

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**İNSÜLİN SİNYAL İLETİMİNDE p38
KİNAZIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan GÖRGİŞEN

Doktora Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

İNSÜLİN SİNYAL İLETİMİNDE p38 KİNAZIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Gökhan GÖRGİŞEN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje no: 2012.03.0122.004) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Gorgisen G, Ozes D, Pehlivanoglu S, Erdogan A, Dertsiz L, Ozbilim G, Ozbudak IH, Savas B, Ozes ON. Differential expression and activation of Epidermal Growth Factor Receptor 1 (EGFR1), ERK, AKT, STAT3, and TWIST1 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC). Exp Lung Res. 2013 Nov;39(9):387-98.

2. Akin Y, Demir D, Görgişen G, Lüleci G, Alper OM, Watanabe CS, Sahiner IF, Usta MF. Novel and rare CFTR gene mutations in Turkish patients with congenital aplasia of vas deferens. Andrologia. 2014 Mar;46(2):198-9.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mustafa Kemal BALCI
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Zafer ÇETİN
Sanko Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2015 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özgül ALPER

Enstitü Müdürü

ÖZET

IRS1 (insulin reseptör substrat protein 1), insülin reseptörünün ana adaptörü olup insülin sinyal iletiminin pozitif ve negatif regülasyonundan sorumludur. İnsülin sinyal iletimi sürecinde ligant bağlayan insülin reseptörü (IR) oto-fosforilasyonla tirozin fosforilasyonuna uğrar, ardından, IRS1 bu fosfo-tirozinlere kendi SH2 domaini aracılığı ile bağlanır. İnsülin reseptörüne bağlanan IRS1 YXXM motiflerinden IR tarafından tirozin fosforilasyonuna uğratılır ve YXXM'lerin 4 tanesi C-terminalde yer alır. Bu fosforilasyon noktaları PI3K' ın p85 α regülatör alt birimi için bağlanma noktalarıdır. Bu noktalara bağlanan PI3Kp85 α aynı zamanda PI3Kp110 α 'ya da bağlanıp bunun aktivasyonunu sağlar. Aktive olan PI3Kp110 α PIP2(phosphatidyl inositol di-phosphate)'den PIP3 (phosphatidyl inositol tri-phosphate) oluşturarak PDK1 aktivasyonu yapar. Aktive olan PDK1 AKT'yi S308 üzerinden fosforile ederek aktive eder. Aktive olan AKT, glukoz taşıyıcıları GLUT1 ve GLUT4 aktivasyonu yaparak glukozun hücre içine alınmasını düzenler. Her ne kadar IRS1'in Tirozin fosforilasyonu insülin sinyal iletimini olumlu etkilese de IRS1'in Serin/Treonin fosforilasyonu insülin sinyal yolağını genellikle negatif etkilemektedir. Bu nedenle, IRS1 üzerinde gözlenen S/T fosforilasyonlarını yapan enzimlerin tanımlanması insülin sinyal iletimi ve insülin direnci oluşumu mekanizmalarının gösterilmesi açısından önemlidir. IRS1' in serin/treonin fosforilasyonları genellikle LPS, osmotik stress, ER stresi, UV ve İyonize edici radyasyon gibi stres faktörleri ile artar ve bu insülin direnci/tip 2 diyabet' in ana sebeplerinden biridir. p38 MAPK da bu faktörler ile aktive olmaktadır. İnsan IRS1' inin protein yapısını incelediğimizde GYMPMS₆₁₆P, DYMPMS₆₃₆P, GYMMMS₆₆₆P, DYMNMS₇₃₆P dizilerini saptadık ve hepsi p38 MAPK fosforilasyon motifidir. Bu çalışmamızda p38 MAPK aktivatörü varlığında IRS1' in bu bölgelerden fosforile olduğunu saptadık. Bu amino asit rezidularının anlamlılığını belirlemek için ilgili amino asitleri fosforile olamayan Alanin ve fosforilasyonu taklit eden negatif yüklü Glutamik asit formlarına çevirdik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre p38 MAPK' ın insülin direnci gelişiminde ve hücre proliferasyonu üzerinde IRS1 aracılı regülasyonda etkin rol oynadığını belirledik. Ayrıca p38 MAPK' ın IRS1' i fosforile ettiği bölgeye bağlı olarak hücrelerin proliferasyonu ve glukoz alınımları üzerinde negatif ya da pozitif etki gösterdiğini saptadık. Bu veriler ışığında da p38 MAPK aracılı IRS1 Ser/Thr fosforilasyonlarının, insülin sinyal iletiminde ve etkileri üzerinde fosforilasyon bölgesine spesifik etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: IRS1, p38 MAPK, İnsülin Direnci

ABSTRACT

IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) is the main adaptor of Insulin Receptor (IR) and is responsible for positive and negative regulation of insulin signaling. During insulin signaling ligand-bound IR is phosphorylated at tyrosine residues via auto-phosphorylation, then, IRS1 binds to these phosphotyrosine through its SH2 domain. IR-bound IRS1 is phosphorylated by IR at YxxM motifs, four of which were localized at the C-terminal. These phosphorylation sites are binding sites of p85 α regulatory subunit of PI3K. YXXM-bound PI3Kp85 α also binds to PI3Kp110 α and activates it. Activated PI3Kp110 α generates PIP3 from PIP2, and therefore, activates PDK1. Activated PDK1 activates AKT by phosphorylating it at S308. Activated AKT regulates glucose-uptake by activating Glucose transporters GLUT1 and GLUT4. Although tyrosine phosphorylation of IRS1 positively stimulates insulin signaling its phosphorylations at serine/threonine (S/T) residues negatively regulate insulin signaling. For this reason, identification of enzymes responsible for S/T phosphorylations on IRS1 is important for elucidation of mechanisms for insulin signaling. Phosphorylations of IRS1 on S/T residues seem to be increased under stress conditions such as LPS, osmotic stress, ER-stress, UV and ionizing radiation and this is one of the main reasons for "Insulin Resistance/Type 2 diabetes". These inducers also activate p38 MAPK. In this respect, when we analysed the amino acid sequence of human IRS1, we found GYMPMS₆₁₆P, DYMPMS₆₃₆P, GYMMMS₆₆₆P, DYMNMS₇₃₆P motifs which are phosphorylation sites of p38 MAPK. In our study we showed that these indicated sites were phosphorylated by p38 MAPK is activated by anisomycin. To further analyse the significance of phosphorylation of these sites, we converted above residues to unphosphorylated amino acid Alanine or phosphorylation mimicking negatively charged Glutamic acid. Our results suggested that p38 MAPK has an important role of development of insulin resistance and cell proliferation through IRS1 Ser/Thr phosphorylations. The effects of p38 MAPK on glucose uptake and cell proliferation can be positive or negative depends on its phosphorylation sites of IRS1. Under the light of these findings, we suggested that IRS1 Ser/Thr phosphorylations by p38 MAPK showed specific effect on insulin signaling depends on its phosphorylation sites.

