu hem de E/F bölgesine ligandın bağlanmasıyla düzenlenir. Aktive PPAR/RXR heterodimeri histon asetil-transferaz aktivitesi (HAT) olan kofaktörlerle ve genel transkripsiyon faktörleriyle etkileşir. Escher P. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (56).

PPAR Regülasyonu

a)Transkripsiyonal Regülasyon:

Ligandın bağlanmasıyla özellikle AF-2'de konformasyonel bir değişiklik gerçekleşir ve AF-2, LBB'ye doğru katlanarak, 3. ve 4. helikslerle birlikte hidrofobik bir yarık oluşmasına neden olur. Bu hidrofobik yarık, steroid reseptör koaktivatör 1'le (Steroid Receptor Coactivator 1, SRC-1) etkileşen bölgedir. SRC-1'in intrinsik histon asetiltransferaz aktivitesi vardır. SRC-1, E/F bölgesi dışında A/B bölgesiyle de etkileşir. SRC-1, başka bir koaktivatör olan CREB (cAMP Response Element Binding Protein, cAMP cevap elemanı bağlayan protein)-bağlayan proteinle de (CREB Binding Protein, CBP/300) etkileşir. CBP/300'ün de histon asetiltransferaz aktivitesi bulunmaktadır ve aynı aktivitesi olan P300/CBP-ilişkili faktör (P300/CBP-Associated Factor, P/CAF) ile etkileşmektedir. CBP/300 hem A/B bölgesi hem de E/F bölgesiyle etkileşir (56). Histon asetiltransferazların etkisiyle kromatin gevşer ve transkripsiyona uygun hale gelir (58).

PPAR'lere bağlandığı gösterilmiş diğer koaktivatörler, reseptörle etkileşen protein 140 (Receptor-Interacting Protein 140, RIP140), androjen reseptör koaktivatör 70-KD (Androgen Receptor Coactivator 70-KD, ARA70), D vitamini reseptörüyle etkileşen protein / tümör nekroz faktörü-ilişkili aktivasyon faktörü proteini ailesi üyeleri (Vitamin D Receptor-Interacting Protein / Tumor Necrosis Factor Related Activation Protein, DRIP / TRAP), PPAR'le etkileşen protein, PPAR γ koaktivatör-1, PPAR bağlayan proteindir (PPAR Binding Protein, PBP) (57). Ligandın bağlanmasıyla oluşan konformasyonel değişiklik histon deasetilaz aktivitesi olan korepresörün (Nükleer reseptör korepresör-NCoR) salınımına da sebep olmaktadır (56,58).

Bu koaktivatör ve korepresörlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi ve dokulardaki konsantrasyonları, PPAR izotiplerinin transkripsiyon regülasyonundaki özgünlüğünü de sağlamaktadır (57).

b) Translasyon Sonrası Regülasyon

PPAR aktivitesi ayrıca translasyon sonrası gerçekleştirilen fosforilasyon, nitro grubunun eklenmesi (nitrasyon), ubiquitinasyonla da düzenlenmektedir. PPAR γ ve PPAR α 'da fosforilasyonun gerçekleştiği aminoasit ve bunun için kullanılan kinaz kaskadına göre proteinin transkripsiyon aktivitesi değişmektedir. PPAR γ 'nın tirozin rezidülerinden nitratlanması proteinin sitoplazmadan nükleusa transferini inhibe ederek, transkripsiyonun azalmasına neden olmaktadır. Ligandın PPAR γ 'ya bağlanması, reseptörün ubiquitinasyonunu arttırarak reseptörün yıkımına neden olurken PPAR α 'da ise ubiquitinasyonu azaltır (57).

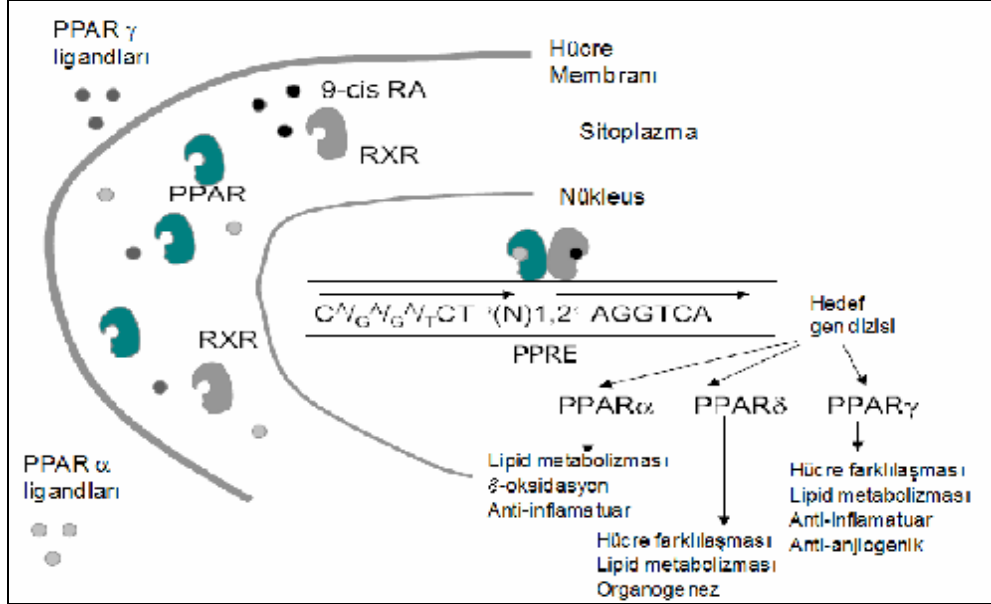
PPAR'lerin Hedef Gen Ekspresyonunu Düzenleme Mekanizması

Liganda bağlanınca, PPAR özgün yapısal değişikliğe uğrar ve başka bir transkripsiyon faktörü olan retinoid X reseptör / retinoik asit reseptöre (RXR/RAR) bağlanır. PPAR'ler daha sonra bir veya daha fazla koaktivatör proteinle etkileşir. Heterodimerik kompleksin oluşması gerçekleştikten sonra, kompleks nükleus içine transfer olarak hedef genin promotor bölgesinde lokalize olan PPRE'e bağlanır. RNA polimeraz II ve başka transkripsiyon faktörlerinin de gelmesiyle hedef genin transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil-6) (56,57,59). Ayrıca PPAR'lerin diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek transkripsiyonu baskılama özelliği de vardır (60).

PPAR İzotipleri ve Fonksiyonu

PPAR'ler insandaki diğer transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi gen ekspresyonunun regülasyonundan sorumludur. PPAR için endojen ligand görevi yapan birçok yağ asidi vardır. α , β/δ , γ olmak üzere bilinen 3 tane PPAR izoformu izole edilmiş olup, farklı genlerden eksprese olarak, çeşitli dokularda dağılmışlardır. PPAR izoformları dokularda farklı olarak eksprese olur ve organogenez dönemine

göre dağılım paterni değişir (57). Tablo-3'de bu izoformların metabolik rolleri özetlenmiştir (61).



şekil-6: Gen ekspresyon regülasyonu mekanizması ve PPAR izoformlarının fonksiyonları

RXR: Retinoid X Reseptör, 9-cis RA: 9-cis retinoik asid. Kiec-Wilk B. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (59).

Tablo-3: PPAR izoformlarının metabolik rolleri

	PPARα	PPARγ	PPAR β
Ekspresyon bölgeleri	Karaciğer, böbrek, kalp	Adipoz doku, makrofaj	Adipoz doku, deri, beyin gibi birçok dokuda
Aktive edilen hüresel olaylar	Yağ asidi β oksidasyon, lipoprotein sentezi, aminoasit katabolizması	Adiposit farklılaşması, trigliserid sentezi	Yağ asidi β oksidasyonu
Fizyolojik Fonksiyon	Açlıkta metabolik cevabın düzenlenmesi	Adiposit farklılaşması, yağ asidi depoma	Kas lifi tipi belirlemesi?
Hedef gen Örnekleri	Karnitin palmitoil transferaz I, HMG COA sentaz 2, apoA-1	Yağ asidi-bağlayan protein 4, lipoprotein lipaz, adiponektin	Açıl-KoA oksidaz, karnitin palmitoil transferaz I

Semple RK. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (61).

a) PPAR α

PPAR α özellikle karaciğer, kalp, böbrek, iskelet kası, ince barsak ve pankreas olmak üzere birçok dokuda düşük seviyede eksprese olur (62).

PPAR α serbest yağ asidi oksidasyonunu, lipoprotein seviyesini ve inflamasyonu düzenleyen yaklaşık 100 genin ekspresyon kontrolünde görev almaktadır. Yüksek dansiteli lipoproteindeki (High Density Lipoprotein, HDL) Apolipoprotein A1 ve trigliserid metabolizmasındaki anahtar enzim olan lipoprotein lipaz (LPL) oluşumunu indükler. LPL'in endojen inhibitörü olan apoCIII oluşumunu ise baskılar. Bu şekilde PPAR α agonisti fibratlar trigliserit yüksekliği ve düşük HDL seviyesi tedavisinde kullanılmaktadır. PPAR α 'nın ayrıca interlökin 6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve sitokinle indüklenmiş endotel adezyon moleküllerinin (örneğin Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM1) oluşumunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiği düşünülmektedir (62).

b) PPAR β/δ

PPAR β/δ 'nin birçok dokuda eksprese olması nedeniyle membran lipid metabolizması gibi temel hücresel fonksiyonlarda yer aldığı düşünülmektedir (56).

Prenatal dönemde retinoik asit, yağ asitleri ve metabolitleriyle regüle edilen organogenezde önemli rol oynarlar. Multipotent kök hücrelerin, preadiposit gibi erken safhadaki prekursor hücrelerine dönüşme (diferensiyasyon) aşamalarında fonksiyonları vardır (59). Lipid metabolizmasında, epidermal hücre proliferasyonunda ve myelinizasyonda rol almaktadır (57). Kasta serbest yağ asidi oksidasyonunu arttırmaktadır (61). Lipid depolanmasında da görevi olabileceği düşünülmektedir. Çok düşük dansiteli lipoproteine (Very Low Density Lipoprotein, VLDL) cevap olarak makrofajlarda lipid birikmesine neden olduğu düşünülmektedir (62). Ayrıca embriyonun implantasyonu ve yara iyileşmesinde rol aldığı da gösterilmiştir (57).

c) PPAR γ

PPAR γ primer olarak adipositlerde, daha az oranda iskelet kası, karaciğer, kalp ve kalın bağırsakta eksprese olur (56,62).

PPAR γ Fonksiyonu

PPAR γ adipoz hücre farklılaşması, lipid depolanması ve glukoz homeostazında görev alır ve bu olaylarla ilgili birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. Örneğin, yağa özgün adiposit P2 (aP2), LPL, FATP, FABP, GLUT4 glukoz taşıyıcı, c-Cbl-ilişkili protein (CAP), glukokinaz ve ayırıcı (uncoupling) proteinlerin (UCP2 ve UCP3) ekspresyonunu artırır (62).

PPAR γ , makrofaj içindeki lipid dengesinin kontrolünden de sorumludur. Yağ asidi taşıyıcısı CD36'nın düzeyini arttırarak lipidlerin hücre içine taşınmasını sağlarken, ATP-bağlayan kaset protein A1'i (ATP binding cassette protein A1, ABCA1) indükleyerek lipidin hücre dışına çıkarılmasına sebep olur (62).

PPAR γ homozigot knockout (-/-) farelerde plasenta fonksiyonu kaybı oluşmaktadır. Bu da kardiyak gelişimi bozmakta ve fareler yaşamadığı için homozigot knockout farelerle çalışma yapılamamaktadır. PPAR γ heterozigot knockout (+/-) farelerdeyse adiposit fonksiyonu ve glukoz homeostazı bozulmakta ve leptin seviyesinde artma olmaktadır (62).

PPAR γ 'nın antiinflamatuvar etkisi de bulunmaktadır. Makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin oluşumunu azaltır. T-lenfositler üzerinde de benzer bir etkisi olup, interferon- γ (IFN- γ) ve interlökin-1 (IL-1) oluşumunu baskılar (62).

PPAR γ izoformları

PPAR γ 'nın aminoasit sayısına göre 2 izoformu tanımlanmıştır. Bunlar PPAR γ_1 ve PPAR γ_2 izoformlarıdır. PPAR γ_2 'yi PPAR γ_1 'den farklı kılan özellik PPAR γ_2 'nin amino ucunda ilaveten bulunan 28 aminosittir (Şekil-7) (58). PPAR γ_2 'deki bu fazladan 28 aminoasit, bu izoformun AF1 bölgesinin transkripsiyonu indükleme aktivitesinin, PPAR γ_1 'e göre 5 ile 6 kat daha fazla olmasına sebep olmaktadır (61).

PPAR γ_1 izoformu adipoz doku, karaciğer, iskelet kası, prostat, böbrek, meme, bağırsak ve gonadlar gibi hemen hemen her dokuda eksprese olurken, PPAR γ_2 izoformu adipoz dokuda eksprese olur ve preadipositler için adiposite özgün transkripsiyon faktörü olarak işlev göstererek adipoz doku diferensiyasyonunu düzenler (63).

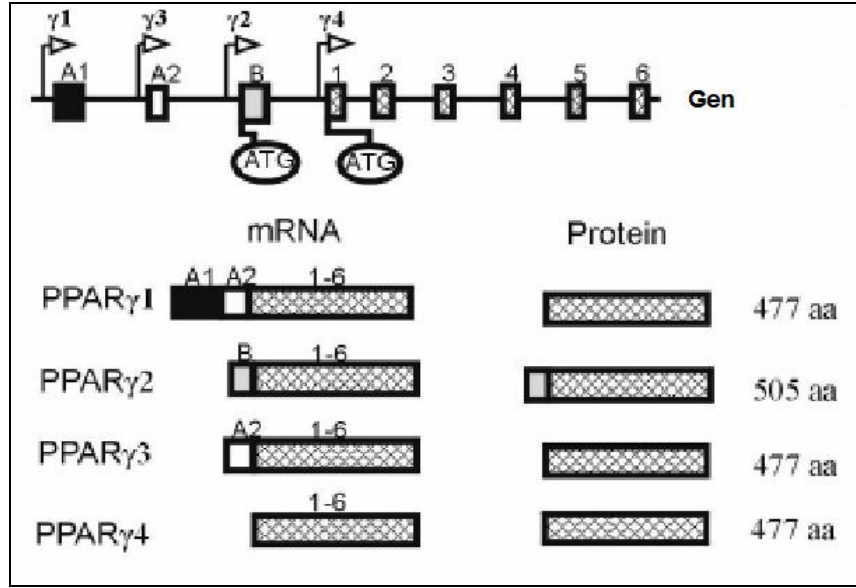
PPAR γ Ligandları

Thiazolidin, pioglitazon ve rosiglitazon gibi insülin duyarlılığını attıran ilaçlar ekzojen PPAR γ agonistleridir. Endojen agonistlerin ise sadece bir kısmı bilinmektedir. Linoleik asit, linolenik asit ve araşidonik asit gibi uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri PPAR γ aktivasyonu yapmaktadır. Lizofosfatidik asitin PPAR γ agonisti olabileceği ve PPAR γ -bağlantılı mekanizmayla neointima oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir. Nitratlanmış yağ asitlerinin de PPAR γ üzerinden etki ettiği düşünülmektedir. Fonksiyonu tam olarak bilinmese de 15d-Prostoglandin J2'nin (15d-PGJ2), okside düşük dansiteli lipoprotein (Low Density Lipoprotein, LDL) ve okside LDL metabolitlerinden bazı hidroksi okta dekadienoik asit (9-HODE ve 13-HODE) PPAR γ agonistleri olduğu bildirilmiştir (62).

PPAR γ Gen Yapısı

PPAR γ 'nın kromozomal lokalizasyonu 3p25'tedir. PPAR γ geni 9 ekzonlu olup 100 kilobazdan fazla uzunluğa sahiptir. Farklı promotorlar ve alternatif kesip-

ekleme mekanizmasıyla oluşan 4 ayrı PPAR γ mRNA'sı tanımlanmıştır. Kesip-ekleme varyantlarından PPAR γ_1 , γ_3 ve γ_4 mRNA'ları aynı proteini yani PPAR γ_1 izoformunu kodlar. Kesip-ekleme varyantı PPAR γ_2 ise PPAR γ_2 izoformunu kodlar. PPAR γ_1 8 ekzonla kodlanırken, PPAR γ_2 7 ekzonla kodlanır. Hem PPAR γ_1 hem de PPAR γ_2 'yi kodlayan bölgenin ilk 6 ekzonu ortaktır (Şekil-7) (57,58).



Şekil-7: PPAR γ gen yapısı ve PPAR γ proteini izoformlarının şematik gösterimi

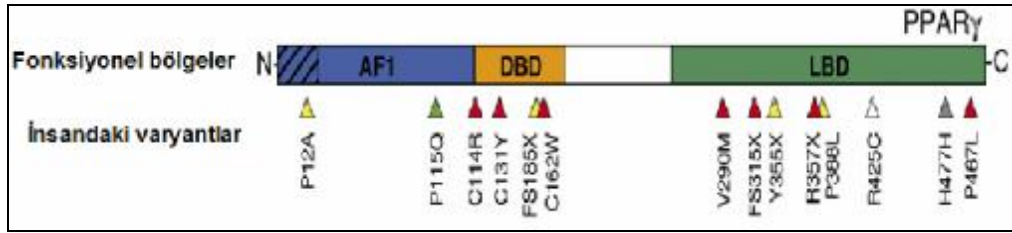
Ekzon 1-6 tüm PPAR γ mRNA'larında ortaktır. PPAR γ_1 translasyona uğramayan (untranslated) ekzonları A1 ve A2'yi, PPAR γ_2 translasyona uğrayan ekzon B'yi kapsamaktadır. PPAR γ_3 translasyona uğramayan ekzon A2'yi, PPAR γ_4 ise sadece ekzon 1-6'yı içermektedir. Zieleniak A. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (58).

PPAR γ GENİ VARYANTLARININ TİP 2 DİYABET ve DİYABETLE BAĞLANTILI HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

PPAR γ 'nın adipojenezdeki rolü onlarca yıl önce fark edilmiştir ve günümüzde de tartışılmaz bir şekilde önemini korumaktadır. Adipojenezde merkezi konumda olan preadipositin diferensiyasyonu ve olgun adipositlerde yağ asidi depolanması PPAR γ tarafından kontrol edilmektedir. Bu kontrol özellikle PPAR γ_2 izoformu ile gerçekleştirilir. 1997 yılında Pima kızılдерililerinde yapılan araştırma, kromozom 3p25-p24 lokusundaki PPAR γ ile obezite arasında ilişki olduğunu

gösteren ilk çalışmalardandır. Bugüne kadar tip 2 diyabet ve tip 2 diyabetle bağlantılı olduğu bilinen çeşitli durumlar (obezite, insülin direnci, lipodistrofi vb.) ile birçok genetik varyasyon bildirilmiştir (8). PPAR γ 'nın bu hastalık ve ilişkili durumlarıyla ilgili olan genetik varyasyonları Tablo-4'de özetlenmiştir.

Bu PPAR γ genetik varyasyonlarından farklı çalışmalarda en fazla tekrarlanan, PPAR γ_2 genindeki Pro12Ala polimorfizmidir. Bu polimorfizm AF1 bölgesinde fazladan bulunan 28 aminoasitlik bölgede yer almaktadır (Şekil-8) (8). Bu polimorfizm, oluşan PPAR γ_2 proteinin DNA bağlanma afinitesini düşürerek transkripsiyon aktivitesinin bir miktar azalmasına neden olduğu düşünülmektedir (8). PPAR γ_2 geni Ala12 varyantı, yabancı tip Pro12'ye göre reseptör aktivitesinde azalma, düşük vücut kitle indeksi, artmış insülin duyarlılığına neden olmaktadır. Ala12 varyantının farklı etnik gruplarda tip 2 diyabete karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (64).



Şekil-8: PPAR γ proteini PPAR γ varyantlarının bölgeler üzerindeki dağılımı

Amino ucundaki taralı alan PPAR γ_2 'ye özgün olan 28 aminoasitin olduğu bölgeyi göstermektedir. AF1: Aktivasyon fonksiyonu bölgesi 1, DBD: DNA bağlayan bölge, LBD: Ligand bağlayan bölge. Okların renkleri mutasyon tiplerini göstermektedir: Yeşil, Fonksiyon kazandıran mutasyonlar; sarı, parsiyel fonksiyon kaybettiren mutasyonlar; kırmızı, fonksiyon kaybettiren mutasyonlar, Dominant-negatif mutasyonlar; Gri, sessiz varyant; beyaz, bilinmeyen. Heikkinen S. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (8).

Çevresel faktörler genlerin işlevleri üzerinde etkilidir. Bunun en iyi örneklerinden birisi de PPAR γ ve çevresel faktörlerin etkileşimidir. Örneğin obez kişilerde (Vücut kitle indeksi >27) Ala12 varyantının bulunması, obezitenin daha fazla artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ancak zayıf kişilerde Ala12 varyantının bulunmasının fenotip üzerinde etkisi farklıdır. Yapılan çalışmaların bazılarında zayıf kişilerde Ala12 varyantının fenotip üzerinde etkisi yokken, bazı çalışmalarda ise bu

varyantın zayıf kişilerde şişmanlıktan koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu varyantın vücut kitle indeksi ve tip 2 diyabet üzerindeki etkisini başka çevresel faktörlerin de (fiziksel aktivite ve diyetdeki yağ asidi içeriği) etkilediği gösterilmiştir (8).

Tablo-4: PPAR γ genetik varyantlarının fenotipik etkileri

Varyant	Fenotipik etkileri
Sık görülen polimorfizmler	
Pro12Ala (PPAR γ_2 izoformuna özgün)	-Tip 2 diyabetten koruyucu -Obezite (çevresel faktöre göre koruyucu ya da artırıcı etkisi var)
His477His	-Leptin seviyesini etkilemesi -Yüksek vücut kitle indeksi, -Düşük kemik dansitesi -Artmış kalp krizi riski -Aterosklerotik lipid değişikliklerinden ise koruyucu
Dominant-negatif, fonksiyon kaybettiren mutasyonları	
Pro467Leu Val290Met Cys114Arg Cys131Tyr Cys162Trp 315Stop Arg357X	-Ciddi insülin direnci ya da diyabet -Karaciğerde yağlanma -Parsiyel lipodistrofi -Dislipidemi -Hipertansiyon
Haplo-yetersizlik (Haploinsufficient) mutasyonları	
Arg425Cys Phe388Leu Tyr355 185Stop	-Ciddi insülin direnci ya da diyabet -Karaciğerde yağlanma -Parsiyel lipodistrofi -Dislipidemi -Hipertansiyon
Fonksiyon kazandıran mutasyonlar	
Pro115Gln	-İleri derecede obezite -Normal insülin duyarlılığı
Promotor varyantları	
P2 C-689T P2 C-2821T P3 C-681G P4 A-14G	- Artmış kilo ve LDL düzeyi -Tüm vücut ve hepatik insülin etkisiyle ilişkili -LDL seviyesi -Parsiyel lipodistrofi -Metabolik sendrom

Heikkinen S. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (8).

Genlerin çevresel faktörler dışında birbirleriyle de etkileşimleri vardır. Birçok metabolik hastalık doğası gereği poligeniktir. PPAR γ mutasyonları ve başka gen varyantlarının birlikte etkileri çalışılmıştır. Örneğin PPAR γ Pro12Ala varyantı ve yağ asidi bağlayan protein 4 (Fatty Acid Binding Protein, FABP4) A376C varyantının birlikteliğinin insülin duyarlılığı üzerine etkileri, bu varyantların tek başlarına insülin duyarlılığı üzerine etkilerinden daha fazladır. Bu iki varyant sinerjistik (1+1>2) etki gösterir (8).

PPAR γ 'nın sık görülen Pro12Ala varyantı dışında, PPAR γ 'nın ligand bağlayan bölgesinde yer alan dominant negatif ve fonksiyon kaybettiren mutasyonlar da saptanmıştır. Bu mutasyonlar, parsiyel lipodistrofisi (ekstremiteler ve gluteal bölgeden yağ dokusu kaybı), karaciğerde yağlanması, ciddi insülin direnci, diyabet ve hipertansiyonu bulunan hastalarda gösterilmiştir. Bu fonksiyonel mutasyonlar ve önemli başka PPAR γ varyantları şekil-8'de gösterilmiştir. 185Stop, Val290Met, Arg425Cys ve Pro467Leu mutasyonları ilk tanımlanan fonksiyon kaybettiren mutasyonlarıdır. 185Stop kodonu ile kırpılmış (truncated) kısa protein, hedef DNA'ya bağlanmazken, yukarıda belirtilen diğer fonksiyon kaybı mutasyonlarıyla oluşan reseptörler DNA'ya bağlanabilir. Fakat bu mutasyonlu reseptörlerin, kofaktörlerle etkileşimleri zayıf olduğundan transkripsiyonel aktiviteleri DNA'ya bağlanabilmelerine rağmen düşüktür (8).

Fonksiyon kazandıran mutasyon olan Pro115Gln yer değişimi PPAR γ 'nın aktif kalmasına sebep olur. Bu mutasyonu taşıyan bireylerde ileri derecede obezite görülmesine rağmen insülin duyarlılığı değişmemektedir (8).

Phe388Leu ve Tyr355X mutasyonları ile PPAR γ promotor 4 A-14G varyantı, PPAR γ için haploetersizlikle sonuçlanmaktadır. Etkilenmiş allelin ürünü yabancı tip PPAR γ ile etkileşmez. Ancak PPAR γ 'nın toplam fonksiyonel aktivitesinde etkilenmiş allel nedeniyle azalma gerçekleşir. Tip 2 diyabet, hiperlipidemi, parsiyel lipodistrofi, karaciğerde yağlanma, ciddi insülin direnci görülen hastalarda bu mutasyonlar saptanmıştır (8).

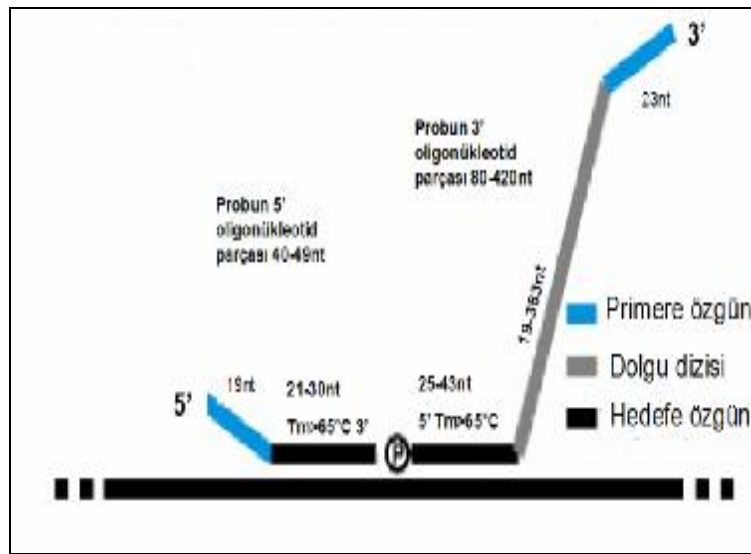
PPAR γ insülin direnci, tip 2 diyabet ve yağ metabolizmasındaki üzerindeki etkisi nedeniyle önemli bir gen dir. Bu genin diğ er genlerle ve çevresel faktörlerle etkileş imi metabolik hastalıkların multifaktöriyel özellikleri konusunda bilgi vermektedir. PPAR γ 'nın diğ er faktörlerle etkileş imi, fonksiyonel mekanizması ve metabolik etkileri çeş itli yöntemler kullanılarak halen araştırılmaktadır (8).

MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) YÖNTEMİ

MLPA; bir multipleks PCR'dan sonra, 45 tane farklı genomik DNA ya da RNA dizisinde anormal kopya sayısının değ erlendirilebildiğ i ve ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanmış yeni bir metoddur (6). MLPA tekniğ i uygulaması kolay bir yöntem olup, ç alış ilması için gerekli ekipmanlar birçok laboratuarda bulunabilmektedir. MLPA reaksiyonunun gerç ekleş tirilmesi için sadece 20 ng insan DNA'sı yeterlidir. MLPA reaksiyonunda hedef dizi değ il, hedef diziy e hibridize olan MLPA problemleri amplifiye olur ve standart bir multipleks PCR'ın aksine sadece bir tek primer çifti kullanılır. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin uzunluğ u 130-480 baz çifti uzunluğ unda olup, jelde yürütülebilir ve bir kapiller elektroforez sistemde analiz edilebilir. Kapiller elektroforez sistemden elde edilen piklerin referans örneklerle karşı laş tırılmasıyla delesyon ya da amplifikasyon gibi anormal kopya sayıları saptanabilir (65).

Hedef diziy e hibridize olan her bir MLPA probu birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid dizisi iç ermektedir. Her bir prob, 5' ve 3' olmak üzere 2 oligonükleotid parç adan oluş maktadır ve bu her bir oligonükleotid parç asında, hedef diziy e özgün dizi ve tüm problemlerin eş zamanlı multipleks PCR amplifikasyonunun gerç ekleşebilmesi için sabit evrensel primer dizileri iç ermektedir. Sıklıkla toplam prob uzunluğ unun ayarlanması için en az bir oligonükleotid parç asında (sıklıkla her iki oligonükleotid parç ada) olmak üzere dolgu (stuffer) dizisi iç ermektedir. 3' oligonükleotid parç ası ise 5' ucundan fosforiledir ve bu sayede 5' oligonükleotid parç ası ile birleşebilir. (7).

Konvansiyonel MLPA yönteminde her bir MLPA probunun, 5' oligonükleotid parçasının 5' ucunda 19 nükleotid uzunluğunda evrensel primer dizisi ve 3' ucunda 21-30 nükleotid uzunluğunda hedefe özgün olan dizi bulunur. Probun 3' oligonükleotid parçası ise 3' ucunda 23 nükleotid uzunluğunda evrensel primer dizisi ve 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda olan ve ilk prob oligonükleotid parçasına komşu şekilde hedef diziyeye hibridize olacak diziyeye sahiptir. Toplam prob uzunluğunun ayarlanması için; probun 3' oligonükleotid parçasına ayrıca uzunluğu 19-370 nükleotid arasında değişen dolgu dizisi bulunmaktadır (Şekil-9) (7).



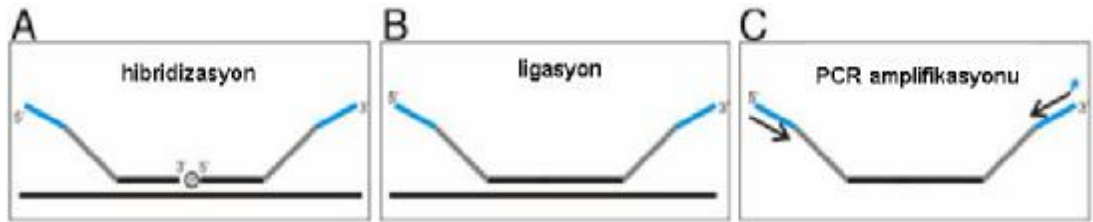
Şekil-9: MLPA probunun yapısı

Kozlowski P. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (7).

Konvansiyonel MLPA yönteminde problemlerin arasındaki uzunluk farkları bu dolgu dizileriyle verilmektedir. Bu şekilde, 3' oligonükleotid parçasının toplam uzunluğu 440 nükleotid uzunluğa kadar ulaşabilir. Ancak şu an için sadece 100 nükleotid uzunluğuna kadar olan oligonükleotidler kimyasal olarak sentezlenebilmekte daha uzun olan oligonükleotidler, MLPA kalitesini etkin bir şekilde karşılayacak düzeyde kimyasal olarak sentezlenememektedir (7). Bundan dolayı M13 klonlarının (tek iplikçikli DNA fajları klonlanma vektörleri) tek zincirli DNA'sı, bu hedefe özgün oligonükleotidlerin sentezlenmesi için kullanılmaktadır. Problemlerin birçoğu 35-42 prob içermektedir ve problemlerin ardışık amplifikasyon ürünleri genellikle 6 ya da 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde üretilmektedir.