Key words: IRS1, p38 MAPK, Insulin Resistance

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca emek veren, yol gösteren ve her zaman destek olarak verimli bir doktora eğitimi tamamlamamı sağlayan, bilimsel ve ahlaki olarak örnek aldığım, asistanı olmaktan gurur duyduğum, ayrıca tez çalışmamda müdürlüğünü yürüttüğü Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi' nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ' e,

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgisini, manevi desteğini esirgemeyen ve müdürlüğünü yürüttüğü Gen ve Hücre Tedavisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU' na ve değerli öğretim üyemiz Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU' na

Doktora eğitimim boyunca ilgi ve hoşgörüsünü eksik etmeyerek, bilgi ve deneyimleriyle destek sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM' e

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan ve bilimsel araştırmaya teşvik eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri hocalarıma

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca manevi destekleri için Doç. Dr. Zafer ÇETİN, Yard.Doç.Dr. Çiğdem Aydın ACAR, Dr. Suray PEHLİVANOĞLU, Dr. Sevim KAHRAMAN DİRİCE ve Arş. Gör. Şule KALE' ye

Doktora tez çalışmamda deneylerin gerçekleştirilmesinde yardım eden, ilgi ve arkadaşlığını eksik etmeyen Arş. Gör. Özlem YILMAZ' a

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, sekreterliğine, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezindeki ve Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezindeki hocalarıma, uzmanlarına, teknisyen arkadaşlarıma ve sekreterliğine

Doktora eğitimim boyunca ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimime başlamam ve devam edebilmem için gerekli maddi desteğini aldığım TÜBİTAK BİDEB' e

Hayatımın her aşamasında verdikleri desteği, emeği, güveni, anlayışları ve her zaman yanımda hissettiğim sevgileri için başta sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnsülin Direnci	3
2.2. İnsülin Sinyal Yolağı	4
2.2.1. İnsülin Sinyal Yolağının Temel Komponentleri	5
2.2.1.1. İnsülin Reseptörü	5
2.2.1.2. İnsülin Reseptör Substrat Proteinleri	6
2.2.1.3. PI3K (Fosfoinositid 3 kinaz)	9
2.2.1.3. AKT/PKB (Protein Kinaz B)	11
2.2.1.4. RAS-MAPK	13
2.2.1.5. ERK1/2	14
2.3. IRS1 Proteinin, İnsülin Etkisinde Biyolojik Fonksiyonu	15
2.4. IRS1 Proteinin İnsülin Sinyalini Regülasyonu	16
2.4.1. İnsülinle İndüklenen IRS1 Ser/Thr Fosforilasyonu	17
2.4.2. Hücrel Stres ve İnsülin Direnci Uyarıları Tarafından İndüklenen IRS1 Ser/Thr Fosforilasyonu	19
2.5. p38 MAPK	22
2.6. Hipotez	23
MATERYAL VE YÖNTEMLER	25
3.1. Hücre Kültürü	25
3.2. pcDNA3 Flag Tagged İnsan IRS1 (İnsulin Reseptör Substrat 1) Memeli Ekspresyon Vektörünün Filtre Kağıdından Sökülmesi	25
3.3. pcDNA3 Flag-tagged insan IRS1 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması İçin E.coli DH5α Suşuna Transformasyonu	25
3.3.1. CaCl ₂ Yöntemiyle Kompetan DH5α Hazırlanması	25
3.3.2. Agar Hazırlanması	26
3.3.3. E. Coli DH5α Suşuna Plazmid Transformasyonu	26

	Sayfa
3.4.	Bakteriden Plazmid İzolasyonu 27
3.5.	293T Hücrelerine Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu 28
3.6.	Transfekte Olan 293T Hücrelerinin Seçilmesi 28
3.7.	Hücelere Anisomisin (p38 MAPK aktivatörü), SB203580 (p38 MAPK inhibitörü) ve İnsülin İle Muamelesi 29
3.8.	Hücre Lizatı Hazırlanması 29
3.9.	Protein Miktar Tayini 29
3.10.	İmmünopresipitasyon Yöntemi 30
3.11.	Western Blot Yöntemi 30
3.11.1.	Jelin Hazırlanması 31
3.11.2.	Örneklerin Jelde Yürütülmesi 31
3.11.3.	Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi 31
3.11.4.	PVDF Membranın İşaretlenmesi 32
3.11.5.	Strip Off İşlemi 32
3.12.	Site-Directed Mutagenesis Yöntemi 32
3.13.	Plazmitlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi 34
3.14.	Dpn-I Kesimi Ürünlerinden Mutant Plazmidlerin Seçimi 34
3.15.	IRS1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgelerine Yönelik PCR Reaksiyonu 34
3.16.	Agaroz Jel Elektrophorezi ve Görüntüleme Sistemi 35
3.16.1.	% 1.8'lik Agaroz Jelin Hazırlanması 35
3.16.2.	İşlemler 35
3.17.	PCR Ürünlerinin Temizlenmesi 35
3.18.	DNA Dizi Analizi 35
3.18.1.	Dizileme Reaksiyonu 36
3.18.2.	Dizileme PCR Programı 36
3.19.	Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi 36
3.20.	İmmünfloresan Sitokimya Yöntemi 37
3.21.	MTT Canlılık/Proliferasyon Testi 38
3.21.1.	Hücrelerin Ekimi ve FBS İle Muamelesi 38
3.21.2.	Hücrelerin MTT ile Muamelesi, Ölçümü ve İstatistiksel Analizi 38
3.22.	Glukoz Alınım Testi 38
3.22.1.	Glukoz Alınım Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 39
BULGULAR	40
4.1.	İnsan IRS1 Ekspresyon Vektörünün Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi 40
4.2.	Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan 293T Hücrelerinde IRS1 ve p38 MAPK' ın Birbirine Bağlanması İmmünopresipitasyon ile Gösterilmesi 41
4.3.	293T Hücrelerinde Anisomisin Muamelesi ile Zamana Bağlı p38 MAPK Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi 42
4.4.	293T Hücrelerinde İnsülin Muamelesi ile Zamana Bağlı IRS1 Tirozin Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi 44

	Sayfa
4.5.	293T Hücrelerinde İnsülin Muamelesi ile Zamana Bağlı ERK ve AKT Proteinlerinin Fosforilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi 45
4.6.	Anisomisin (p38 MAPK aktivatörü)' nün İnsülin Aracılı IRS1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi 47
4.7.	SB203580 (p38 MAPK inhibitörü)' nün İnsülin Aracılı IRS1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi 49
4.8.	Anisomisin ve SB203580' nin İnsülin Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi 51
4.9.	İnsan IRS1 Proteininin Site-Directed Mutagenез (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Yapılması 55
4.10.	SDM Yöntemi İle Oluşturulan Mutant İnsan IRS1 Ekspresyon Vektörlerinin 293T Hücrelerinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi 59
4.11.	Yabancıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Proliferasyon Oranlarının Belirlenmesi 62
4.12.	Yabancıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerin İnsülin Sinyal Yolağına Etkileri 72
4.13.	Yabancıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerin Glukoz Alınım Oranları 90
TARTIŞMA	94
SONUÇLAR	100
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	İnsülin direnci gelişiminde etkin olan mekanizmalar	3
2.2.	Linear insülin sinyal yolağı	5
2.3.	IRS1 proteininin moleküler yapısı ve alt birimlerinin görevleri	8
2.4.	IRS1 Ser/Thr fosforilasyonunun protein yapısı ve yolak üzerindeki etkileri	16
2.5.	IRS1' in insülinle indüklenen ve/veya hücrel stresle indüklenen kinazlar tarafından gerçekleştirilen Ser/Thr Fosforilasyon bölgeleri ve etkileri (Kırmızı: Negatif etkiyi, Yeşil: Pozitif etkiyi göstermektedir.)	21
2.6.	Bu çalışmamızdaki hipotez ve amacımız	24
4.1.	293T hücrelerinde insan IRS1 ektopik ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi (K: Transfeksiyon yapılmamış 293T protein lizati; T: Plasmid transfeksiyonu yapılmış 293T protein lizati)	41
4.2.	Ekzojen insan IRS1' i eksprese eden 293T hücrelerinde IRS1 p38 MAPK bağlantısının gösterilmesi (IP: immünpresipitasyon, IB:western blot)	41
4.3.	293T hücrelerinde zamana bağlı anisomisin varlığında p38 MAPK' ın fosforilasyon ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi	43
4.4.	293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında IRS1 fosfotirozin ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi. (K: Kontrol; pY: Fosfotirozin; ('): dakika)	44
4.5.	293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi. (K: Kontrol)	45
4.6.	293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında ERK1/2' nin fosforilasyon ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. (K: Kontrol)	46
4.7.	p38 MAPK' ın IRS1 tirozin fosforilasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi (K: Kontrol; İ:İnsülin, A: Anisomisin; A+İ: Anisomisin ve insülin ile muamele edilmiş hücreler)	48
4.8.	SB253080' nin IRS1 tirozin fosforilasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi.	50
4.9.	SB253080 ve anisomisinin IRS1' in hedef proteinleri üzerine etkisinin western blot analizi ile belirlenmesi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)	
4.10.	a. Anisomisin ve b. SB253080' nin IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)	52
4.11.	a. Anisomisin ve b. SB253080' nin ERK fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)	53
4.12.	a. Anisomisin ve b. SB253080' nin AKT fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)	54
4.13.	İnsan IRS1 S616A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	55
4.14.	İnsan IRS1 S636A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	56
4.15.	İnsan IRS1 S666A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	56
4.16.	İnsan IRS1 S736A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	57

Şekil		Sayfa
4.17.	İnsan IRS1 S616E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	57
4.18.	İnsan IRS1 S636E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	58
4.19.	İnsan IRS1 S666E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	58
4.20.	İnsan IRS1 S736E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	59
4.21.	İnsan IRS1 A (Alanin) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi	60
4.22.	İnsan IRS1 E (Glutamik Asit) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi	61
4.23.	Yabanıl tip ve A mutant IRS1 proteini eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması.	63
4.24.	Yabanıl tip ve E mutant IRS1 proteini eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması.	64
4.25.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli mutantları arasındaki hücre yoğunluk farkının belirlenmesi (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 4X büyütme)	65
4.26.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının ki67 boyaması ile doğrulanması (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme)	68
4.27.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin E mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının ki67 boyaması ile doğrulanması (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme)	71
4.28.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu	73
4.29.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	73
4.30.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	74
4.31.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	74
4.32.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu	76
4.33.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	76
4.34.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	77
4.35.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	77
4.36.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu	79

Şekil		Sayfa
4.37.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	79
4.38.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	80
4.39.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	80
4.40.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu	82
4.41.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	79
4.42.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	83
4.43.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	83
4.44.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu.	85
4.45.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	85
4.46.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	86
4.47.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	86
4.48.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu	88
4.49.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi	88
4.50.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	89
4.51.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi	89
4.52.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin A mutantlarını eksprese eden hücrelerin normal ve insülinle muamele koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi	91

Şekil		Sayfa
4.53.	Yabanıl tip ve IRS1 proteininin E mutantlarını eksprese eden hücrelerin normal ve insülinle muamele koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi	93

SİMGELER ve KISALTMALAR

IR	: İnsülin Reseptörü
IRS	: İnsülin Reseptör Substratı
PKB	: Protein Kinaz B (Protein Kinase B)
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
PI3K	: Fosfoinositol 3 kinaz
GLUT	: Glukoz transporter
PH	: Plekstrin Homoloji
PTB	: Fosfotirozin Bağlama Bölgesi
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3- β
PIP	: Fosfatidilinositol fosfat
PTEN	: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
RNA	: Ribonükleik asit
FBS	: Fetal Dana Serum (Fetal Bovine Serum)
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
SDM	: Yönlendirilmiş bölge mutasyonu (Side Directed Mutagenesis)
CIAP	: Dana İntestin Alkalen Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
BSA	: Dana Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
PSA	: Penisilin Streptomisin Amfoterisin
PVDF	: Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
LB	: Luria-Bertani broth

EDTA	: 2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diildinitril) tetraasetik asit
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletilendiamin
DTT	: Ditriyotretiol
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris EDTA
HRP	: Horseradish Peroksidaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
APS	: Amonyum Persülfat
IP	: İmmünopresipitasyon
MA	: Moleküler Ağırlık
dk	: Dakika
sn	: Saniye
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
bç	: Baz çifti

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsülin reseptör substrat (IRS) proteinleri, yüzey reseptörlerinden gelen sinyalleri alt yolak elemanlarına ileten adaptor moleküllerdir. Bu proteinler, intrinsik kinaz aktiviteleri bulunmamasına rağmen diğer proteinlerle interaksyona girebilen mikrodomeynleri ve fosforilasyon motifleri sayesinde hücre içi sinyal iletim yollarında oldukça önem taşımaktadır. IRS proteini ilk olarak insülin reseptör (IR) substratı ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalarda aile elemanları arasında ilk tanımlanması ve en yaygın ekspresyon göstermesi nedeniyle IRS1 ön plana çıkmaktadır. IRS1, ligand bağlayan insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve insülin reseptörüne bağlanır ve karboksi terminalindeki tirozin motifleri üzerinden fosforile olarak kendisine SH2 domaini içeren PI3K, Grb2, SHP-2, Fyn, c-Crk gibi ikincil mesajcıların bağlanmasına ve bu moleküllerin altındaki yolların açılmasına aracılık eder. IRS1'in özellikle IR ve IGFR1'e bağlanması sonunda YxxM motiflerinde meydana gelen Tirozin fosforilasyonu sonunda bu dizilere PI3K enzim kompleksinin regülatör alt ünitesi olan p85 bağlanır. Bu bağlanma ile PI3K enziminin katalitik alt ünitesi p110alfa, IRS1'e bağlı p85' ile bağlanarak aktif hale geçip membranda bulunan inositol 4,5-difosfatları inositol 3,4,5-trifosfatlara dönüştürür. İnositol 3,4,5-trifosfatlar PDK1 enzimine bağlanarak bunu aktifleştirir. Aktifleşen PDK1 Akt, mTOR ve S6K enzimlerinin aktivasyonuna neden olur. IRS1 tirozin fosforilasyonu GRB2 bağlanmasına da sebep olduğundan bu yolak da Grb2-Ras-RAF-ERK yolağını aktive eder. Bu aktivasyonlar sonucu IRS1, hücrede hem metabolik hem de mitojenik etkilerini gösterebilmektedir.

IRS1' deki Serin fosforilasyonları, IRS1 proteininin parçalamasını sağlamasının yanı sıra IRS1'in IR-aracılı tirozin fosforilasyonunu engelleyerek insülin sinyal iletimi üzerinde genel olarak negatif etki yapmaktadır. Çevresel etmenlerle aktive olan proteinlerden bir tanesi p38 MAPK'dır. p38 farklı genlerden kodlanan 4 alt gruba sahiptir. Bunlardan en yaygını genellikle her yerde ekspresyon gösteren ve diğer aile elemanlarının da görevlerini kompanse edebilen p38 α 'dır. p38 α serbest oksijen radikalleri, UV, cAMP üreten hormonlar, inflamatuvar sitokinler, LPS, yüksek glukoz konsantrasyonu ve serbest yağ asitleri tarafından aktive edilir. Aktive olan p38 α , hücrel bir çok substratını SP (serin-prolin) veya TP (treonin-prolin) dizilerinden fosforile ederek farklı yolların aktivasyonunu veya inhibisyonunu kontrol eder.