Özgün bir MLPA prob miksinde kullanılan her bir prob, farklı bir M13 kaynaklı vektörden elde edilmiş olup, farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içermektedir. Farklı problemlerin amplifikasyon ürünleri, heterodupleks oluşumunu engellemek için sadece uç kısımlarda ortak dizi içermektedirler. Yüzonsekiz tane farklı M13'ten elde edilmiş MLPA vektörü hazırlanmış ve her biri farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içermektedir. Hedef diziyeye özgün olan sentetik oligonükleotidler, bu vektörlere kolayca eklenerek ihtiyaç duyulan fragman uzunluğu sağlanabilmektedir. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren ve amplifikasyon ürünü 94-124 baz çifti uzunluğunda olan problemler başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (6).

M13'ten elde edilmiş oligonükleotid problemlerinin hibridize olmayan dolgu dizileri, birçok amplifikasyon ürününün amplifikasyon karakterlerinin bilinmesine olanak vermektedir. Farklı problemler hedef diziyeye yarışmalı şekilde bağlanmadığı için hedefe özgün kısa diziler kullanıldığında, prob hedef dizilerinin birbirine yakın ya da ortak nükleotidleri paylaşması durumunda, mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde avantaj sağlamaktadır (6). Hibridizasyon ve ligasyon aşamaları gerçekleştikten sonra PCR ile amplifikasyon basamağı gelmektedir ve bu aşamada mevcut olan bütün problemler için bir tek çift primer seti kullanılmaktadır (Şekil-10) (7). Primerlerden bir tanesi floresan bir madde olan N-(3- fluoranthyl) maleimide (FAM) ile işaretlidir. Elde edilen PCR ürünleri daha sonra kapiller elektroforez sistemde analiz edilir (66).



Şekil-10: MLPA yönteminde hibridizasyon, ligasyon ve PCR amplifikasyonu basamaklarının şematik gösterimi

Oligonükleotid probun mavi bölgesi; primere özgün dizileri, gri bölgesi dolgu dizilerini, siyah bölgesi ise hedefe özgün dizileri içermektedir. Kozlowski P. ve ark.'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır (7).

Bugün için, MLPA yöntemi en sık olarak genomik DNA'da kopya sayısı analizi, kromozom anöplidilerinin tespiti, delesyon ya da duplikasyonların saptanmasında kullanılmaktadır (7).

MLPA günümüzde meme kanseri, Duchenne müsküler distrofisi, işitme kaybıyla ilgili sendromlar, nörofibromatosis gibi hastalıklardan çeşitli kanser türlerine kadar geniş spektrumlu bir hastalık grubunu ilgilendiren genlerdeki dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmelerinin ve nokta mutasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılabilir (6,7,65) .

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'da gerçekleştirilen bu çalışmada Genetik Tanı Birimi Moleküler Tanı Laboratuvarı olanaklarından yararlanıldı. Bu araştırma PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2008TPF024 sayı ile desteklendi. Çalışmamız 09.05.2008 gün ve 200/1971 sayılı karar ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınarak başlatıldı. Çalışmamız 15.05.2008-16.03.2009 tarihler arasında yapıldı.

GEREÇLER

Kullanılan Gereçler

Thermal cyclers (Techne TC-412)

Kapiller Elektroforez Cihazı (ABI Prizm 310)

FUJIFILM Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon (QG-Mini80) Cihazı

Multipipet 8 kanallı 0,5-10 µl (FINNPIPETTE)

Multipipet 8 kanallı 10-100 µl (FINNPIPETTE)

Mikro Pipet takımı (VİPRΩ)

Mikrosantrifuj-Minispin plus (Eppendorf)

Dry block heating thermostat Bio TDB-100 (BOECO)

Vorteks (Yellow^{line} TTS-2)

Buzdolabı (Arçelik)

Eppendorf Tüpü (1,5 ml'lik)

Sekizli PCR tüpleri (strip)

PCR tüpleri (strip)

Mikropipit ucu 10µl (AvantGuard Barrier Tips)

Mikropipit ucu 100µl (AvantGuard Barrier Tips)

Mikropipit ucu 200µl (AvantGuard Barrier Tips)

Mikropipit ucu 1000µl (AvantGuard Barrier Tips)

ABI 310 yükleme tüpleri (ABI)
ABI 310 47 cm Kapiller (ABI)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA Ekstraksiyon Kiti (QuickGen DNA whole blood kit S) (DB-S)

DNA whole blood protease EDB-01 (FUJIFILM)

Yıkama tamponu (Wash Buffer) WDB-03 (FUJIFILM)

Lizis tamponu (Lysis Buffer) LDB-04 (FUJIFILM)

Elüsyon tamponu (Elution Buffer) CDB-02 (FUJIFILM)

Salsa MLPA kit P224 PPARG (Salsa P224 PPARG- MRC Holland) (Lot No:
1106)

Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)

10X EDTA' lı Buffer (ABI)

Gen Scan 500 LIZ I Size Standart (ABI)

Hi-Di Formamide (ABI)

Distile Su

Etanol (96%) (Panreac)

YÖNTEM

Materyal Seçimi

Tanımlayıcı bir araştırma niteliğindeki bu çalışmada, 15.05.2008-20.08.2008 tarihleri arasında üniversitemize başvuran klinik ve biyokimyasal çalışmalarla Tip 2 diyabet tanısı almış 150 olgu değerlendirildi. Olgular Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) bildirdesine göre tip2 diyabetes mellitus tanı kriterleri dikkate alınarak seçildi.

En az 8 saat açlık sonrasında açlık kan glukozu>126mg/dl, hiperglisemiye ait semptomlar ve günün herhangi bir zamanında kan glukozu>200mg/dl ya da oral glukoz tolerans testinde 2. saat glukoz değeri >200mg/dl olarak saptanan hastalar tip 2 diabetes mellitus tanısı ile çalışmaya alındı. Olgular çalışma hakkında

bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş onam formu doldurulduktan sonra hastalar çalışmaya dahil edildi.

Olguların anamnezi ile birlikte hastalığın başlangıç yaşı, aile öyküsü, kilo, boy ve kan lipid düzeyleri de sorgulandı. Çalışmaya gençlerde görülen erişkin tipi diyabet (Maturity onset diabetes of young-MODY) olasılığını da ekarte etmek için 30 yaş ve üstü hasta grubu dahil edildi. Ayrıca anamnez ya da dosya bilgisinden ilaca bağlı diyabet gelişmiş olduğu düşünülen olgular çalışmaya alınmadı.

MLPA yönteminde her çalışmada doz oranı tayini yapılabilmesi için negatif kontrol olarak 30 yaşın üzerinde, klinik ve biyokimyasal testlerde diyabetin ekarte edildiği, kendisinde ve ailesinde diyabet öyküsü bulunmayan sağlıklı bireyler seçildi.

Her hastadan 2ml'lik EDTA'lı tüpe 2'şer tüp periferik kan örnekleri alındı. Pamukkale Üniversitesi Genetik Tanı Birimi laboratuvarlarında 150 olgunun periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu FUJIFILM Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Robotu ile QuickGen DNA whole blood kit S (DB-S) kullanılarak yapıldı. MLPA analizinde Salsa MLPA P224 PPARG kiti kullanıldı.

FUJIFILM Quick Gen-Mini 80 DNA Ekstraksiyon Cihazı Kullanarak DNA İzolasyonu

§ 1.5 ml'lik ependorf tüpünün içerisine, 30 µl QuickGen proteaz kondu.

§ Daha sonra EDTA'lı tüp içerisinde bulunan periferik kan örneğinden 200 µl alınıp tüpe eklendi.

§ 250 µl Lysis Buffer eklenip, 15 saniye vortekslenerek karıştırıldı.

§ 1.5 ml'lik ependorf tüpünün kapağına yapışan damlaların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapıldı.

§ 56 °C'de 2 dakika inkübe edildi.

§ 1.5 ml'lik ependorf tüpünün kapağına buharlaşma nedeniyle yapışan damlaların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapıldı.

§ %96'lık 250 µl etanol eklendi, 15 saniye vortekslendikten sonra tekrar

kısa süreli santrifüj yapıldı.

§ QG-Mini80 cihazındaki tüp taşıyıcılarından, W olarak adlandırılan ön kısmına atık kabı, E olarak adlandırılan arka tarafına DNA'nın toplanacağı 1,5 ml'lik yeni ependorf tüpü yerleştirildi. Kitle birlikte gelen filtreli kartujlar atık kaplarının üstlerine yerleştirildikten sonra lizatın tamamı dikkatlice bu kartujlara aktarıldı.

§ QG-Mini80 cihazında basınçlama işlemi (pressurization) yapıldı. Kartuja 750 µl yıkama tamponu eklendikten sonra QG-Mini80'de basınçlama işlemi yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

§ QG-Mini80 cihazında W kısmında yerletirilmiş olan DNA'nın bulunduğu kartuj, E kısmındaki saf DNA'nın toplanacağı ependorf tüpünün üstüne transfer edildi.

§ Filtratı içeren atık tüpü atıldı.

§ 200 µl elüsyon tamponu (Elution Buffer) kartuja eklendi ve basınçlama işlemi yapıldı.

§ Elde edilen DNA -20 °C de saklandı.

DNA Örneklerinin MLPA Yöntemiyle Analizi

1) DNA Denatürasyonu ve SALSA Prob Miks ile Hibridizasyonu

§ İzole edilen DNA örneklerinden 5 µl (20-150 ng DNA) alındı.

§ Alınan örnekler 200 µl'lik sekizli PCR strip tüplerine aktarıldı.

§ Thermal Cycler cihazında 98 °C'de 5 dakika bekletilerek DNA denatüre edildi.

§ Örnekler 25 °C'ye soğutuldu ve Thermal Cycler cihazı 25 °C'de beklemeye alındı.

§ 25 °C'de bulunan DNA örneğinin üzerine 1.5 µl SALSA MLPA P224 PPARG Prob Mix ve 1.5 µl MLPA tampon (Buffer) eklenip pipetaj yapıldı ve homojenize edildi.

§ 95 °C de 1 dakika inkübe edilen örnekler daha sonra 60 °C'de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

2) Ligasyon Reaksiyonu

§ Hibridizasyon süresi bitince Thermal Cycler cihazının ısısı 54 °C'ye getirildi.

§ Hibridizasyon reaksiyon ürünlerinin ısısı 54 °C'ye gelince örneklere 32 µl ligasyon miks solusyonu (25 distile su, 3 µl Ligase-65 buffer A, 3 µl Ligase-65 buffer B ve 1 µl ligase-65) ilave edildi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi.

§ Örnekler 54 °C de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.

§ Sonra örnekler 98 °C de 5 dk. bekletildi ve ligaz enzimi inaktive edildi.

§ Örneklerin ısısı 4 °C'ye soğutuldu ve Thermal Cycler cihazı 4 °C'de beklemeye alındı.

3) PCR (Polymerase Chain Reaction)

§ Yeni sekizli PCR strip tüplerine sırasıyla 26 µl distile su ve 4 µl SALSA PCR tampon konuldu, ligasyon reaksiyonu ürünlerinden 10 µl alınarak bu PCR strip tüplerine aktarıldı ve içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice pipetaj yapılarak homojenize edildi. Kalan ligasyon ürünleri üzerlerine tarihleri yazılarak -20 °C'de saklandı.

§ Örnekler 60 °C'ye getirildi ve Thermal Cycler 60°C'de beklemeye alındı.

§ 60 °C'de bekleyen örneklere 10 µl Polimeraz miks (5,5 µl distile su, 2 µl SALSA primerleri, 2 µl enzim dilüsyon tamponu, 0,5 µl SALSA polimeraz) eklenerek PCR başlatıldı.

PCR basamakları:

1. Amplifikasyon (35 döngü)

a) Denatürasyon 95 °C 30 saniye

b) Eşleşme (Annealing) 60 °C 30 saniye

c) Uzama (Ekstansiyon) 72 °C 1 dakika

2. Son Ekstansiyon 72 °C 20 dakika

4) ABI Prism 310 Genetic Analyser Cihazına Yükleme

Laboratuvarımızda PCR ürünleri elde edildikten sonra ürünler -20 °C'ye kaldırıldı. Yükleme ve görüntüleme işlemleri için Genetiks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi (İstanbul) laboratuvarındaki ABI Prism 310 Genetik Analyser cihazı kullanıldı.

§ PCR ürünlerinden 0,75 µl alınarak PCR striplerine kondu.

§ Daha sonra tüplere 0,4 µl Gen Scan 500 LIZ I Size Standart ve 12 µl deiyonize formamid (Hi Di formamide) eklenerek pipetajla homojenize edildi.

§ Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.

§ Örnekler buz üzerine alındı ve 2 dakika bekletildi.

§ Daha sonra örnekler ABI 310 cihazı yükleme tüplerine aktarıldı.

§ ABI 310 cihazında; 15 kV' da 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV'da 28 dakika yürütme zamanı, filtre G5 şartları sağlandı (Şekil-11).

§ Sonrasında ABI cihazına yüklendi ve GenMapper V. 4.0 programında okutuldu.

§ Örneklerle ait pik görüntüleri ve pik alanları alındı.

Salsa MLPA P224 PPARG Prob Kitinin Özellikleri

Salsa MLPA P224 PPARG prob kiti, PPAR γ_1 transkriptini kodlayan 8 ekzonun her biri için probler içermektedir ve bu kit PPAR γ ekzonlarındaki delesyon ya da duplikasyonları saptamak için dizayn edilmiştir. Kit aynı zamanda referans kontrol problemleri olarak farklı kromozomlara ait bölgeleri de hedeflemektedir (Tablo-5).

Salsa MLPA P224 PPARG probmik kiti 18 farklı MLPA probu içermektedir (Tablo-5 ve 6). Problemlerin amplifikasyon ürünleri 175 ve 328 nükleotid uzunluğu arasındadır. Bunlardan 9 tanesi blok normalizasyon yapmak için referans kontrol probudur. Diğer 9 prob ise PPAR γ geninde 8 farklı ekzonun delesyon ve

duplikasyonlarını göstermek için dizayn edilmiştir. Ayrıca kit, 5 kontrol fragmanı içermektedir. Bu kontrol fragmanlarının amplifikasyon ürünleri 120 nükleotidden kısadır. Bu 5 kontrol fragmanının verileri delesyon ve duplikasyon değerlendirmelerinde kullanılmamaktadır. Bunlardan 4 tanesi, DNA miktar (quantity) fragmanı (Q-fragments) olup, amplifikasyon ürünleri sırasıyla 64-70-76-82 nükleotid uzunluklarındadır. Diğer 1 tanesi ise sentetik ligasyon bağımlı kontrol fragmanı olup amplifikasyon ürünü 92 nükleotid uzunluğundadır.

Mrc Holland ticari firmaya göre prob tanıma dizileri, heterozigot delesyon saptadığı takdirde probun amplifikasyon ürünü rölatif pik alanı %35-50 azalmış görünmelidir. Bununla birlikte prob ligasyon bölgesine çok yakın olan mutasyon ya da polimorfizmler de azalmış rölatif pik alanıyla kendini gösterebilir. Bundan dolayı delesyon bulunması durumunda, bu bölgedeki mutasyonun başka yöntemlerle de doğrulanması gerekmektedir. Şu an için PPAR γ geni için tüm ekzon delesyon ya da duplikasyonlarının oranı bilinmemektedir.

Tablo-5: SALSA MLPA P224 PPARG probmiksiniin özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Kromozom Pozisyonu
64-70 76-82	Q kontrol fragmanları	
92	Sentetik Kontrol probu	2q14
175	Kontrol Prob 3780-L3289	17q11
184	PPARG Prob 6903-L7132	Ekzon 4
193	PPARG Prob 6906-L7672	Ekzon 7
202	Kontrol Prob 1706-L1274	16q24
211	PPARG Prob 6904-L7673	Ekzon 5
220	PPARG Prob 6907-L7133	Ekzon 8
229	Kontrol Prob 3560-L2926	3p21
238	PPARG Prob 6905-L6485	Ekzon 6
247	PPARG Prob 7470-L6479	Ekzon 1
256	Kontrol Prob 6113-L5568	3p25 (XPC)
265	PPARG Prob 6900-L6480	Ekzon 2
274	Kontrol Prob 2470-L1914	15q21
283*	PPARG Prob 6901-L7674	Ekzon 2B
292	Kontrol Prob 5296-L4684	3q11
301	Kontrol Prob 2266-L1752	3p25 (GHRL)
310	Kontrol Prob 1293-L0838	9p21
319	PPARG Prob 6902-L6482	Ekzon 3
328	Kontrol Prob 2663-L2130	11q23

* 283 nükleotid ekzon 2 probu transkript varyantıdır.