Bu noktada insan IRS1 proteininin aminoasit dizisini incelediğimizde PI3Kp85'in bağlanma bölgelerinin (YxxM) hemen devamında bulunan 4 adet spesifik dizilimin p38 MAPK'ın substratı olabileceğini saptadık. Bu diziler insanda GYMPMS616P, DYMPMS636P, GYMMMS666P, DYMNMS736P sırasına sahiptirler ve hepsi p38 MAPK fosforilasyon bölgesidir. Bu bağlamda, aktive olan p38 α 'nın IRS1'i yukarıda belirtilen amino asitlerden fosforile etmesi durumunda YxxM dizisinin adeta dibinde olan böyle bir fosforilasyonun getireceği negatif yükten dolayı insülin reseptörünün YxxM'de Y fosforilasyonu yapamayacağını ve bu yüzden IRS1 aktivasyonunun inhibe edileceğini düşünüyoruz. Bizim hedeflediğimiz bölgelerin IRS1 aktivasyon noktasına bu kadar yakın oluşu ve bu bölge modifikasyonlarının daha önce gösterilmemiş olması İnsülin-aracılı IRS1 aktivasyonuna ayrıca bir önem katmaktadır. Bu nedenle, projemizdeki esas amacımız, p38-aracılı IRS1 fosforilasyonunun (S616, S636, S666, S736 üzerinden) hücrenin insülin duyarlılığını ve proliferasyonunu nasıl etkilediğini açığa çıkarmaktır.

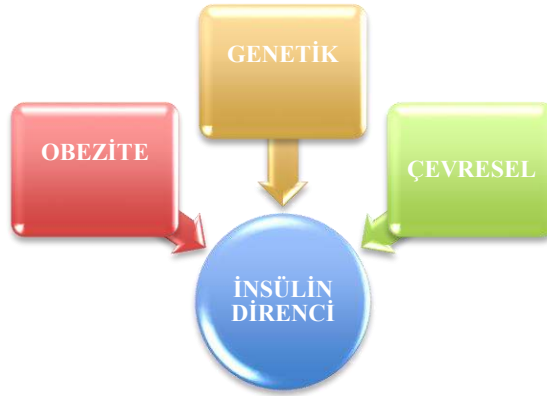
GENEL BİLGİLER

2.1. İnsülin Direnci

İnsülin direnci, iskelet kası, yağ ve karaciğer dokusu gibi insülinin hedef dokularının hücresel düzeyde insüline gereken yanıtı verememesi ya da az vermesi durumudur [1].

İnsülin direnci, Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıkların ve karaciğer hastalıklarının öncülü olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla insülin direncinin erken belirlenmesi bireyin ileride özellikle diyabetik olup olmayacağının en önemli belirteci olacaktır. Yapılan çalışmalara göre dünyada 2020 yılında 250 milyon bireyin Tip 2 Diyabet tanısı alabileceği belirtilmektedir [2]. Bu nedenle insülin direncinin patogenezinin aydınlatılması ve yeni hedeflerin tanımlanması primer/sekonder korunma yollarının saptanması açısından oldukça önemlidir [2, 3].

İnsülin direncinin gelişimindeki etkin mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber beslenme, sistemik yağ asidi miktarı, adipoz dokudaki inflamasyon, endoplazmik retikulum ve oksidatif stres gibi çevresel faktörlerle oluşan etkilerin yanı sıra obezite ve genetik faktörlerin de katkıda bulunduğu oldukça karmaşık bir mekanizmaya sahip olduğu bilinmektedir [1, 4, 5]. (Şekil 2.1.)

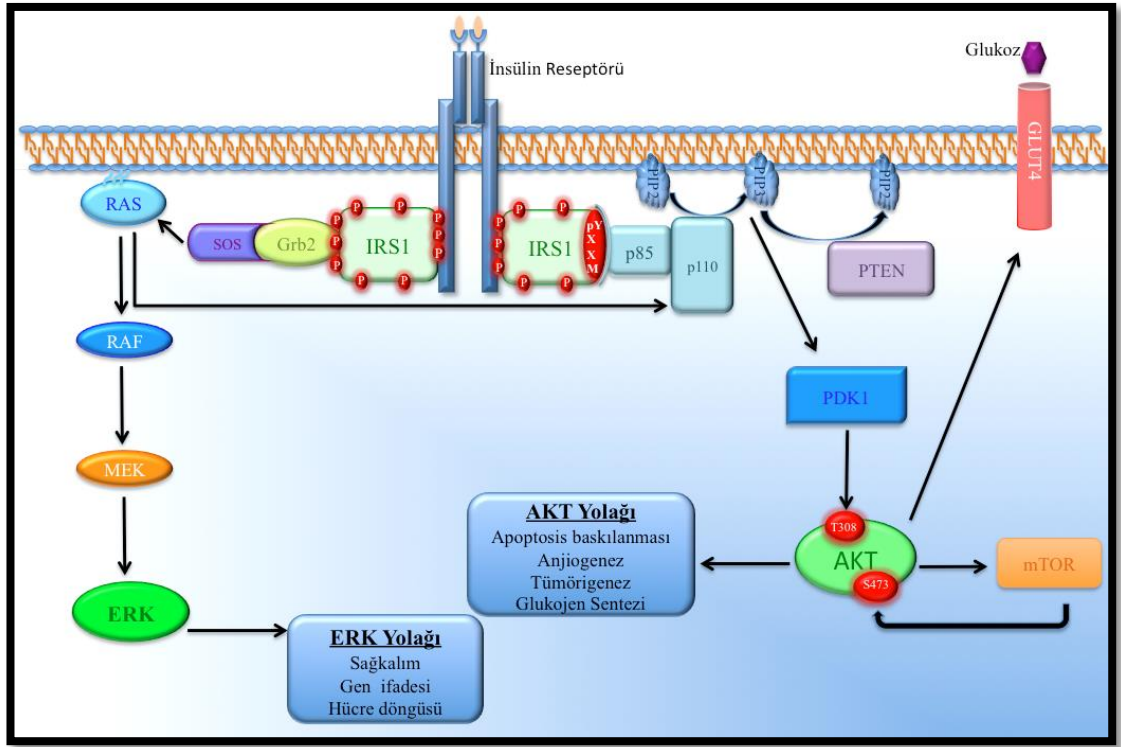


Şekil 2.1. İnsülin direnci gelişiminde etkin olan mekanizmalar

İnsülin direnci moleküler seviyede incelendiğinde ise insülin sinyal sistemine negatif etkide bulunan seramid ve diaçilgliserol gibi serbest yağ asitlerinin, inflamatuvar sitokinlerin, serbest oksijen radikallerinin ve bir çok serin/treonin kinazların etkin rol oynadığı birbiriyle etkileşime girmiş hücrel sinyal yollarının söz konusu olduğu kompleks, patolojik bir sistem karşımıza çıkmaktadır [6]. Dolayısıyla insülin direnci gelişiminde bir çok hücrel sinyal yolağının bozukluğu söz konusudur. Son yıllarda insan ve hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar insülin direnci gelişiminde en etkin hücrel mekanizmalardan birinin insülin reseptör substrat proteinlerine bağlı olarak gerçekleşen insülin sinyal yolağındaki bozukluklar olduğunu ortaya koymaktadır [7, 8].

2.2. İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin, glukoz homeostasis' inden sorumlu primer anabolik hormondur. Vücut glukoz dengesini oldukça kompleks ve sıkı bir şekilde düzenlenen insülin sinyal yolağı aracılığıyla sağlamaktadır [9]. Genel olarak, insülin sinyal iletimi sürecinde ligant bağlayan insülin Reseptörü (IR) oto-fosforilasyonla tirozin fosforilasyonuna uğrar, ardından, IRS (insülin reseptör substrat) proteinleri bu fosfotirozinlere kendi SH2 domaini aracılığı ile bağlanır. İnsülin Reseptörüne bağlanan IRS IR tarafından tirozin fosforilasyonuna uğratılır. Bu fosfotirozin noktalarına PI3K(fosfoinositol 3 kinaz)'nın regülatör alt birimi olan p85α bağlanır. p85α aynı zamanda PI3K'ın katalitik alt ünitesi p110α'ya da bağlanıp bunun aktivasyonunu sağlar. Aktive olan PI3Kp110α PIP2 (phosphatidil inositol di-fosfat)' den PIP3 (phosphatidil inositol tri-fosfat) oluşturarak PDK1 aktivasyonu yapar. Aktive olan PDK1 AKT'yi 308. pozisyondaki serin (S308) aminoasiti üzerinden fosforile ederek aktive eder. Aktive olan AKT, glukoz taşıyıcıları GLUT1 (glukoz transporter tip 1) ve GLUT4 (glukoz transporter tip 4) fosforilasyonu yaparak bunların aktivasyonunu yapıp glukozun hücre içine alınmasını sağlar [10-12] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Linear insülin sinyal yolağı

2.2.1. İnsülin Sinyal Yolağının Temel Komponentleri

İnsülin sinyal yolağının akışı linear olarak anlatıldığında kolay gibi gözükse de diğer sinyal yollarıyla etkileşime girerek dağılım göstermesi sonucunda proliferasyon, farklılaşma, epitelial mezenşimal geçiş, hücre siklusu, apoptos gibi bir çok önemli hücrel aktiviteyi kontrol edebilmesi nedeniyle oldukça karmaşık hale gelmektedir [13, 14]. Bu nedenle sinyal yolağının dağılım gösterdiği temel komponentlere odaklanılması insülin sinyal yolağının normal regülasyonunun anlaşılması açısından oldukça önem taşımaktadır.

2.2.1.1. İnsülin Reseptörü

İnsülin reseptörü, ligandla aktive olan tirozin kinaz reseptör ailesinin bir elemanıdır. İnsülin reseptörünün temel görevi hücrelerin farklılaşmadan, büyümeden ve metabolik aktivitelerden sorumlu yolların aktivasyonunu sağlamaktır [15, 16].

İnsülin reseptörü iki ekstraselüler α alt ünitesinden ve iki transmembran β alt ünitesinden oluşmaktadır. Ekstraselüler alt üniteler ile transmembran alt üniteler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanmaktadır. Ekstraselüler α alt üniteleri reseptörün ligand bağlama kısmını oluştururken, transmembran β alt üniteleri ise tirozin spesifik protein kinaz rolü görmektedir [16, 17].

İnsülin reseptörünün β alt ünitesinin intraselüler kısmı, juxtamembran bölgesi (yaklaşık 30 rezidu), kinaz bölgesi (yaklaşık 300 rezidu) ve karboksiterminal bölgesi (yaklaşık 70 rezidu) olmak üzere 3 yapısal bölgeye ayrılmıştır [18]. Üç bölgenin de tirozin otofosforilasyon bölgeleri tanımlanmıştır. Bu bölgeler juxtamembran bölgedeki Y972 ve karboksiterminaldeki Y1158, Y1162, Y1163 pozisyonları olup, insülin reseptörünün oto-fosforilasyonu, otoinhibisyonu ve sinyalin alt basamaklara iletimini sağlayan önemli alanlardır [19, 20]. İnsülinin bağlanmasıyla aktive olan insülin reseptörü bu bölgelerden oto-fosforile olduktan sonra konformasyonel değişime uğrar ve PTB (fosfotirozin bağlama) bölgesi ve/veya SH2 (Src-homoloji 2) bölgesi olan adaptör proteinler için bağlanma bölgesi oluşturarak sinyal iletiminin başlamasını sağlar [21, 22].

2.2.1.2. İnsülin Reseptör Substrat Proteinleri

IRS ilk olarak insülinle muamele edilmiş FAO hücrelerinden antifostirozin immünpresipitasyonu ile elde edilerek 185-kDa tirozil fosforile protein olarak adlandırılmıştır. Daha sonrasında ise 60-185 kDa arasında diğer IRS izoformları neredeyse tüm dokularda tanımlanmıştır. İlk olarak elde edilen 185 kDa' luk protein, pürifiye edilip, cDNA kütüphanesinden klonlandıktan sonra insülin muamelesi sonucu tirozin fosforilasyonuna uğraması ve insülin reseptörü ile beraber eksprese edilmesi nedeniyle insülin reseptör substrat proteini adını almıştır [23, 24].

İnsülin Reseptör Substrat Protein Ailesi:

İnsülin reseptör substrat ailesi altı üyeden oluşmaktadır. IRS1, ilk olarak tanımlanması ve neredeyse her dokuda ekspresyonunun gözlemlenmesi nedeniyle ailenin üzerinde en çok çalışılan üyesidir. Ailenin prototipi olarak da belirtilmektedir. IRS1 geni insanda 2q34-36 bölgesinde lokalizedir ve tek ekzon tarafından kodlanmaktadır [25].

IRS2 proteini de IRS1 gibi çoğu dokuda ekspresyon göstermektedir. IRS2 geni insanda 13q34 üzerinde lokalizedir ve tek bir ekzon tarafından kodlanmaktadır. IRS1' den 100 aminoasit daha uzun bir proteindir [26, 27].

IRS3 proteini sadece ratlarda bulunurken insanda pseudo (yalancı) gen halinde bulunmaktadır [28]. IRS4 proteininin ekspresyonu ise daha sınırlıdır. İnsanda beyin, timus ve genellikle embriyonik dokularda ekspresyon göstermektedir[29].

IRS5 ve IRS6 'nın amino terminalleri IRS ailesi ile homoloji gösterse de karboksi terminallerinin bulunmaması nedeniyle güdük proteinler adını almaktadırlar. IRS5 ve IRS6 ailenin uzaktan elemanları olarak belirtilse de görevleri henüz tam olarak bilinmemektedir [30, 31].

IRS1 ve IRS2 yaygın ekspresyon göstermeleri, insülin sinyalinde temel rol oynamaları ve diğer yollar ile interaksiyona geçerek insülin sinyalini negatif ve pozitif yönde regüle edilebilmeleri nedeniyle çalışmaların üzerinde yoğunlaştığı aile elemanlarıdır [32].

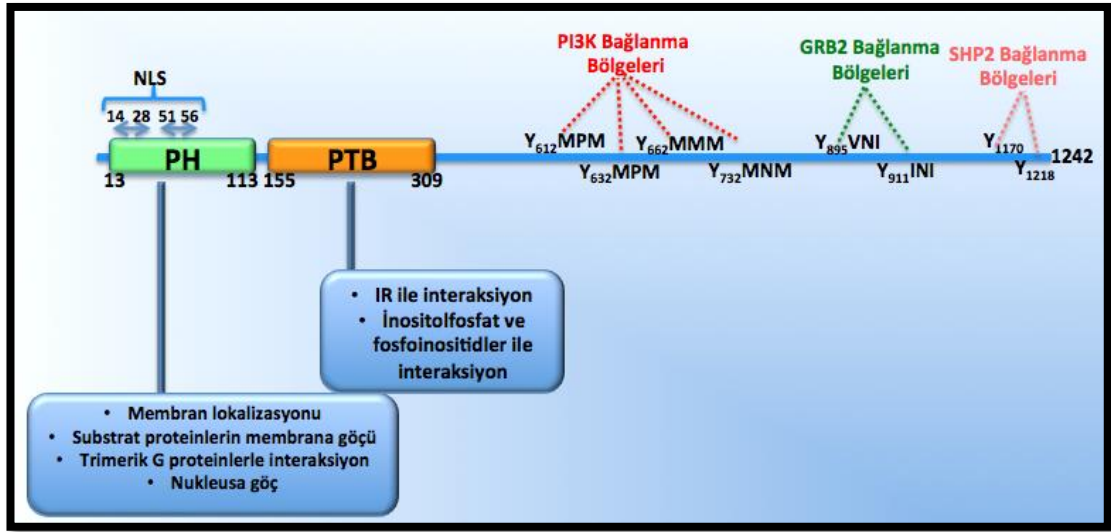
İnsülin Reseptör Substrat Proteinlerinin Moleküler Yapısı:

IRS proteinlerinin moleköl yapısına bakıldığında aile elemanları, ortak yapısal bölgeleri içerse de tüm aminoasit dizisi göz önüne alındığında IRS1 ve IRS2' nin aminoasit dizi benzerliği sadece %43' tür [23].