(65) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Tablo-6: P224'de 3p25 problemlerinin kromozomal lokasyona göre sıralanışı

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	PPARG Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_138712.3	Parsiyel dizi (Ligasyon bölgesine 20 nt yakınlıkta)	Ardışık proba olan uzaklık
301	2266-L1752	GHRL gen			2002.9 Kb
		PPARG başlama kodonu	248-250		
247	7470-L6479	PPARG Ekzon 1	Intron 1, 0.9 Kb Ekzon 1'den sonra	GTGGGTGTGT-AGTCGTGGTA	23.5 Kb
265	6900-L6480	PPARG Ekzon 2	214-215	ACAACAAGGC-CATTTTCTCA	39.2 Kb
283	6901-L7674	PPARG Ekzon 2B	84-85 in NM_015869.4 (varyant 2)	CCCTATTCCA-TGCTGTTATG	28.3 Kb
319	6902-L6482	PPARG Ekzon 3	382-383	CTCCAGCATT-TCTACTCCAC	1.6 Kb
184	6903-L7132	PPARG Ekzon 4	546-547	AGCCTCATGA-AGAGCCTTCC	11.3 Kb
211	6904-L7673	PPARG Ekzon 5	668-669	ACAATCAGAT-TGAAGCTTAT	13.4 Kb
238	6905-L6485	PPARG Ekzon 6	936-937	CGCTGACCAA-AGCAAAGGCG	10.9 Kb
193	6906-L7672	PPARG Ekzon 7	1203-1204	CTCTCCTCAA-ATATGGAGTC	17.1 Kb
220	6907-L7133	PPARG Ekzon 8	1560-1561	TGCTCCAGAA-AATGACAGAC	1739.0 Kb
		<i>PPARG</i> dur kodonu	1679-1681		
256	6113-L5568	XPC gen			

(65) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Manual Control

Function #108 Value Range Execute

Autosampler Present Tray No Value No Range

Module <none> Start Pause Cancel

GeneScan Injection Sheet - Untitled-1

Sample Sheet: Sample Sheet-Sun Jan 18 12:2... [File Icon] [Pause] [Cancel]

Length to Detector: 30 cm Operator: [Text Box]

Status

Instrument State: Idle (Red Light) Laser: Off (Red Light)

Electrophoresis Power: Off (Red Light) Door: Closed (Green Light)

Injection: [Text Box] 48 Tube Autosampler: 1 Buffer Valve: Open Gel Pump: At 322 Set 322

Function: Idle Time Remaining: 00:00:00 Total Time: 00:00:00

Electrophoresis

Voltage kV: 0.0 (0.0)

Electrophoresis Current µA: 0.0 (0.0)

Gel Temperature °C: 31 (30)

Laser Power mW: 9.9 (0.0)

Inj.#	Tube & Sample Name	Module	Inj. Sees	Inj. kV	Run kV	Run °C	Run Time
1	A1 - PPARG-18-1	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
2	A3 - PPARG-18-2	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
3	A5 - PPARG-18-3	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
4	A7 - PPARG-18-4	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
5	A9 - PPARG-18-5	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
6	A11 - PPARG-18-6	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
7	B2 - PPARG-18-7	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28
8	B4 - PPARG-18-8	GS STR POP4 (1 mL) G5v2.mxd5	5	15.0	15.0	60	28

Şekil-11: ABI 310 yürütme koşulları

Değerlendirme:

MLPA fragmanları farklı büyüklüklerde ve bundan dolayı belli bir sırayla kapiller elektroforezden geçmektedir. Her bir fragmana ait uzunluk (size) ve bu fragmanın oluşturduğu pikin altında kalan alan GenMapper V.4.0 programı ile değerlendirildi ve sonra excel dosyası formatında kaydedildi. Veriler MLPA Salsa P224 PPARG prob miksinde bulunan standart prob piklerine göre değerlendirilmeye alındı. Özgün olmayan pikler veya liz 550 piki kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA ürünlerinin pik alanları Ezer software V1. yazılımına aktarıldı. Tip 2 diabetes mellitus olmayan örnekler eksternal kontroller olarak kaydedildi.

Salsa P224 PPARG probmiksi, blok normalizasyona göre hesaplanarak değerlendirildi. Blok normalizasyon yaparken analiz programı ile hasta birey için her bir prob amplifikasyon ürününe ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans kontrol problemleri amplifikasyon ürünleri pik alanları toplamına bölündü. Aynı şekilde kontrol olarak alınan sağlıklı bireyler için de her bir pike ait pik alanı, kit içerisinde bulunan referans kontrol problemlerin toplamına bölünerek kontrol grubunun da blok normalizasyonu yapıldı. Daha sonra tip 2 diyabet olan hasta olgular ile kontrol olgulardan elde edilen blok normalizasyonları yapılmış veriler oranlanarak doz hesaplaması yapıldı.

Her deneyde üç normal negatif kontrol test örnekleri ile birlikte çalışıldı. MLPA ile değerlendirme yapılırken Ezer software V.1 yazılımı kullanılarak, aşağıdaki formüle göre her bir spesifik prob bölgesi için doz oranı tayini yapıldı.

$$\begin{array}{c}
\text{Hasta -TPAD} \\
\hline
\text{Hasta -RKPATD} \\
\hline
\text{Doz Oranı Tayini=} \quad \frac{\text{Kontrol 1-TPAD}}{\text{Kontrol 1-RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 2 -TPAD}}{\text{Kontrol 2 - RKPATD}} + \frac{\text{Kontrol 3 -TPAD}}{\text{Kontrol 3- RPATD}} \\
\hline
3
\end{array}$$

TPAD.: Test Piki Alan Değeri

RKPTAD.: Referans Kontrol Prob Pik Alanları Toplam Değeri

Ezer software V.1 yazılımında, doz oranı 0.5'in altında ise delesyon yönünde, 1.6'nın üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilmesi önerilmektedir.

BULGULAR

Klinik ve biyokimyasal çalışmalarla tip 2 diyabet tanısı almış 150 olguda; aile öyküsü sorgulandı, tip 2 diyabet etiyolojisi olarak ilaç kullanımı öyküsü olan ya da 30 yaşın altında tanı almış olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Olguların kilo, boy ve cinsiyetleri kaydedildi. Daha sonra olgulardan, EDTA'lı tüplere 2x2ml periferik kan örneği alındı.

Olguların Demografik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen olguların 67'si (%44,7) kadın ve 83'ü (%55,3) erkekti. Kadın olguların yaş ortalaması $56,95 \pm 8,65$, erkek olguların ise yaş ortalaması $58,38 \pm 8,46$ olarak hesaplandı. Hastaların ilk olarak tip 2 diyabet tanısı aldıkları andaki yaş ortalaması kadınlar için $49,91 \pm 9,20$, erkekler için $50,95 \pm 9,01$ olarak saptandı (Tablo-7).

Tablo-7: Olguların cinsiyetlerine göre yaş ve tanı anındaki yaşlarının ortalaması

Cinsiyet	Olgu sayısı	Yaş ortalaması	Tanı anındaki yaş ortalaması
Kadın	67	$56,95 \pm 8,65$	$49,91 \pm 9,20$
Erkek	83	$58,38 \pm 8,46$	$50,95 \pm 9,01$
TOPLAM	150	$57,74 \pm 8,55$	$50,48 \pm 9,08$

Yüzelli olgudan 145'inin (%97,3) kilo ve boyu ölçüldü. Vücut kitle indeksi (VKİ) ortalaması $29,9 \pm 5,65$ olarak bulundu. 65 kadın olgunun VKİ ortalaması $32,14 \pm 6,19$ iken 80 erkek olgunun VKİ ortalaması $28,09 \pm 4,43$ olarak hesaplandı. Olgular VKİ'ne göre düşük kilolu (kadın için VKİ<19 ve erkek için VKİ<20), normal kilolu (kadın için VKİ: 19-24,9 ve erkek için VKİ: 20-24,9), kilolu (her iki cinsiyet için VKİ: 25-29,9), obez (her iki cinsiyet için VKİ: 30-40) ve morbid obez (her iki cinsiyet için VKİ>40) olarak sınıflandırıldı. Altmışbeş kadın hastanın içinde 10 (%15,4) olgu normal kilolu, 15 (%23,1) olgu kilolu ve 36 (%55,4) olgu obez ve 4

olgu (%6,4) morbid obez olarak saptandı. Seksen erkek hastanın içinde ise 1 (%1,3) olgu düşük kilolu, 21 (%26,3) olgu normal kilolu, 39 (%48,8) olgu kilolu ve 18 (%22,5) olgu obez ve 1 (%1,3) olgu morbid obez olarak saptandı (Tablo-8).

Tablo-8: Olguların vücut kitle indeksine ve cinsiyete göre sınıflandırılması

Kilo düzeyi (VKİ'ne göre)	Kadın olgu sayısı	Kadın yüzde %	Erkek olgu sayısı	Erkek yüzde %	Toplam olgu sayısı	Toplam yüzde %
Düşük	-	-	1	1,3	1	0,7
Normal	10	15,4	21	26,3	31	21,4
Kilolu	15	23,1	39	48,8	54	37,2
Obez	36	55,4	18	22,5	54	37,2
Morbid Obez	4	6,2	1	1,3	5	3,4
TOPLAM	65	100	80	100	145	100

Çalışmamızdaki olguların aile öyküleri incelendiğinde 150 olgunun 64 (%42,7)'ünün akrabasında tip 2 diyabet öyküsü bulunmazken, 86 (%57,3) olgunun akrabalarında tip 2 diyabet öyküsü olduğu gözlemlendi (Tablo-9). Akrabasında tip 2 diyabet öyküsü olan bireylerin akrabalık dereceleri incelendiğinde, 86 olgudan 79 (%91,9)'unun en az 1 ya da daha fazla birinci derece akrabasında tip 2 diyabet olduğu, 7 (%8,1) olgunun ise sadece 2. derece ya da daha uzak derece akrabalarında tip 2 diyabet olduğu gözlemlendi.

Tablo-9: Akrabalarında tip 2 diyabet öyküsü olan olgu sayısı

Ailede tip 2 diyabet öyküsü	Olgu sayısı	Olgu yüzde %
Var	86	57,3
Yok	64	42,7
Toplam	150	100

Araştırma Grubu Olguları MLPA Bulguları

1) DNA Ekstraksiyonu

Çalışmamıza katılan 150 olgunun periferik kanından DNA eldesi QuickGen DNA whole blood kit S (DB-S) ile gerçekleştirildi. Olguların DNA derişimleri 20-181 µg/ml ve 260/280 absorbans değerleri ise 1,46-1,98 arasında ölçüldü.

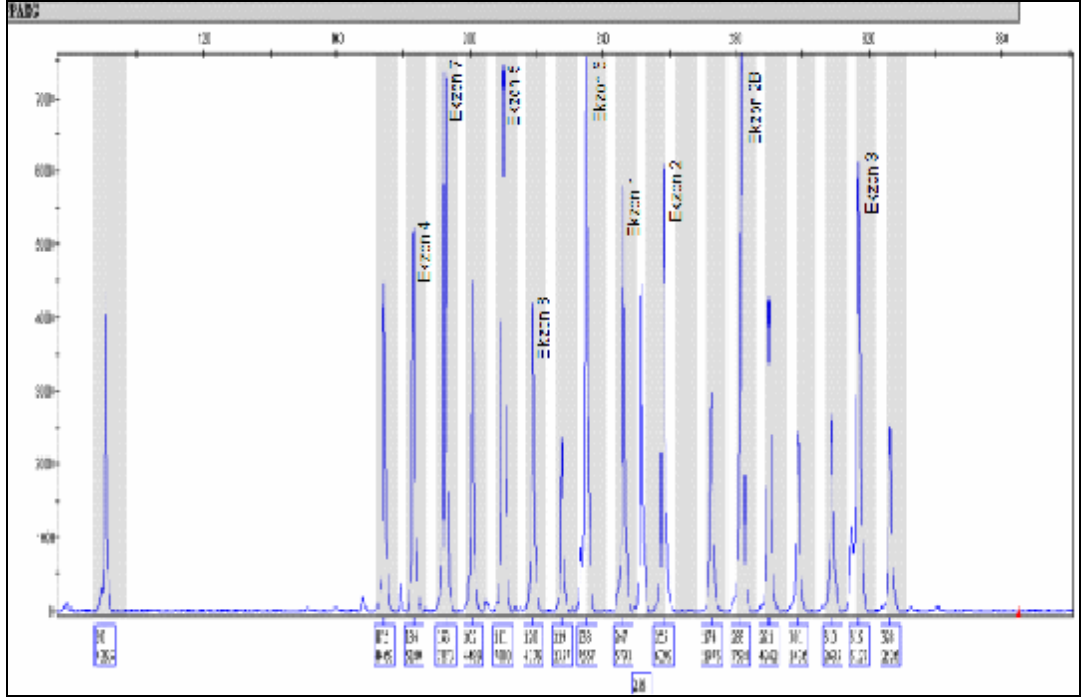
2) MLPA Analizi

Tip 2 diyabetli olguların DNA örneklerinde MLPA P224 PPARG kiti kullanılarak MLPA yöntemi çalışıldı. ABI 310 kapiller elektroforez cihazına örnekler yüklendi ve GeneMapper V4.0 programı ile değerlendirildi. Fragmanların uzunlukları farklı olduğundan, kapiller elektroforezde, her bir fragman uzunluklarına göre analiz edildi. Elektroforez sonrası fragman büyüklükleri ve miktarları, GeneMapper V4.0 programında pik olarak görülmektedir. Normal bir olgunun analiz görüntüsü şekil-12'de verildi.

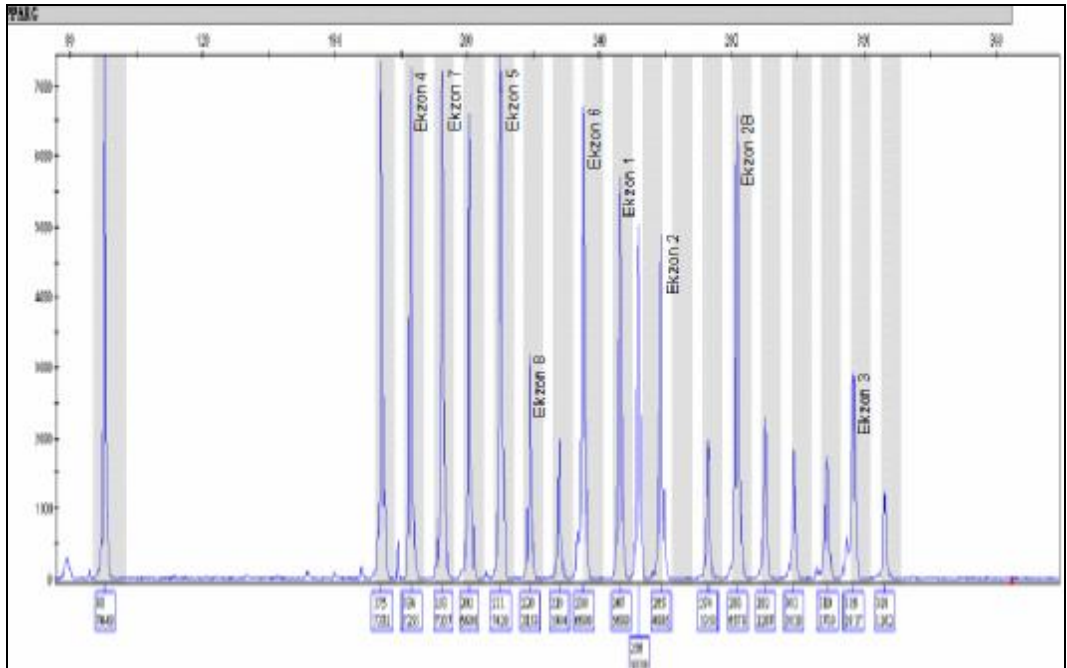
Bununla birlikte pik görüntülerine bakılarak bir değerlendirme yapılamamaktadır. Elde edilen pik alanlarının, yazılım programı sayesinde Excel

formatına dönüştürülmesi ile analizleri yapılmaktadır. Bunun için çalışmamızda öncelikle özgün olmayan pikler ve 550 piki kaldırıldı ve daha sonra geride kalan pik alanları Excel programına aktararak kaydedildi. Excel formatında kaydedilmiş pik alanları, blok normalizasyon yapmak ve kontrol hastaları ile karşılaştırmak için, Excel tabanlı Ezer software V1. yazılımına yüklenildi. Tip 2 diyabetli olgular ve kontrol grubunun verileri Ezer software V1. yazılımı ile oranlandı. **Doz oranı 0,5'in altındaysa delesyon yönünde, 1,6'nın üstündeyse amplifikasyon yönünde değerlendirildi.** Her MLPA deneyi için, ailesinde tip 2 diyabet öyküsü olmayan sağlıklı 3 bireyin periferik kanından elde edilmiş DNA örnekleri, kontrol olarak kullanıldı. Normal bir olgunun fragman analizi Tablo-10'da verildi.