IRS1 proteininin amino terminali PH (plekstrin homoloji) ve PTB (fosfotirozin bağlama bölgesi) bölgelerinden oluşmaktadır. PH bölgesi, IRS1 proteininde 13.-113. aminoasitleri arasında lokalize olan, diğer aile elemanları ile de yüksek homoloji (%70 benzerlik) gösteren bir alandır [33]. Yüksek homoloji göstermesi bu bölgenin fonksiyonel önemini de ortaya koyan faktörlerden bir tanesidir. Bu bölge proteinin pozitif yüklü bağlanma cebini oluşturmaktadır [33, 34]. PH, IRS1'in membranla etkileşime geçmesinden, sitozoldeki substrat proteinlerin membrana göçünden ve IRS'lerin trimerik G proteinlerle interaksiyona girerek sinyalin dağılımından sorumlu bölgesidir [35]. Ayrıca IRS1' in nukleusa geçişini sağlayan nuklear lokalizasyon sinyalleri de bu bölgede yer almaktadır [36, 37].

PTB bölgesi, 155-309. aminoasitler arasındaki bölgede lokalizedir. IR (insülin reseptörü) ve IGFR (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü)' lerinin juxtamembran bölgesindeki NPXY (Asparajin-Prolin-Herhangi bir aminoasit-Tirozin) motifindeki fosforile Y950 ve Y960' a bağlanan bölgedir [34, 38]. Bu bölgenin delesyonu IRS1' in IR tarafından fosforilasyonunu tamamen baskılamıştır [39]. Dolayısıyla bu bölgelerin fosforilasyonu, IRS1' in tirozin fosforilasyonu için temel aşamayı oluşturmaktadır. Aynı zamanda inositolfosfat ve fosfoinositit'lere bağlanarak IRS sinyalizasyonunun devamını sağlamaktadır [40].

IRS1' in karboksi terminali ise aile elemanları arasında en az homoloji gösteren ve buna bağlı olarak sinyal iletiminin dağılımını ve çeşitliliğini sağlayan bölgeyi oluşturmaktadır [41]. Dolayısıyla aile elemanlarının aynı yapısal özellikte olmasına rağmen farklı sinyal yollarıyla etkileşime geçebilmesi ve aynı dokuda farklı rolleri üstlenmesi bu bölgede bulunan farklı protein motiflerinden kaynaklanmaktadır [42, 43]. (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. IRS1 proteininin moleküler yapısı ve alt birimlerinin görevleri

IRS1 karboksi terminalinde yaklaşık 21-23 adet tirozin fosforilasyon motifi içermektedir. Bu motifler IRS1' in etkileşime geçebildiği aktive olmuş bir çok reseptörün etkisiyle fosforile olmaktadır [44]. IRS1' in tirozin fosforilasyonu sinyalin pozitif düzenlenmesine sebep olmaktadır. Fosforile olan motifler özellikle SH2 bağlama bölgesi içeren PI3K' nın regülatör alt ünitesi p85 α , GRB2, Nck, Fyn ve protein tirozin fosfatazlar gibi proteinler için bağlama bölgesi oluşturmaktadır [27]. SH2 bölgesi, yaklaşık 100 aminoasitten oluşan farklı biyolojik etkileri olan sinyalleri ileten moleküllerde bulunan küçük protein modülüdür [45].

IRS1' in en önemli efektörlerinden bir tanesi PI3K' dir. PI3K enzim kompleksinin regülatör alt ünitesi olan p85 α , sahip olduğu SH2 bölgesi aracılığıyla IRS1' in karboksi bölgesinde lokalize olan Y612MPM, Y632MPM, Y662MMM, ve Y732MNM pozisyonlarındaki 4 adet YXXM (Tirozin-X-X-Metionin) motifine bağlanmaktadır. İnsüline bağlı aktive olan PI3K yolağı, temel metabolik ve proliferatif yolların aktivasyonundan sorumlu olması nedeniyle PI3K' in bu bölgeler ile interaksyonu oldukça önem taşımaktadır [20, 46].

Tirozin fosforilasyonuna uğrayan IRS1' e bağlanan ikinci önemli protein ise GRB2' dir. GRB2, IRS1 ' in Y895VNI ve Y911INI motiflerine bağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu bölgelerde meydana gelen mutasyonların GRB2 etkileşimini tamamen durdurduğu gösterilmiştir. GRB2 aktivasyonu RAS ve ERK (extracellular signal-regulated kinase) proteinlerinin aktivasyonuna sebep olmaktadır. İnsülin uyarımına bağlı olarak aktif olan bu yolak ise insülinin mitojenik etkilerinden sorumlu sinyal dalını oluşturmaktadır [47, 48].

Genel olarak IRS1 tirozin fosforilasyonunun insülin sinyal akışına olan etkisine bakıldığında ilk basamak PI3K' nin, IRS1'in pYXXM motifinde fosforile olan tirozin (pY) dizisine sahip olduğu SH2 bölgesi aracılığıyla bağlanmasıdır. Bu bağlanma ile PI3K enziminin katalitik alt ünitesi p110 α da IRS1'e bağlı p85'e bağlanır. Böylece membranın iç yüzeyine bu kadar yaklaşan p110, membranda bulunan inositol 4,5-difosfatları inositol 3,4,5-trifosfatlara dönüştürür. İnositol 3,4,5-trifosfatlar PDK1 enzimine bağlanarak bunu aktifleştirir. Aktifleşen PDK1 AKT, mTOR, S6K ve PKC izoformlarının aktivasyonuna neden olur. Böylece IRS1 aktivasyonuna bağlı olarak aktifleşen AKT ve MAPK yolları metabolik ve proliferatif yolların aktivasyonuna sebep olmaktadır [25, 49].

IRS1'in karboksi terminalinde tirozin motiflerinin yanı sıra bir çok Serin/Treonin kinazının fosforilasyon motifi (SP veya TP) içinde yer alan yaklaşık 100 adet Serin veya Treonin amino asiti vardır [50]. Bu bölgeler de tirozin motiflerinde olduğu gibi IRS proteinlerinin farklı koşullarda farklı sinyal yollarını uyarmasını ve aile elemanlarının farklı görevler üstlenmesine neden olmaktadır [51]. IRS1 tirozin fosforilasyonları insülin sinyal yolağını pozitif yönde etkilemekle beraber, Ser/Thr alanlarının fosforilasyonları yolağın hem aktivasyonuna hem de inhibisyonuna neden olabilmektedir. Bu nedenle hücrel indükatörün kökeni yolağın akibeti hakkında önem kazanmaktadır. IRS1'in bu fosforilasyon alanlarının insülin sinyali üzerine etkilerini anlamaya yönelik gerçekleştirilen bir çok çalışma insülinin fizyolojik ya da patolojik durumdaki etkilerini korunmuş ve sıkı bir şekilde regüle ettiğini ortaya koymuştur [35, 52]. Ancak bir çok çalışmaya rağmen patolojik ve normal fizyolojik durumda Ser/Thr fosforilasyona sebep olan etmenler, fosforilasyon bölgeleri ve etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır [53]. Bunun nedeni olarak IRS1 ' in insanda ve farede bir çok Ser/Thr fosforilasyon bölgesine sahip olması gösterilmektedir. Bir diğer etmen olarak ise IRS1 Ser/Thr fosforilasyonlarının hem negatif geri bildirim olarak IRS1' in alt sinyal elemanları tarafından hem de başka sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştirilmesidir. Bu şekilde meydana gelen sinyaller arasındaki etkileşim aynı bölgenin farklı moleküller tarafından da fosforile edilebildiğini göstermektedir. Dolayısıyla sinyalin etkisinin de değişkenliği söz konusu olmaktadır [54].