Yüzelli tip 2 diyabetli olgunun, MLPA değerlendirmesi sonucunda PPAR γ geninde 8 ekzonda delesyon ya da duplikasyon saptanmadı. Örnek bir hastaya ait fragman analizi Tablo-11'de ve analiz görüntüsü şekil-13'de verilmiştir.



Şekil-12: Normal bir olgunun analiz görüntüsü



Şekil-13: Tip 2 diyabetli bir olgunun analiz görüntüsü

Tablo-10: Normal bir olgunun doz oranı analiz görüntüsü

Uzunluk	SALSA MLPA prob P224 PPARG	Kromozomal pozisyon	SONUÇ
92	Sentetik kontrol prob	2q14	0,83
175	Kontrol Prob 3780-L3289	17q11	0,95
184	PPARG Prob 6903-L7132	Ekzon 4	1,10
193	PPARG Prob 6906-L7672	Ekzon 7	1,06
202	Kontrol Prob 1706-L1274	16q24	0,92
211	PPARG Prob 6904-L7673	Ekzon 5	1,01
220	PPARG Prob 6907-L7133	Ekzon 8	1,12
229	Kontrol Prob 3560-L2926	3p21	1,11
238	PPARG Prob 6905-L6485	Ekzon 6	0,93
247	PPARG Prob 7470-L6479	Ekzon 1	0,96
256	Kontrol Prob 6113-L5568	3p25 (XPC)	1,10
265	PPARG Prob 6900-L6480	Ekzon 2	0,98
274	Kontrol Prob 2470-L1914	15q21	1,02
283	PPARG Prob 6901-L7674	Ekzon 2B	0,87
292	Kontrol Prob 5296-L4684	3q11	0,98
301	Kontrol Prob 2266-L1752	3p25 (GHRL)	1,02
310	Kontrol Prob 1293-L0838	9p21	0,91
319	PPARG Prob 6902-L6482	Ekzon 3	1,16
328	Kontrol Prob 2663-L2130	11q23	1,15

Tablo-11: Tip2 diyabetli bir olgunun doz oranı analiz görüntüsü

Uzunluk	SALSA MLPA prob P224 PPARG	Kromozomal pozisyon	SONUÇ
92	Sentetik kontrol prob	2q14	1,01
175	Kontrol Prob 3780-L3289	17q11	1,09
184	PPARG Prob 6903-L7132	Ekzon 4	0,92
193	PPARG Prob 6906-L7672	Ekzon 7	1,04
202	Kontrol Prob 1706-L1274	16q24	1,01
211	PPARG Prob 6904-L7673	Ekzon 5	1,03
220	PPARG Prob 6907-L7133	Ekzon 8	0,98
229	Kontrol Prob 3560-L2926	3p21	1,13
238	PPARG Prob 6905-L6485	Ekzon 6	0,96
247	PPARG Prob 7470-L6479	Ekzon 1	1,00
256	Kontrol Prob 6113-L5568	3p25 (XPC)	0,95
265	PPARG Prob 6900-L6480	Ekzon 2	0,96
274	Kontrol Prob 2470-L1914	15q21	0,95
283	PPARG Prob 6901-L7674	Ekzon 2B	0,98
292	Kontrol Prob 5296-L4684	3q11	0,99
301	Kontrol Prob 2266-L1752	3p25 (GHRL)	1,05
310	Kontrol Prob 1293-L0838	9p21	1,04
319	PPARG Prob 6902-L6482	Ekzon 3	1,02
328	Kontrol Prob 2663-L2130	11q23	1,05

TARTIŞMA

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğinde, klinik ve biyokimyasal çalışmalarla Tip 2 diyabet tanısı almış 150 olguda Tip 2 diyabet hastalarına yönelik dizayn edilmiş Salsa MLPA Probemix P224 PPARG kiti kullanılarak, PPAR γ_1 transkriptini kodlayan 8 ekzondaki delesyon ve/veya amplifikasyonlar incelendi. MLPA yöntemiyle Tip 2 DM gelişiminde PPAR γ geninde delesyon ve duplikasyon varlığına ilişkin bir veri elde edilmedi. Buna neden olabilecek faktörler gözden geçirildi ve sonuçlar literatürdeki PPAR γ ve diyabet ilişkisini açıklamış olan bildiriler eşliğinde tartışıldı. Ayrıca ticari olarak MLPA'da kullanılmak üzere hazırlanmış olan probmiks kitinin, PPAR γ genindeki mutasyonların saptanmasındaki yeterliliği sorgulandı.

Tip 2 diyabet ve cinsiyet ilişkisiyle ilgili literatürde çeşitli bildiriler mevcuttur. Bazı etnik gruplarda kadın olgularda tip 2 diyabet prevalansının daha yüksek olduğu gözlenmesine karşın Lerman ve ark. Meksika'lı populasyonda erkeklerde tip 2 diyabet prevalansının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (25,26). Çalışmamızdaki olguların 67'si (%44,7) kadın ve 83'ü (%55,3) erkektir. Kadın olguların yaş ortalaması $56,95 \pm 8,65$, erkek olgularınsa yaş ortalaması $58,38 \pm 8,46$ olarak hesaplandı. Hastaların ilk olarak tip 2 diyabet tanısı aldıkları andaki yaş ortalaması kadınlar için $49,91 \pm 9,20$, erkekler için $50,95 \pm 9,01$ olarak saptandı. Bu çalışmadaki hasta grubumuzda 15.05.2008-20.08.2008 tarihleri arasında üniversitemize başvuran tip 2 diyabetli erkek olgu sayısının kadınlara oranla daha fazla olduğu görüldü.

Tip 2 diyabete genetik yatkınlığı olan birçok hastanın kilo almaya da yatkınlığı olduğu bilinmektedir. Ayrıca obezite de tip 2 diyabet için büyük bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (4). Amerika'da yaşayan Afrika kökenli populasyonda yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabet prevalansının sedanter yaşam ve obeziteyle arttığı bildirilmiştir (30). Diyabet hastası olan 3299 olgu üzerinde yapılan bir çalışmada, diyabetik kadınların %57,7'si obez ve %30,2'si ise kilolu bulunmuştur

(33). Yüksek vücut kitle indeksi (VKİ), birçok etnik grupta tip 2 diyabet gelişim riskini direkt olarak arttırmaktadır (30). Hasta grubumuzda ise; 65 kadın olgunun VKİ ortalaması $32,14 \pm 6,19$ iken 80 erkek olgunun VKİ ortalaması $28,09 \pm 4,43$ olarak hesaplandı. VKİ'ye göre kadın olguların %55,4'ü obez ve %23,1'i kilolu, erkek olguların ise %22,5'i obez ve %48,8'i kilolu olarak değerlendirildi. Bu çalışmada tip 2 diyabet'li olguların birçoğunun kilolu ve obez olması literatürdeki tip 2 diyabet ve obezite ile ilgili bildirilerle uyumludur. Bunun nedeni tip 2 diyabetli hastalarımızın genetik olarak obeziteye de yatkınlıklarının artmış olması olabilir. Bununla birlikte obezite tip 2 diyabete genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktör olarak etki gösterip tip 2 diyabet gelişimine katkıda bulunmuş da olabilir.

Ailesinde tip 2 diyabet öyküsü olan bir bireyde tip 2 diyabet gelişme riski, aynı öyküye sahip olmayan bireylere göre 2.4 kat daha yüksektir (5). Çalışmamızdaki olguların aile öyküleri incelendiğinde 150 olgunun 64'ünün (%42,7) akrabasında tip 2 diyabet öyküsü bulunmazken, 86 (%57,3) olgunun akrabalarında tip 2 diyabet öyküsü olduğu gözlenmiştir. Akrabasında tip 2 diyabet öyküsü olan bireylerin akrabalık dereceleri incelendiğinde, 86 olgudan 79'unun (%91,9) en az 1 ya da daha fazla birinci derece akrabasında tip 2 diyabet olduğu, 7 (%8,1) olgunun ise sadece 2. derece ya da daha uzak derece akrabalarında tip 2 diyabet olduğu saptanmıştır. Pierce ve ark. birinci derece akrabasında tip 2 diyabet bulunan kişilerin %15-25'inde bozulmuş glukoz toleransı ya da diyabet geliştiğini bildirmişlerdir (36). Çalışmamızdaki tip 2 diyabet olgularının ise %52,6'sının birinci derece akrabasında tip 2 diyabet bulunmuştur. Hasta grubunun akrabalarında tip 2 diyabet görülme sıklığının daha yüksek olması, etnik köken farklılığı nedeniyle olabileceği gibi farklı kültürel alışkanlıklar ve ortak çevresel faktörlerle de açıklanabilir.

Tip 2 diyabet etiolojisinde birçok genin birbiriyle etkileşmesi nedeniyle poligenik doğasına ilaveten obezite, fiziksel aktivite gibi çevresel faktörler bulunmaktadır. Multifaktöryel kalıtım özelliği olması, tip 2 diyabette tek bir genin fenotip üzerindeki etkisinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır.

İnsülin direnci tip 2 diyabetin karakteristik özelliğidir. İnsuline karşı doku düzeyinde direnç olduğu için, insülin karaciğerde glukoneogenezi baskılayıp, kas ve adipoz dokuda ise glukoz kullanımını uyaramaz. İnsülin direnciyle oluşan metabolik dengesizliğin düzeltilebilmesi için pankreas β -hücrelerinden insülin salınımı artar, fakat bu artış metabolik bozukluğu düzeltmede yeterli olamaz. İnsülin direncinin metabolik etkisi, özellikle karaciğer, kas ve adipoz dokularda lipid ve glukoz homeostaz bozukluğu olarak kendini gösterir (58).

PPAR γ 'nın gen, protein ve metabolik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, bu proteinin glukoz homeostazında rolü olduğunu göstermiştir. Bu proteinin glukoz homeostazındaki etkisi, PPAR γ 'da bazı dominant negatif etkili mutasyonların gösterilmesiyle daha fazla desteklenmiştir. Örneğin, PPAR γ_2 Pro12Ala polimorfizmi olan bireylerde vücut kitle indeksi düşüktür ve bu bireylerde insülin duyarlılığı artar. Fakat PPAR γ 'da dominant negatif mutasyonların saptandığı kişilerde parsiyel lipodistrofi, ciddi insülin direnci, diyabet ve hipertansiyon gözlenmiştir (58). Ayrıca yapılan bir çalışmada PPAR γ 'da S112A mutasyonu bulunan farelerde bu mutasyonun, fareleri obeziteyle ilişkili insülin direncine karşı koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (67).

İnsülin direncini azalttığı için kullanılan Thiazolidinin (TZD), PPAR γ 'ya yüksek afinitesi bulunur. Bu PPAR γ ligandı, insülin duyarlılığını arttırma etkisini ise büyük olasılıkla PPAR γ üzerinden gerçekleştirmektedir. Örneğin TZD etkisiyle PPAR γ 'nın ekspresyonunun çok artması ve aktivasyonu, adiposit farklılaşmasını uyarak, küçük adipositlerin sayı olarak artmasıyla sonuçlanır. Bu küçük adipositlerin insülin duyarlılığı ise büyük adipositlere göre daha yüksektir (68). Bununla birlikte TZD'nin insülin duyarlılığını arttırma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. TZD'nin insülin duyarlılığını arttırdığını gösteren bildiriler olsa da, bu ilacın insülin duyarlılığını arttırıcı etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (58). Örneğin fare modeliyle yapılan bir çalışmada, Pparg geni heterozigot knockout (Pparg^{+/-}) olan tek kopya Pparg geni bulunan farelerin, yabanıl tipe göre insülin duyarlılığının daha yüksek olduğu bulunmuştur (69). Bu da PPAR γ 'nın

insülin duyarlılığı üzerinde etkisiyle ilgili mekanizmaların aydınlatılabilmesi için araştırılması gereken çok fazla yolak olduğunu göstermektedir (58).

PPAR γ 'nın farklı dokulardaki insülin duyarlılığı üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Karaciğerde normalde PPAR γ 'nin ekspresyonu çok düşük seviyededir. Fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, obez ve diyabetik farelerin karaciğerlerinde PPAR γ ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte TZD verilen farelerin karaciğerlerinde, PPAR γ 'nın hedef genlerindeki ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. Bu da obezite ve tip 2 diyabette kullanılan PPAR γ agonistlerinin, lipid metabolizması ve enerji dengesi üzerindeki etkilerinin bir kısmının karaciğer üzerinden olduğunu göstermektedir. Karaciğerde PPAR γ 'nın insülin direnci üzerindeki etkisi, fare modelleri kullanılarak yapılan birçok çalışmada incelenmiştir. Kas dokusuna özgün Pparg gen delesyonu olan farelerde ise, kas dokusunun insülin cevabında değişiklik olmadığı, fakat tüm vücut insülin direncinde karaciğer insülin direncine sekonder olarak artma olduğu gözlenmiştir (70).

PPAR γ 9 ekzonlu bir gen olup alternatif kesip-ekleme ile PPAR γ_1 ve PPAR γ_2 olmak üzere iki protein izoformu oluşturmaktadır (57,58). PPAR γ genindeki farklı mutasyonların tip 2 diyabetle ilişkisini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Bu mutasyonlar proteinin farklı bölgelerini etkileyerek fonksiyonunu değiştirmektedir. PPAR γ 'da bazı nokta mutasyonları (yanlış anlamlı, anlamsız, sessiz mutasyonlar gibi) saptanmış olup çok nadir olarak küçük delesyonlar da bildirilmiştir. Bu mutasyonların bir kısmı tip 2 diyabetle doğrudan ilgili olarak görülmüşse de, aynı mutasyonlar için bunun aksini gösteren yayınlar da mevcuttur. Bununla birlikte PPAR γ mutasyonlarının bir kısmının tip 2 diyabetle ilişkili başka hastalık ve durumlara (insülin direnci, obezite, parsiyel lipodistrofi gibi) yol açtığı gösterilmiştir (8,9).

Literatürde özellikle PPAR γ_2 geni 12. kodonunda yanlış anlamlı mutasyon (CCA-GCA)P12A polimorfizmi ile ilgili çok sayıda bildiri vardır. Bu aminoasit yer değişimi PPAR γ_2 proteininin AF1 bölgesinde olmaktadır. Ala allelinin etnik kökene göre tip 2 diyabetten koruyucu etkisinin, obezite üzerine etkilerinin ve çevresel

faktörlerle etkileşiminin olabileceğini gösteren yayınlar vardır (8,9). PPAR γ_2 izoformunda Pro yerine Ala aminoasidinin bulunması, proteinin DNA üzerindeki PPRE'ye bağlanma afinitesinde azalma ve transkripsiyon aktivitesinde düşmeyle sonuçlanmaktadır. Bu azalmanın insülin duyarlılığını düzelttiği ve bu nedenle tip 2 diyabetten koruyucu etkisinin olduğu düşünülmektedir (9).

1999 yılında Barroso ve ark. ciddi hiperinsülinemi, hipertansiyon ve dislipidemi görülen 3 hastada, PPAR γ ligand bağlayan bölgesini ilgilendiren 2 mutasyon saptamışlardır (71). Pro467Leu ve Val290Met mutasyonlarının liganda bağlanmada kısmi eksikliğe neden olduğu ve transkripsiyonel aktivitede azalmayla sonuçlandığı gösterilmiş, ayrıca *in vitro* çalışmalarda bu iki mutasyonun dominant negatif etkili mutasyon olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların ligand bağımlı aktivasyonu azalttığı ve koaktivatörlerle etkileşimi bozduğu gözlenmiştir. Bu iki mutasyonun dominant negatif etkisinin tirozin içerikli PPAR γ ligandlarıyla azaltılabildiği ancak TZD'nin ise dominant negatif etkiyi düzeltmediği görülmüştür. Bu 3 hastanın da vücut kitle indeksi normal olarak bulunsa da PPAR γ 'nın lipid metabolizmasındaki öneminden dolayı hastaların fizik muayenesi dikkatli yapıldığında, ekstremiteleri ve gluteal bölgeyi tutan parsiyel lipodistrofi olduğu gözlenmiştir. Bu hastaların, periferik dokuda insüline duyarlı glukoz kullanımının ve karaciğerden glukoz salınımının bozulduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Pro467Leu mutasyonu bulunan proband hastanın, 3 ve 9 yaşındaki iki çocuğunda da bu mutasyon gözlenmiş ve bu çocukların plazmadaki açlık insülin seviyesinin 3-4 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu insülin seviyesi yüksekliğinin de insülin direnci nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Bu hastalarda dominant negatif mutasyon bulunmasına rağmen, rosiglitazon tedavisiyle toplam vücut yağ oranında artma gözlenmiştir (9,71).

Agarwal ve Garg tarafından parsiyel lipodistrofili bir hastada PPAR γ geninde Arg425Cys mutasyonu saptanmıştır (72). PPAR γ geninde, 6. ekzon 1273. nükleotidde lokalize olan bu mutasyon 425. pozisyondaki yüksek derecede korunmuş olan arginin yerine sistein geçmesiyle sonuçlanır. Bu mutasyon PPAR γ proteininde ligand bağlayan bölgede lokalizedir. Bu hastanın 32 yaşında diyabet ve

hipertrigliseridemisinin geliştiği, ekstremite ve yüzünde ise subkutan yağ dokusu kaybı olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonun fonksiyonel etkisi bilinmese de Arg425'in protein katlanmasının düzgün bir şekilde gerçekleşmesinde kritik bir önemi olabileceği düşünülmektedir (9,72).

Hegele ve ark. 3 kuşağında parsiyel lipodistrofli hastalar bulunan bir ailede yaptıkları çalışmada, PPAR γ 'da yeni bir yanlış anlamlı mutasyon (Phe388Leu) saptamışlardır (73). PPAR γ 5. ekzonunda, 1164. nükleotidde T→A transversiyonu nedeniyle oluşan bu mutasyon sonucunda, 388. kodonda fenilalanin yerine lösin geçmektedir. Bu mutasyon da PPAR γ proteininde ligand bağlayan bölgede lokalizedir. Mutasyonu taşıyan hastaların hepsinde hiperinsülinemi, hiperlipoproteinemi ve hipoalfalipoproteinemi tespit edilmiştir. Fonksiyonel olarak bu mutasyonun bazal transkripsiyon aktivitesini bozduğu ve rosiglitazona karşı reseptör afinitesini azalttığı bulunmuştur. Bu mutasyon haployetersizlikle sonuçlanmakta ancak Pro467Leu ve Val290Met mutasyonları gibi dominant negatif etki göstermemektedir (9, 73).

PPAR γ 'nın ligand bağlayan bölgesini etkileyen Pro467Leu, Val290Met, Arg425Cys ve Phe388Leu mutasyonları reseptörün aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. PPAR γ fonksiyonu ve hastalıkla ilişkisini belirleyen faktör ise bu mutasyonların PPAR γ 'nın aktivitesinde ne derece düşme oluşturmasıyla ilgilidir. Bu hastaların hepsinde mutasyonlar heterozigot olarak bulunmuştur. Ancak bu mutasyonlarda dominant negatif özellik olabileceği gerçeğinin bilinmesi önemlidir. Çünkü dominant negatif mutasyon varlığında yabancı proteinin aktivitesi de inhibe edilmektedir. Dominant negatif aktivitesi bulunan Pro467Leu ve Val290Met mutasyonları varlığında, mutant PPAR γ yabancı PPAR γ 'nın transkripsiyonel aktivitesini inhibe etmektedir. Etkilenen bireylerde PPAR γ aktivitesinin %50'den düşük olması beklenir. Ancak dominant negatif özelliği bulunmayan Phe388Leu mutasyonu varlığında, bireylerdeki PPAR γ aktivitesinin %50'den yüksek olacağı düşünülür. PPAR γ aktivitesindeki küçük farklılıklara rağmen ligand bağlayan bölgede mutasyonu olan bu hastaların hepsinde parsiyel lipodistrofi, insülin direnci, diyabet, dislipidemi ve hipertansiyon gibi benzer bulgular vardır (9).

Bununla birlikte PPAR γ aktivitesiyle metabolik hastalıklar arasında basit bir ilişki olmadığı da gözlenmiştir. Pro12Ala polimorfizminin PPAR γ aktivitesinde hafif bir düşmeye sebep olurken, diyabet riskinin düşmesiyle de ilişkili bulunması buna iyi bir örnektir (43). Bunun sebebi lipodistrofi ile ilişkili mutasyonların, Pro12Ala polimorfizminin aksine PPAR γ_1 izoformunu da etkilemesi ya da ligand bağlayan bölgede gerçekleşen mutasyonların fizyolojik etkisinin daha güçlü olması olabilir. Ayrıca bu mutasyonların fenotipik etkilerinin farklı olmasının bir nedeninin de, glukoz homeostazının sağlanmasında pankreasta ya da periferik dokudaki bilinmeyen başka modifiye edici genler olabileceği düşünülmektedir (9).

Ristow ve ark. PPAR γ geninde fonksiyon kazandırıcı özellikte olan Pro115Gln mutasyonunu tanımlamışlardır. Obez Almanların %3'ünde (121 bireyde 4 kişi) bu mutasyon tespit edilmiş ancak normal kilolu olanların hiçbirinde (%0) bu mutasyon görülmemiştir (74). Bu mutasyon, PPAR γ 'nın 2. ekzonunda, G \rightarrow T transversiyonu sonucu oluşmaktadır ve 115. kodonda prolin yerine glutamin gelmektedir. Bu mutasyon sonucu 115. lokusta glutamin olması, bu lokusa bitişik olan 114. lokusta yerleşmiş olan serin rezidüsünün mitojen-aktivasyonlu protein (MAP) kinaz tarafından fosforillenmesini inhibe etmektedir (9,74). PPAR γ 'nın bu serin rezidüsünün fosforilasyonunun ise, transkripsiyon aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (75,76). Bu nedenle bu mutasyon PPAR γ geninde fonksiyon kazandıran mutasyona neden olmaktadır. Fakat bu mutasyonla ilgili yapılan başka çalışmalarda, bu mutasyonun obezite ve diyabetle ilişkili olduğu görüşü tam olarak desteklenememiştir (9,77,78).

Savage ve ark. tarafından ciddi insülin direnci etyolojisine yönelik yapılan bir çalışmada bir ailede PPAR γ geninde 185stop mutasyonu ([A⁵⁵³ Δ AAAiT])fs.185[stop186]) bildirilmiştir (79). Bu mutasyon insülin direnci ve diyabetteki kompleks genetik profili ortaya koymaktadır. Daha önce tanımlanmış ve aminoasit yer değiştirmesine dayanan mutasyonların aksine, bu mutasyonda çerçeve kayması mutasyonu sonucu 185. kodonda oluşan prematür sonlanma kodonu saptanmıştır. PPAR γ proteininin DNA bağlayan bölgesine karşılık gelen bu sonlanma kodonu sonucu kırpılmış kısa bir protein ortaya çıkmakta, reseptör

DNA'ya bağlanamamakta ve transkripsiyon aktivitesi de gösterememektedir. Daha ilginç sadece bu mutasyonu taşıyan bireylerde bulgu veren bir metabolik bozukluk saptanamamıştır. Oysa PPAR γ genindeki bu mutasyon ile kasa özgün düzenleyici alt ünite proteini fosfataz 1'i kodlayan protein fosfataz düzenleyici altünite 3 (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3, PPP1R3) genindeki mutasyon birlikteliği söz konusu olduğunda, yani birleşik heterozigot mutasyon taşıyıcılığı durumunda ise, ciddi insülin direnci gözlenmiştir. Aynı şekilde sadece PPP1R3 geninde mutasyon taşıyan bireylerde de belirgin bir metabolik bozukluk olmaması, tip 2 diyabette poligenik etkileşimin önemini vurgulamaktadır (9,79).

Francis ve ark. parsiyel lipodistrofisi bulunan 45 yaşındaki anne ve lipodistrofi tespit edilmeyen 12 yaşındaki kızında anlamsız mutasyon (Tyr355X) saptamışlardır. Annede ciddi insülin direnci, diyabet ve ağır hipertrigliserideminin 35 yaşında başlamış olduğu bildirilmiştir. Kızında ise hipertrigliseridemi, yüksek C-peptid düzeyi ve düşük plazma HDL düzeyi görülmüştür. Oluşan PPAR γ 'nın %30'u eksik olan kırpılmış kısa bir protein olduğu ve transkripsiyonel aktivite göstermediği ve bu mutasyonun haployetmezlikle sonuçlandığı bildirilmiştir (8,80).

Agostini ve ark. ise lipodistrofik insülin direnciyle ilgili olarak PPAR γ geninde 315stop ([A⁹³⁵ Δ C]fs.312[,stop315]), Arg357X, Cys131Tyr, Cys162Trp, Cys114Arg olmak üzere 5 yeni mutasyon tanımlamışlardır. Cys114Arg, Cys131Tyr ve Cys162Trp mutasyonları PPAR γ 'nın DNA bağlayan bölgesinde yer almaktadır ve bu mutasyonları taşıyan PPAR γ 'ların hedef DNA'ya bağlanamadığı gösterilmiştir. Anlamsız mutasyon (Arg357X) ve çerçeve kayması/prematür sonlanma kodonu (315stop) mutasyonu sonucu ligand bağlayan bölgeden kırpılmış kısa bir reseptör oluşmaktadır. Bu 5 mutasyon da fonksiyon kaybettiren ve yabancı tip PPAR γ 'yı inhibe eden dominant negatif mutasyonlardır. Bu mutasyonları heterozigot olarak taşıyan bireylerde ciddi insülin direnci, karaciğerde yağlanma ve parsiyel lipodistrofi bildirilmiş, bazı hastalarda ayrıca hipertansiyon da gözlenmiştir (81). Bu mutasyonlar PPAR γ 'nın glukoz homeostazındaki rolünü desteklemektedir. Ancak olgulardaki insülin direncinin, PPAR γ 'daki mutasyon sonucu insülin sinyal iletiminin

bozulmasından mı yoksa olgulardaki adipoz dokunun azalmasına cevap olarak mı geliştiği bilinmezliğini korumaktadır (8).

Hegele ve ark. 37 yaşında tip 2 diyabet tanılı ve parsiyel lipodistrofisi olan bir kadında, PPAR γ 'da 4 nükleotidlik delesyon sonucu çerçeve kayması (E1 38fs Δ AATG) saptamışlardır. Bu mutasyon sonucunda 137 aminoasitli %73'ü kırpılmış kısa bir PPAR γ_2 izoformu kodlanmaktadır. Delesyonun DNA bağlayan bölgede olduğu ve haployetmezlikle sonuçlandığı bildirilmiştir (82).

Al-Shali ve ark. intronda lokalize olan ve 1. ekzonun 14 nükleotid upstream lokusunda yer alan (PPAR γ promotor 4 varyant A-14G) promotor mutasyonu bildirmişlerdir. Bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bir ailedeki bireylerde parsiyel lipodistrofi ve tip 2 diyabet ya da insülin direnci olduğu görülmüştür (83).

Diyabette büyük gen delesyonlarının varlığı ilk olarak gençlerde görülen erişkin tipi diyabette (Maturity onset diabetes of young-MODY) bildirilmeye başlanmıştır. MODY tipik olarak primer insülin sekresyon bozukluğu olan ve etkilenen bireyde ketotik olmayan diyabetin 25 yaşından önce başlaması ile karakterize bir hastalıktır. MODY'nin etyolojisinde glukokinaz (MODY tip 2), hepatosit nükleer faktör-4 α (HNF-4 α ; MODY1), HNF-1 α (TCF1; MODY3), insülin promotor faktör 1 (MODY4), HNF-1 β (TCF2; MODY5) ve nörojenik farklılaşma faktörü (MODY6) olarak 6 gen bildirilmiştir. Glukokinaz geni enzim kodlarken diğerleri transkripsiyon faktörlerini kodlarlar (84). MODY'de en sık görülen glukokinaz (GCK) ve hepatosit nükleer faktör-1 alfa (HNF1 α) genlerinin heterozigot mutasyonlarıdır (85). Ancak yakın bir zaman içinde böbrek kistleri ve diyabete neden olan mutasyonların üçte birinden, Hepatosit nükleer faktör-1-Beta (HNF1 β) olarak da bilinen hepatik transkripsiyon faktör 2 (TCF2) genindeki delesyonların sorumlu olduğu öğrenilmiştir (84).

Bellanne'-Chantelot ve ark. kliniği ve aile hikayesi MODY ile uyumlu olan ancak MODY genlerinde mutasyon saptanamayan hastalarda (MODYX-hastaların %20-40'ı), mutasyon tespit edilememesinin nedeni olarak, tanımlanmamış başka

MODY genlerinin etyolojide rol alması olabileceği gibi, bilinen MODY genlerindeki mutasyonların konvansiyonel tarama yöntemleriyle atlanıyor olabileceği hipotezini kurmuşlardır. Özellikle hereditör nonpoliposis kolorektal kanserinde yanlış eşleşme tamir genlerindeki delesyon ve duplikasyonlar, meme ve over kanseri için yüksek riskli aile bireyleri gibi başka monogenik hastalıklarda gözlenen büyük genomik yeniden düzenlenmelerin moleküler defektlerin yaklaşık %20'sini oluşturması da bu hipotezlerini destekleyen gözlemlerdir. MODY'de büyük genomik delesyon varlığında, mutasyon analizinde her bir ekzonun PCR ile amplifikasyonu sonrası dizi analizi yapıldığı takdirde, tek yabancı tip allelin amplifikasyonu gerçekleşeceğinden yanlış- negatif (false-negatif) sonuç verebilmektedir. Böylelikle MODY tip 5'te (MODY5) mutasyon tespit edilemeyen %60'luk grubun bundan dolayı saptanamıyor olabileceğini söylemişlerdir (84). MODY5 erken başlangıçlı diyabet ve böbrek hastalıklarının birlikteliği şeklinde tanımlanmaktadır. **MODY5'te** TCF2'de yanlış anlamlı, anlamsız, küçük insersiyon ve delesyon mutasyonları, kesip-ekleme bölgesi mutasyonları ya da tek ekzon delesyonu bildirilmiştir (86). Bununla birlikte Bellanne-Chantelot ve ark. MODY5 fenotipi olan ve TCF2 geninde nokta mutasyon tespit edilememiş kişilerin yarısında, kısa floresan fragmanların kantitatif multipleks PCR (Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments, QMPSF) metodu ile TCF2 geninde büyük genomik delesyonlar bildirmişlerdir. Bu durumda MODY5'in %70'inden; TCF2'deki nokta mutasyonları, küçük delesyon/insersiyonlar ve büyük genomik yeniden düzenlenmeler sorumlu tutulmuştur (84).