2.2.1.3. PI3K (Fosfoinositid 3 kinaz)

Tirozin fosforilasyonuna uğrayan IRS1' in uyardığı en önemli alt sinyal elemanı PI3K' dir. PI3K, birçok biyolojik aktiviteyi ikincil lipid mesajcılar üreterek regüle eden enzim ailesidir [55].

Yapısal özelliklerine göre sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. Sınıf I PI3K' lar, sınıf IA ve sınıf IB olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Sınıf IA Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK), sınıf IB ise G Protein Coupled Reseptörler (GPCR) tarafından aktive edilir. Sınıf IA PI3K' ler p85 α , p85 β ya da p55 γ olmak üzere farklı regülatör izoformlardan ve p110 α , p110 β ya da p110 δ olmak üzere farklı katalitik formlardan oluşan heterodimerik enzim kompleksidir. Regülatör alt ünite stabil olmaması ve çok çabuk degrade olması nedeniyle hücrede neredeyse her zaman katalitik alt üniteye bağlı olarak bulunmaktadır. Bu bağlanma sadece katalitik alt ünitenin stabilitesi açısından değil aynı zamanda enzimin fosfotirozin motiflerine bağlanıncaya kadar allosterik inhibisyonu açısından da önemlidir [56, 57].

Bu sınıf enzimlerin temel görevi fosfatidil inositol (4,5) bisfosfat (PIP2)' in 3. karbonuna fosfat takarak fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfat (PIP3)' ı oluşturmaktadır. PIP3, proliferasyon yapmayan dinlenme halindeki hücrelerde saptanamayacak kadar az iken büyüme faktörlerinin varlığında proliferasyon sinyali alan hücrelerde miktarları artmakta ve metabolizma, büyüme, sağkalım, proliferasyon ve farklılaşma gibi bir çok hücresel fonksiyondan sorumlu yolların aktivasyonunu sağlamaktadır [58].

PI3K aktivasyonu, diğer yolların aktivasyonunda olduğu gibi insülin sinyalinin devamlılığının sağlanmasında da oldukça önemlidir. Ligand bağlanması ile aktive olan insülin reseptörü, IRS1'in YxxM motiflerinde bulunan tirozinlerin fosforilasyonunu sağlar. Böylece bu bölgeler, PI3K' ın regülatör alt birimi için bağlanma noktası oluşturur. Fosfotirozin motiflerine bağlanan heterodimerik yapı, konformasyonel değişim ile aktif hale geçerek PIP2'yi PIP3'e çevirir. Meydana gelen fosforilasyon ile oluşan PIP3, sinyali ileten bir sekonder mesajcı olarak görev yapar. PIP3, yapısında plekstrin homoloji (PH) bölgesi taşıyan moleküller için membranda bir bağlanma noktası oluşturur. Bu şekilde hücre membranına bağlanan moleküller fosforillenmek suretiyle aktive edilirler [59].

PIP3 oluşumu bir seri serin/treonin kinazın membrana göçüne sebep olur. İnsülin indüklü PIP3 sinyali sonucundan aktive olan 3 temel serin/treonin kinaz bulunmaktadır. Bunlar PDK1 (3-phosphoinositid-bağımlı protein kinase 1), PKB (Protein Kinaz B) ya da AKT ve PKC ζ (Protein Kinaz C ζ)' dir. Üç protein de normal şartlarda sitosoldedir. PIP3 aktivasyonu ile membrana göç ederler. PKB ve PDK1 PIP3' e PH bölgesi ile PKC ζ ise C1 domaini ile PIP3' e bağlanır [60].

PDK1, sitoplazmada sürekli olarak aktif ancak sinyal iletemez halde bulunmaktadır. Sürekli aktivasyonunun nedeni PKB ve PKC ile de homoloji gösteren A loop bölgesindeki serin amino asitini otofosforile edebilmesidir. PIP3 oluşumuyla beraber PDK1 ve iki substratı membrana göç eder. PDK1, burada her iki proteini de A loop bölgelerinden fosforile ederek insülin sinyalinin akışının devamını sağlar [61].

PI3K'in pozitif etkisi PIP3 seviyesinde PTEN (fosfataz ve tensin homolog) ve SHIP2 (SH2-içeren inositol 5' fosfataz-2) gibi fosfolipid fosfatazlar tarafından negatif olarak regüle edilmektedir. PTEN, PIP3'ün 3'-ucundaki; SHIP2 ise 5'-ucundaki fosfatı uzaklaştırıp PIP3'ü PIP2'ye çevirerek PI3K aktivitesini de inhibe etmektedir. Ayrıca PI3K, intrinsik serin kinaz aktivitesi ile regülatör bölge p85 α ' yı S608 pozisyonundan fosforile ederek de kendi enzimatik aktivitesini azaltmaktadır [62].

İnsülin sinyalinde PI3K aktivitesi, AKT ve PKC ζ aktivasyonu ile glukoz homeostasisini pozitif yönde regüle ederken, bazı durumlarda insülin aktivitesini negatif olarak da regüle edebilmektedir [60, 63]. Buna örnek olarak, p85 ekspresyonundaki artışın özellikle obez bireylerde insülin direnci gelişiminde etkin bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, serbest p85 miktarındaki artışın tirozin fosforile IRS1'e bağlanmada heterodimerik kompleks ile yarışa girerek sinyalin etkinliğini azalttığını göstermektedir. Diğer bir inhibisyon mekanizması ise monomerik regülatör bölgenin fosforile IRS1'e bağlandıktan sonra onu reseptörden ayırarak kompakt halde hücrede PIP3 üretmeden bekletmesidir [64].

2.2.1.3. AKT/PKB (Protein Kinaz B)

AKT/PKB, PI3K'ın alt sinyal proteini olup bir serin/treonin kinazdır. AKT, insülinin PI3K bağımlı metabolik ve mitojenik aktivitelerini gerçekleştirmesi için bir çok substratı fosforile ederek aktivasyonunu ya da inhibisyonunu sağlamaktadır.

Memelilerde farklı genlerden sentezlenen üç AKT izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar yapısal olarak aynı olmakla beraber gen dizisi açısından %80 oranında benzerlik göstermektedir [65]. Her izoformun amino terminalinde PH bölgesi, karboksi terminalinde ise katalitik ve regülatör bölgeleri bulunmaktadır. AKT'nin PH bölgesi, hücre membranı yapısında bulunan fosfatidilinositol (3,4,5)/PIP3 trifosfat ile interaksyona girer. Karboksi bölgesi ise üç izoformun aktivasyonu için önemli fosforilasyon bölgelerini içermektedir [66, 67].

Son zamanlar yapılan siRNA çalışmaları izoformların farklı biyolojik aktivitelerde görev aldığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmalarda AKT1 delesyonu, yaşam süresinin kısalmasına, büyüme ve gelişme geriliğine sebep olurken, AKT2 delesyonunun insülin direnci ve diyabet gelişimine neden olduğu gösterilmiştir [68-70]. AKT3'ün glukoz homeostasisinde görev almadığı ancak nöral gelişiminde oldukça önemli olduğu ortaya konmuştur [71]. Bu görev dağılımı farklılığının AKT izoformlarının farklı dokularda ekspresyon göstermesinden de kaynaklandığı düşünülmektedir. AKT3 ağırlıklı olarak sinir sistemi ve testislerde ekspresyon gösterirken, AKT1 ve AKT2 ise yaygın ekspresyon göstermektedir [72].