Daha sonra Carette ve ark. 2007 yılında Fransız bir ailede MODY5'te, hepatik TCF2'nin 5. ekzonunda duplikasyon olduğunu QMPSF metodunu kullanarak saptamışlardır (86).

Çalışmamızda bundan dolayı tip 2 diyabette, PPAR γ geninde büyük delesyon ve duplikasyonların varlığının araştırmasına karar verildi. Tip 2 diyabetin multifaktöryel kalıtmı bir hastalık olması nedeniyle poligenik doğası ve çevresel faktörlerin genler üzerindeki etkisi, tip 2 diyabet için hangi aday gende dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmenin seçileceğinde kararı güçleştirmektedir. Bu

çalışmada, PPAR γ geninde gösterilen ve yukarıda belirtilen mutasyonların tip 2 diyabet ve insülin direnciyle ilişkili durumlarda da (obezite, ailesel parsiyel distrofi tip 3 gibi) saptanması nedeniyle bu aday genin çalışılması uygun görüldü. PPAR γ 'da yukarıda belirtilen bazı mutasyonlar sonucu oluşan kırpılmış kısa proteinlerin, dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmeler sonucu da oluşabileceği düşünüldü. Bununla birlikte bu büyük delesyon ve duplikasyonların PCR, RFLP ve dizi analizi gibi konvensiyonel metodlarla tespit edilemiyor olabileceği hipotezi kuruldu.

Schouten ve arkadaşları tarafından 2002 yılında MLPA yönteminin tanımlanmasından sonra MLPA yöntemi birçok hastalıkta ilgili genlerdeki delesyon ve duplikasyonların araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır (6). MLPA delesyon ya da duplikasyonlar dışında ligasyon bölgesindeki nokta mutasyonların tespitinde de kullanılabilir (65).

Çalışmamızda büyük genomik yeniden düzenlenmelerin tespiti için yöntem olarak MLPA tercih edildi. Bunun nedeni MLPA'nın ucuz ve uygulanması kolay bir yöntem olması ayrıca tek reaksiyonda farklı lokuslara bakabilmeye olanak vermesidir. Bu amaçla MLPA'nın problemlerini dizayn eden MRC-Holland'ın tip 2 diyabette PPAR γ geni için hazırladığı probmiks kiti kullanıldı.

MLPA'nın diyabet etiolojisindeki genler için ilk kullanımı 2006 yılında Ellard ve çalışma grubu tarafından MODY5'le ilişkili bir hastalık olan renal kist ve diyabet sendromunda (Renal Cysts And Diabetes, RCAD) TCF2'deki büyük delesyon ve duplikasyonların araştırılması ile olmuştur. Bellanne'-Chantelot ve arkadaşlarının bulduğu TCF2'deki büyük gen delesyonlarının MODY5'li olgularda mutasyonların yaklaşık üçte biri kadarı olduğu bulgusunu, RCAD'li olgularda MLPA ile saptayarak daha önceki çalışmayı destekleyici bir sonuç elde etmişlerdir (84,85). Daha sonra 2007 yılında ise Ellard ve ark. MLPA'nın diyabette büyük genomik yeniden düzenlenmeleri bilinmeyen genler için kullanımını yine MODY'de yapılan çalışmalarla bildirmişlerdir. Araştırmacılar, İngiltere'de MODY1, MODY2 ve MODY3 klinik kriterlerine uyan ancak dizi analizinde sırasıyla HNF4 α , HNF1 α ve GCK genlerinde mutasyon saptanmamış bireylerde bu genlerdeki dengesiz

genomik yeniden düzenlenmelerin prevalansını hesaplamayı amaçlamışlardır. Bu 3 gendeki toplam 30 ekzon için sentetik oligonükleotid problemleri kullanmışlardır. Bunun sonucunda 29 hastanın birinde (%3.5) GCK geninde delesyon, 60 hastanın dördünde ise (%6.7) HNF1 α geninde parsiyel ya da tam gen delesyonu saptamışlardır. Bunlar GCK'nın 2. ekzonu, HNF1 α 1. ekzonu, HNF1 α 'nın 2. ekzonundan 10. ekzonuna kadar bir bölge ve HNF1 α 'nın 1. ekzonundan 10. ekzonuna kadar olan 4 farklı gen delesyonudur. Delesyon saptanan bu kişilerin ailelerinde diyabet olanlarda da bu delesyonlar bulunmuştur. Ellard ve ark. büyük delesyonların dizi analiziyle tespit edilemeyeceğinden, MODY'den kesinlikle şüphelenilen olgularda, gen dozaj analizi temeline dayanan MLPA'nın kullanılabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (85).

Ancak tip 2 diyabetli hastaların ailelerinde tip 2 diyabetli bireylerin görülme olasılığı her ne kadar yüksek olsa da MODY gibi otozomal dominant kalıtım paterni göstermemektedir. Poligenik ve multifaktöryel kalıtım özelliklerine sahip tip 2 diyabette, literatürde PPAR γ mutasyonu tespit edilmiş olgular bulunmakla birlikte, PPAR γ 'da büyük delesyon ya da duplikasyon varlığıyla ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada ticari olarak dizayn edilen probmik kiti kullanılarak 150 tip 2 diyabet tanılı hastanın delesyon ve duplikasyonları araştırıldı ve dengesiz yeniden düzenlenmeyle uyumlu bir veri elde edilmedi.

MLPA'da kullanılan ve ticari firmanın dizayn ettiği problemler DNA üzerinde yaklaşık 20 ile 35 nükleotidlik bir bölgeye hibridize olmaktadır. Delesyon ve duplikasyon tayini, problemlerin PCR amplifikasyonu sonrasında kapiller elektroforez cihazından alınan pik alanlarına göre gen dozaj analizine dayanmaktadır. Problemler PPAR γ_1 üzerinde bulunan 8 ekzona göre dizayn edilmiştir. İkinci ekzonun varyantı olması nedeniyle bu ekzon için varyantı da içerecek şekilde 2 prob dizayn edilmiş, sonuç olarak PPAR γ 'daki delesyon ve duplikasyon tayini için 9 probu olan bir probmik kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgu grubunda PPAR γ 'da delesyon ya da duplikasyon saptanmamasının sebebi; genomik yeniden düzenlenmelerin bu problemlerin uyumlu olduğu ekzonlar üzerindeki dizilerden farklı bir ekzon ya da intron bölgesinde olması olabilir. Bu durumda farklı dizilerle hibridize olacak şekilde yeni

prob dizaynları, Şu anda kit içeriğinde var olan problemlerin hedef bölgelerinden farklı bir lokalizasyonda olan mutasyonları atlamasına engel olabilecektir. DNA dizi analizi yöntemi kullanarak ilgili bölgelerin taranması ile ekzon içindeki küçük delesyonların tespiti mümkün olabilir. Ancak bu yöntem, büyük delesyon ya da duplikasyonun olmadığı durumlarda kullanılabilir bir yöntemdir. MLPA'ya alternatif olarak Büyük aralıklı PCR (long range PCR) ile delesyon ve duplikasyonların varlığı araştırılabilir. QMPSF ve kantitatif eş zamanlı PCR (Real time PCR) gibi PPARγ üzerindeki başka dizilere bakacak Şekilde dizayn edilmiş prob ya da primerler kullanabilen, gen dozaj analizine izin veren, büyük duplikasyon ve delesyonların tespitinde kullanılmaya elveriŐli yöntemler ile MLPA desteklenebilir.

PPARγ üzerinde daha önceden diyabet ve ilişkili hastalıklarda gösterilen mutasyonlara bakıldığında bu mutasyonların hepsinin ekzon üzerinde olmadığı görülmektedir. Örneğın promotor bölgede lokalize olan mutasyonlar sonucu diyabet ve insülin direnciyle ilişkili hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Kullanılan probmiksteki problemlerin hepsinin ekzonlara göre dizayn edilmiş olması da, ekzon dışında yerleşmiş olan bu promotor bölgedeki genomik yeniden düzenlenmeleri göstermeyeceğini için bu bölgelerdeki delesyon ya da duplikasyon varlığı değeriendirilememiŐtir. MLPA'da yaklaşık olarak 45 probun aynı anda kullanılabilmesi; tip 2 diyabet için kullanılan probmiksteki prob sayısının arttırılmasına olanak vermektedir. İleride dizayn edilecek problemlerde promotor bölgelerinin de dŐnelerek probmiks kitinin hazırlanması, bu bölgelerin taranmasına da olanak sağlayabilecektir.

Kullanılan problemlerin PPARγ üzerinde hibridize olduğu yerlere bakıldığında, hiçbirinin daha önce tanımlanmış mutasyon görülen bölgelere göre dizayn edilmediğini görüldü. Yetkili firma olan MRC-Holland'la da görüŐüldüğünde bu tespitın doğru olduğu öğrenildi. Her ne kadar MLPA yöntemindeki prob dizaynında, esas olarak bölgedeki dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmelerin tespiti hedefleniyor olsa da, PPARγ üzerinde mutasyona yatkın (hotspot) bölgelerin varlığı bilinmemektedir. Ancak PPARγ üzerinde yukarıda belirtilen nadir görülen

mutasyonları da kapsayacak şekilde problemler dizayn edilebilir. MLPA'nın en önemli özelliklerinden birisi de nokta mutasyonlarını saptayacak şekilde dizayn edilebilmesidir. Nokta mutasyonu için taranacak bölge ligasyon bölgesinde olacak şekilde problemler dizayn edildiğinde nokta mutasyonları belirlenebilir. Problemler normal DNA dizisiyle hibridize olacak şekilde dizayn edildiği takdirde, 5' oligonükleotid ve 3' oligonükleotidin ligasyon bölgesindeki mutasyon sonucu ilgili bölgede iki oligonükleotidin birleşmemesi sonucu, pik alanında delesyon benzeri azalma olacaktır. Problemler mutasyonlu DNA dizisiyle hibridize olacak şekilde dizayn edildiğinde ise ancak pik görüntüsü alınan olgularda mutasyon olduğu sonucu çıkarılır. Çalışmamızda tip 2 diyabet için kullanılan probmikste daha önceden literatürde tespit edilmiş bazı nokta mutasyonları için problemler da yerleştirildiğinde, MLPA ile hastalarda büyük genomik yeniden düzenlenmelerle beraber bazı nokta mutasyonlarını da tarama şansı elde edilebilir. Bütün bunların tek reaksiyonda gerçekleşiyor olması sayesinde de, MLPA için ayrılan aynı sürede daha çok yer taranabilir. Böylelikle MLPA ile bu bölgelerin hibridizasyon durumuna bakılarak değerlendirilmesi, dizi analizi öncesi fikir verebilir.

Bu çalışmada her ne kadar tip 2 diyabet hastalarında delesyon görülmemiş olsa da, MLPA'da delesyon görülmesi bu bölgede mutlaka delesyon olduğu anlamına gelmemektedir. Çünkü problemlerin komplementer olduğu DNA dizilerinde olabilecek bir nokta mutasyonu da, probun ilgili diziyeye hibridize olamamasına neden olabilecek ve analiz sırasında da bu bölgede gen dozajında eksiklikle sonuçlanan bir delesyon olduğu şeklinde yorumlanmasına neden olabilecektir. Bundan dolayı delesyon saptandığı takdirde, ilgili bölgenin dizi analizi ile o bölgede nokta mutasyonu olmadığının gösterilmesi önem taşımaktadır. Fakat burada dikkatli olunması gereken önemli bir konu vardır. Heterozigot olarak büyük bir delesyon olduğu takdirde, dizi analizinde dizi tamamen normal görülebilir. Dizi analizi öncesi yapılan PCR amplifikasyonunda, primerlerin büyük delesyon olan bölgedeki diziyeye bağlanamayabileceği ve yabancı tip alleldeki bölgeyi amplifiye ederek, dizi analizinde tamamıyla normal bir görüntü verebileceği her zaman akılda tutulmalıdır. Bunun içinse dizi analizi öncesi kantitatif eş zamanlı PCR veya QMPSF ile ilgili bölgenin incelenmesi uygun olabilir.

PPAR γ_2 AF1 bölgesinde, PPAR γ_1 proteininin AF1 bölgesine göre fazladan 28 aminoasit bulunmaktadır. Bu 28 aminoasit PPAR γ genindeki ekzon B ile kodlanmaktadır. PPAR γ_2 mRNA'da alternatif kesip-ekleme sonucu ekzon B bulunurken, PPAR γ_1 mRNA'dan alternatif kesip-ekleme ile bu ekzon çıkarılır. Pro12Ala polimorfizmi bu 28 aminoasit içinde yer almaktadır. MLPA'da satıcı firma olan MRC-Holland'ın PPAR γ_1 için dizayn edilmiş problemleri ile toplam 8 ekzona bakılabilmektedir. Bu ekzonların 6 tanesi PPAR γ_2 'yle ortaktır. Fakat 2 ekzon PPAR γ_2 'de değil PPAR γ_1 'de bulunmaktadır ve bu ekzonlar da kodlanmamaktadır (58). Yani bu problemler PPAR γ_2 'ye özgün olan ekzon B'deki delesyon ve duplikasyonları saptayamamaktadır. Bu problemler kiti içinde ekzon B için prob bulunmaması bir diğer eksiklik olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızdan tip 2 diyabet ve polimorfizm ilişkisi açısından en fazla araştırılmış Pro12Ala polimorfizminin bulunduğu ekzon B'nin büyük genomik yeniden düzenlenmelerinin araştırılması açısından gerekli bir bölge olduğu ve bu bölgeye özgün probun da problemlerin içinde yer alması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

Çalışmamızda, MODY ile ilişkili genlerde büyük gen delesyon ve duplikasyonlarının saptanmış olması nedeniyle, tip 2 diyabet ile ilişkili genlerden olan PPAR γ geninde de büyük delesyon ve/veya duplikasyonların olabileceği hipotezi ile bu gen MLPA ile incelenmiştir. Ancak bu çalışmada eksik kalan yönler de bulunmaktadır. MLPA yönteminin PPAR γ geninde delesyon ve duplikasyonların saptanmasındaki kullanımı, başka bir yöntemle karşılaştırılamamıştır. Çalışmamızda mutasyon olduğu bilinen ve başka bir yöntemle mutasyon saptanmış bir olgu bulunmamaktadır ve bu nedenle MLPA ile bilinen bir mutasyonun tespiti hedeflenmemiştir. MLPA yöntemi ile delesyon ve duplikasyon tespit edilmediğinden ilgili bölgedeki mutasyon başka bir yöntemle de doğrulanamamıştır. Bütün bunların yanısıra başka bir yöntemle yapılacak bir araştırma ve olgu sayısının artırılması için bu projenin bütçesi sınırlı kalmaktadır.

Sonuç olarak yukarıda anlatılan sebeplerden dolayı ticari firmanın tip 2 diyabet için hazırladığı bu problemler kitinin, delesyon ve duplikasyonları saptamada yeterli olamayacağı düşünülmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, yukarıda

detayları ile açıkladığımız gerekçeler çerçevesinde farklı problemlerin yer aldığı probmiksin kullanıldığı, MLPA yöntemi ile, PPAR γ 'da delesyon ve/veya duplikasyonların varlığı araştırılabilir. Bununla birlikte tip 2 diyabette PPAR γ 'da dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmeler bulunmayabileceği, başka genlerde de büyük genomik delesyon ve duplikasyonlar olabileceği akılda tutulmalıdır. Ancak tip 2 diyabetin etyolojisinde yer alan genlerin tam olarak aydınlanmamış olması ve gelişiminde çevresel faktörlerin etkisi, bu hastalık için etiyolojide sebep sonuç ilişkisini ortaya koymadaki güçlüğü de her zaman beraberinde getirecek gibi görünmektedir.

SONUÇLAR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne 15.05.2008-20.08.2008 tarihleri arasında başvuran klinik ve biyokimyasal çalışmalarla Tip 2 diyabet tanısı almış 150 olgunun PPAR γ geninin MLPA yöntemiyle incelendiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1) Hasta grubumuzda; 65 kadın olgunun VKİ ortalaması $32,14 \pm 6,19$ iken 80 erkek olgunun VKİ ortalaması $28,09 \pm 4,43$ olarak hesaplandı. VKİ'ye göre kadın olguların %55,4'ü obez ve %23,1'i kilolu, erkek olguların ise %22,5'si obez ve %48,8'si kilolu olarak değerlendirildi.

2) Tip 2 diyabetli olguların akrabalarında da tip 2 diyabet görülme sıklığı artmaktadır. Çalışmamızdaki olguların %52,6'sının birinci derece akrabasında tip 2 diyabet olduğu görüldü.

3) Bu çalışmaya dahil edilen gönüllü olgular cinsiyetleri açısından değerlendirildiğinde; tip 2 diyabetli erkek olgu sayısının kadınlara oranla daha fazla olduğu görüldü.

4) Ticari olarak MLPA'da kullanılmak üzere hazırlanmış olan probmiks kiti ile tip 2 diyabetli olgularda PPAR γ geninde dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenme saptanmadı.

Sonuç olarak hazırlanmış olan ticari probmiks kitinin tip 2 diyabette görülebilecek PPAR γ 'daki delesyon ve duplikasyonları saptamada yeterli olmayabileceği düşünülerek, ileride yapılacak çalışmalarda farklı problemlerin yer aldığı probmiks ile PPAR γ incelenmesi önerilir. Bununla birlikte tip 2 diyabette PPAR γ 'da dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmeler bulunmayabileceği, başka genlerde de büyük genomik delesyon ve duplikasyonlar olabileceği akılda tutulmalıdır.

ÖZET

TİP 2 DİABETES MELLİTUS HASTALARINDA PPAR γ GENİNİN MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) YÖNTEMİ İLE GENETİK ANALİZİ

Dr. KADRİ MURAT ERDOĞAN

Tip 2 diyabet etiyolojisinde birçok genin birbiriyle etkileşmesi ve poligenik doğasına ilaveten obezite, fiziksel aktivite gibi çevresel faktörler bulunmaktadır. Multifaktöryel kalıtım özelliği olması, tip 2 diyabette bir genin fenotip üzerindeki etkisinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. PPAR γ geni tip 2 diyabette en önemli aday genlerdendir ve tip 2 diyabetle ilişkili farklı mutasyonları gösterilmiştir. Ancak bugüne kadar PPAR γ geninde tip 2 diyabetle ilişkili büyük delesyon ve/veya duplikasyon bildirilmemiştir.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'da gerçekleştirilen bu çalışmada Üniversitemiz Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğinde, klinik ve biyokimyasal çalışmalarla Tip 2 diyabet tanısı almış 150 olguda Tip 2 DM hastalarına yönelik olarak dizayn edilmiş Salsa MLPA Probemix P224 PPAR γ kitleri kullanılarak, PPAR γ_1 transkriptini kodlayan 8 ekzondaki delesyon ve/veya amplifikasyonlar incelendi. MLPA yöntemiyle Tip 2 diyabet gelişiminde PPAR γ geninde delesyon ve/veya duplikasyon varlığına ilişkin bir veri elde edilmedi. Buna neden olabilecek faktörler gözden geçirildi ve sonuçlar literatürdeki PPAR γ ve diyabet ilişkisini açıklamış olan veriler eşliğinde tartışıldı. Ayrıca ticari olarak MLPA'da kullanılmak üzere hazırlanmış olan probmiks kitinin, PPAR γ genindeki mutasyonların saptanmasında yeterli olmadığı düşünüldü.

Tip 2 diyabet'li olguların demografik özellikleri incelendiğinde, bu çalışmadaki olguların birçoğunun vücut kitle indeksine göre kilolu ya da obez olduğu görülürken, erkek olgu sayısının kadınlara oranla daha fazla olduğu saptandı. Tip 2

diyabetli olguların akrabalarında da tip 2 diyabet görülme sıklığının arttığı ve olguların %52,6'sının birinci derece akrabasında tip 2 diyabet olduğu saptandı.

Sonuç olarak tip 2 diyabette PPAR γ genindeki dengesiz büyük yeniden düzenlenmelerin tespiti için ticari olarak hazırlanmış probmiks kiti yeterli değildir ve ileride yapılacak çalışmalarda farklı problemlerin yer aldığı probmiks ile PPAR γ geni incelenebilir. Bununla birlikte tip 2 diyabette PPAR γ 'da büyük delesyon ve duplikasyon bulunmayabilir. Ayrıca tip 2 diyabet ile ilişkili olabilecek başka genlerin dengesiz büyük genomik yeniden düzenlenmeleri de söz konusu olabilir.

SUMMARY

GENETIC ANALYSIS OF PPAR γ GENE BY USING MLPA (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION) TECHNIQUE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

DR. KADRİ MURAT ERDOĞAN

In addition to its polygenic nature and interactions of multiple genes, environmental factors such as obesity and physical activity are also considered to be underlying etiology of type 2 diabetes mellitus. The difficulty in determining the effect of a gene on phenotype is because of multifactorial inheritance in type 2 diabetes. PPAR γ is one of the important genes in type 2 diabetes, in which different mutations related to type 2 diabetes have been demonstrated. To date, however, neither large deletion nor duplication have been reported in PPAR γ gene in type 2 diabetes.

This study was conducted in department of Medical Genetics, Pamukkale University School of Medicine. Salsa MLPA Probemix P224 PPAR γ kit, which is designed for type 2 diabetes, were used to analyze deletions and/or amplifications in 8 exons that codes PPAR γ_1 transcript in 150 patients who were diagnosed as type 2 diabetes in Endocrinology and Metabolic Disorders department. No deletion and/or duplication was detected by MLPA method. The factors that could be associated with this finding were reviewed. The results were discussed with the reports in literature about association between PPAR γ and type 2 diabetes. Furthermore, the commercial MLPA probmix kit was considered to be insufficient in detecting the mutations in PPAR γ gene.

We analysed the demographic characteristics of the patients with type 2 diabetes. Body mass index of most of the patients were in overweighted and obesity range. Male to female ratio was higher. It is revealed that positive family history conferred an increased risk for type 2 diabetes and 52,6% of first degree relatives of our patients had type 2 diabetes.

In conclusion, commercial probmix kit designed for the detection of large genomic rearrangements in PPAR γ gene for type 2 diabetes was insufficient. For the future studies PPAR γ gene can be investigated with different probmix probes. But it is probable that there is neither deletion nor duplication in PPAR γ gene and furthermore large genomic rearrangements in different genes can be associated with type 2 diabetes.

KAYNAKLAR

- 1) Oldroyd J, Banerjee M, Heald A, Cruickshank K. Diabetes and ethnic minorities. *Postgrad Med J* 2005; 81: 486–490.
- 2) Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
- 3) Bonadonna RC. Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 89-97.
- 4) Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994; 17: 961-969.
- 5) Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365: 1333-1346.
- 6) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 57.
- 7) Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008; 29: 4627-4636.
- 8) Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 999-1013.
- 9) Leff T, Mathews ST, Camp HS. Review: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its role in the development and treatment of diabetes. *Exp Diabetes Res* 2004; 5: 99-109.

- 10) Yenigün M. Her yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2001; 51-61.
- 11) Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes care 2004; 27: 1047-1053
- 12) Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. N Engl J Med 2002; 346: 802-810.
- 13) Satman I, Yilmaz 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.
- 14) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183-1197.
- 15) Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report. of a WHO consultation. Diabet Med 1998; 15: 539-553.
- 16) Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin dependent diabetes mellitus: problems and prospects. Endocr Rev 1998; 19: 477-490.
- 17) Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. Eur J Endocrinol 2008; 159: 67-74.

- 18) Weyer C, Bogardus C, Pratley RE. Metabolic characteristics of individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1999; 48: 2197-2203.
- 19) Meyer C, Stumvoll M, Nadkarni V, Dostou J, Mitrakou A, Gerich J. Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1998; 102: 619-624.
- 20) Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19:491-503.
- 21) van Haeften TW, Pimenta W, Mitrakou A, Korytkowski M, Jenssen T, Yki-Jarvinen H et al. Disturbances in beta-cell function in impaired fasting glycemia. *Diabetes* 2002; 51: 265-270.
- 22) Bonadonna RC, Stumvoll M, Fritsche A, Muggeo M, Häring H, Bonora E, et al. Altered homeostatic adaptation of first- and second-phase beta-cell secretion in the offspring of patients with type 2 diabetes: studies with a minimal model to assess beta-cell function. *Diabetes* 2003; 52: 470-480.
- 23) Pearson ER. Recent advances in the genetics of diabetes. *Prim Care Diabetes* 2008; 2: 67-72.
- 24) Ali O, Tan TT, Sakinah O, Khalid BA, Wu LL, ML Ng. Prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in aborigines and Malays in Malaysia and their relationship to sociodemographic, health, and nutritional factors. *Diabetes Care* 1993; 16: 68-75.
- 25) Durcops M, Baleynaud S, Mayaudon H, Castagne C, Bauduceau B. Prevalence survey of diabetes in Mauritania. *Diabetes Care* 1996; 19: 761-763.

- 26) Lerman IG, Villa AR, Martinez CL, Cervantes Turrubiatez L, Aguilar Salinas CA, Wong B, et al. The prevalence of diabetes and associated coronary risk factors in urban and rural older Mexicans. *J Am Geriatric Soc* 1998; 46: 1387-1395.
- 27) Elbagir MN, Eltom MA, Elmahadi EM, Kadam IM, Berne C. A high prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the Danagla community in northern Sudan. *Diabet Med* 1998; 15: 164-169.
- 28) Franco LJ. Diabetes in Japanese-Brazilians: influence of the acculturation process. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 34: 51-57.
- 29) Hara H, Egusa G, Yamakido M. Incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and its risk factors in Japanese-Americans living in Hawaii and Los Angeles. *Diabet Med* 1996; 13: 133-142.
- 30) Adeghate E, Schattner P, Dunn E. An update on the etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084: 1-29.
- 31) Kriska AM, Pereira MA, Hanson RL, de Courten MP, Zimmet PZ, Alberti KG et al. Association of physical activity and serum insulin concentrations in two populations at high risk for type 2 diabetes but differing by BMI. *Diabetes Care* 2001; 24: 1175–1180.
- 32) Helmrigh SP, RaglandA DR, Leung RW, Paffenbarger RS Jr. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1991; 325: 147–152.
- 33) Abdella NA, Khogali MM, Salman AD, Ghuneimi SA, Bajaj JS. Pattern of non-insulin dependent diabetes mellitus in Kuwait. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29: 129-136.

- 34) Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, et al. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 254-260.
- 35) Huang Z, Cabanela V, Howell T. Stress, bottle feeding, and diabetes. *Lancet* 1997; 350: 889.
- 36) Pierce M, Keen H, Bradley C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 1995; 12: 6-13.
- 37) Tattersal RB, Fajans SS. Prevalence of diabetes and glucose intolerance in 199 offspring of thirty-seven conjugal diabetic parents. *Diabetes* 1975; 24: 452-462.
- 38) Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992; 35: 1060-1067.
- 39) Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987; 30: 763-768.
- 40) Henkin L, Bergman RN, Bowden DW, Ellsworth DL, Haffner SM, Langefeld CD, et al. Genetic epidemiology of insulin resistance and visceral adiposity. The IRAS Family Study design and methods. *Ann Epidemiol* 2003; 13: 211-217.
- 41) Parikh H, Groop L. Candidate genes for type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 151-176.

- 42) Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003; 33: 177-182.
- 43) Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000; 26: 76-80.
- 44) Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G , et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes, *Diabetes* 2003; 52: 568-572.
- 45) McCarthy MI. Growing evidence for diabetes susceptibility genes from genome scan data. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 159-167.
- 46) Cox NJ. Challenges in identifying genetic variation affecting susceptibility to type 2 diabetes: examples from studies of the calpain-10 gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2301-2305.
- 47) Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000; 26: 163-175.
- 48) Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, et al. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 69-73.

- 49) Sreenan SK, Zhou YP, Otani K, Hansen PA, Currie KP, Pan CY, et al. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 2001; 50: 2013-2020.
- 50) Tripathy D, Eriksson KF, Orho-Melander M, Fredriksson J, Ahlqvist G, Groop L. Parallel manifestation of insulin resistance and beta cell decompensation is compatible with a common defect in Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 782-793.
- 51) Rich SS, Onengut-Gumuscu S, Concannon P. Recent Progress in the Genetics of Diabetes. *Horm Res* 2009; 71: 17-23.
- 52) Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, et al. Transcription Factor *TCF7L2* Genetic Study in the French Population Expression in Human Beta-Cells and Adipose Tissue and Strong Association With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 2903-2908.
- 53) Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320-323.
- 54) Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev* 2005; 26: 393-399.
- 55) Friedmann PS, Cooper HL, Healy E. Peroxisome proliferator-activated receptors and their relevance to dermatology. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 194-202.
- 56) Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 2000; 448: 121-138.

- 57) Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 41.
- 58) Zieleniak A, Wójcik M, Woźniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arch Immunol Ther Exp* 2008; 56: 331-345.
- 59) Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz. The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 146-162.
- 60) Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49: 497-505.
- 61) Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 581-589.
- 62) Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?. *J Intern Med* 2007; 262: 184-189.
- 63) Sainis I, Vareli K, Karavasilis V, Briasoulis E. PPAR γ : The Portrait of a Target Ally to Cancer Chemopreventive Agents. *PPAR Res* 2008; 2008: 1-10.
- 64) Ruiz-Narváez E. Is the Ala12 variant of the PPARG gene an "unthrifty allele"? *J Med Genet* 2005; 42: 547-550.

- 65) [http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fA
PIAupLo0TRBqtiGHA||&ProductOID=fnAAF5Lx4hA](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupLo0TRBqtiGHA||&ProductOID=fnAAF5Lx4hA). 21 Ekim 2008 tarihinde ulaşılmıştır.
- 66) Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 2003; 40: 907-912
- 67) Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, et al. Genetic modulation of PPAR γ phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell* 2003; 5: 657-663.
- 68) Okuno A, Tamemoto H and Tobe K. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 1998; 101: 1354–1361.
- 69) Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR γ deficiency. *J Clin Invest* 2000; 105: 287-292.
- 70) Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, et al. Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2003; 112: 608-618.
- 71) Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, et al. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402: 880-883.

- 72) Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 408-411.
- 73) Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 2002; 51: 3586-3590.
- 74) Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998; 339: 953-959.
- 75) Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996; 274: 2100-2103.
- 76) Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogenactivated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 10811-10816.
- 77) Shuldiner AR, Nguyen W, Kao WH, Beamer BA, Andersen RE, Pratley R, et al. Pro115Gln peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and obesity. *Diabetes Care* 2000; 23: 126–127.
- 78) Schäffler A, Barth N, Schmitz G, Zietz B, Palitzsch KD, and Schölmerich J. Frequency and significance of Pro12Ala and Pro115Gln polymorphism in gene for peroxisome proliferation-activated receptor-gamma regarding metabolic parameters in a Caucasian cohort. *Endocrine* 2001; 14: 369–373.
- 79) Savage DB, Agostini M, Barroso I, Gurnell M, Luan J, Meirhaeghe A, et al. Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. *Nat Genet* 2002; 31: 379-384.

- 80) Francis GA, Li G, Casey R, Wang J, Cao H, Leff T, Hegele RA. Peroxisomal proliferator activated receptor-gamma deficiency in a Canadian kindred with familial partial lipodystrophy type 3 (FPLD3), BMC Med Genet 2006; 7: 3.
- 81) Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance Cell Metab 2006; 4: 303-311.
- 82) Hegele RA, Ur E, Ransom TP, Cao H. A frameshift mutation in peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma in familial partial lipodystrophy subtype 3 (FPLD3; MIM 604367). Clin Genet 2006; 70: 360-362.
- 83) Al-Shali K, Cao H, Knoers N, Hermus AR, Tack CJ, Hegele RA. A single-base mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma4 promoter associated with altered in vitro expression and partial lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5655-5660.
- 84) Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. Diabetes 2005; 54: 3126-3132.
- 85) Ellard S, Thomas K, Edghill EL, Owens M, Ambye L, Cropper J, Little J, et al. Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia 2007; 50: 2313-2317.
- 86) Carette C, Vaury C, Barthélémy A, Clauin S, Grünfeld JP, Timsit J, et al. Exonic duplication of the hepatocyte nuclear factor-1beta gene (transcription factor 2, hepatic) as a cause of maturity onset diabetes of the young type 5. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 2844-2847.