AKT proteininin aktivasyon mekanizmasına bakıldığında, üç AKT izoformu da C-terminal A-loop (aktivasyon bölgesi) bölgesinde T308FCGTP motifine sahiptir. Bu bölge PDK1 için fosforilasyon bölgesidir. İnsülin uyarımına bağlı PIP3 aktivasyonu ile membrana transloke olan PDK1, AKT'yi T308 bölgesinden fosforile

eder. Bu fosforilasyon AKT'nin aktivasyon loop bölgesinin stabilizasyonunu sağlayarak enzimin aktif konformasyonda kalmasını sağlar. T308 fosforilasyonu, AKT'nin aktivasyonu için yeterli olsa da, C-terminalde bulunan F-P-Q-F-S-Y motifindeki Serin (S473) amino asitinden fosforilasyonu AKT'nin tam aktivasyonu için şarttır. S473 fosforilasyonu ise mTORC2 tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu motifte meydana gelen nokta mutasyonları AKT'nin aktivitesini tamamen bozar ve enzimi inhibe eder [73-75]. AKT aktive olduktan sonra RxRxxS/T motifini taşıyan hedef molekülleri Serin veya Treonin amino asitlerinden fosforile ederek bunları aktive ya da inhibe eder [76].

İnsülin sinyal yolağı tarafından aktive edilen AKT'nin ilk fizyolojik hedefi GSK3 (glukojen sentez kinaz 3) olarak tanımlanmıştır. GSK3, sürekli olarak aktif olan ve sürekli GS (glukojen sentaz) fosforilasyonu yapan bir enzimdir. GS'nin GSK3 tarafından serin fosforilasyonu glukojen sentezini inhibe etmektedir. GSK3'nın AKT tarafından fosforilasyonu GSK3'ün inhibisyonuna ve dolayısıyla GS aktivasyonuna sebep olarak glukojen üretimini artırmaktadır [77].

AKT'nin ikinci hedefi ise GLUT4 proteininin membrana translokasyonunu sağlamasıdır. AKT, GLUT4 translokasyonu için, AS160 (Rab-GTPaz aktive edici protein)'ı fosforile ederek inhibe eder. Bu durum, hücre iskeletinin tekrar organizasyonundan sorumlu Rab küçük GTPaz aktivitesini hızlandırır ve GLUT4'ün hücre membranına translokasyonunu sağlar [78]. GLUT, transport protein ailesidir ve bir nevi taşıyıcı görevi görerek glukozun hücre içine alınımını sağlar. Bir çok çalışma, GLUT4'ün vücudun glukoz homeostasisinin sağlanmasında oldukça önemli olduğunu göstermiştir. GLUT4 regülasyonu, özellikle kas ve yağ dokusunda insüline bağlı glukoz taşınımında önemli basamaklardan bir tanesini oluşturmaktadır olup, tip 2 diyabette bu regülasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca farelerde GLUT4 ekspresyonunun baskılanmasının insülin direncine neden olduğu görülürken, ekspresyonundaki artışın DB/DB fare modellerinde diyabeti tolere edilebilir hale getirdiği saptanmıştır [79, 80].

AKT'nin diğer bir hedefi ise TSC2 (tuberöz sclerosis 2)'dir. TSC2 proteini, TSC1 ile formasyona girerek mTOR (mammalian target of rapamycin) aktivitesini negatif etkilemektedir. AKT, TSC2'yi fosforile edip bunun mTOR ile bağlanmasını engelleyerek mTOR aktivatörü RHEB'in mTOR'a bağlanmasını sağlar. mTOR aktivitesinin en iyi bilinen fonksiyonu translasyonunun başlamasını regüle etmesidir[80]. Dolayısıyla hücrede proliferasyonu ve büyümeyi sağlamaktadır. Bunu ökaryotik translasyon başlama faktörü olan eIF4E ye bağlanan ve kompleks oluşumunu inhibe eden 4E-BP1'yi fosforilleyip eIF4E'nin serbest kalmasını sağlayarak gerçekleştirir. İkinci önemli görevi ise ribosomal proteinlerin sentezini arttırmaktadır. Bunu ise S6K1 (ribosomal p70 S6 kinase) aktive ederek gerçekleştirir. mTOR aktivitesinin en önemli görevinden bir tanesi de mTOR'un regülatör alt ünite RICTOR'a bağlanarak henüz bilinmeyen bir mekanizma ile AKT'nin tam aktivasyonunu sağlayan S473 fosforilasyonunu gerçekleştirmesidir [81].

AKT, aynı zamanda FOX (winged helix ya da forkhead) transkripsiyon faktörü ailesinin aktivitesini kontrol ederek glukoneojenik ve lipojenik enzimlerin ekspresyonlarını regüle etmektedir. FOX ailesi 100'ün üzerinde elemanı bulunan ve insülinin önemli etkilerinin ortaya çıkmasını sağlayan protein ailesidir [82]. Bu anlamda, FOXO1, karaciğerde glukoneojenik genlerin aktivitesinden ve adipogenezin inhibisyonundan sorumludur [83]. İnsülin yolağı ile aktive olan AKT FOXO1'i Ser256 bölgesinden fosforile ederek FOXO1'in etkilerini baskılamaktadır. Bu fosforilasyon aynı zamanda FOXO1'in 14-3-3 proteinleri ile interaksyona geçmesini ve sitoplazmada tutulu kalmasına sebep olmaktadır [84]. FOXA2, açlık lipid metabolizmasının önemli regülatör proteindir. Ayrıca, AKT bir diğer FOXO üyesi olan FOXO2'yi Treonin156 üzerinden fosforile ederek bu proteinin nuklear lokalizasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini baskılamaktadır [85].

2.2.1.4. RAS-MAPK

İnsülinin uyardığı en önemli yollardan bir diğeri ise RAS-MAPK yolağıdır. İnsülin ile aktive olan insulin ya da IGF reseptörüne bağlanan ve fosforile olan IRS1' in karboksi bölgesindeki tirozin motiflerine SH2 bölgeleri ile bağlanan GRB2 ve SHC ardından GAB1'e bağlanır, GAB1 de bir GEF (guanil nucleotide exchange factor) olan SOS ile bağlanıp bunu aktive eder. Aktive olan SOS ise RAS'a GTP bağlayarak aktif RAS-GTP kompleksini oluşturur [86].

Ras ailesi, yapısal ve fonksiyonel olarak korunmuş GTP bağlayan proteinlerdir. Ailenin temel elemanları H-ras, K-ras ve N-ras olmak üzere üç farklı genden kodlanmaktadır. Ailenin bütün elemanlarının karboksi bölgesinde korunmuş CAAX (A' lar alifatik aminoasit, X'ler ise serin ya da treonin aminoasitleri) motifi ve değişken bir bölge (hypervariable domain) bulunmaktadır. Bu bölgeler RAS'ın plazma membranı ile etkileşime geçmesine ve fonksiyonel spesifite kazanmasına neden olmaktadır [87].

RAS ailesi üyeleri GTP veya GDP bağlı formlarda bulunmaktadır. SOS gibi GEF'ler RAS üyelerinde GTP'nin GDP ile yer değiştirmesini sağlarken, GAP'lar ise RAS proteinlerinin düşük intrinsik GTPaz aktivitesini stimüle ederek GTP hidrolizine sebep olup RAS inaktivasyonlarına yol açarlar. RAS GTPazların protein yapısında nükleotid bağlama bölgesinin sınırında switch 1, switch 2 ve P-loop olmak üzere üç bölge bulunmaktadır. P-loop bölgesi nükleotid bağlama alanını oluştururken, diğer iki bölge nükleotidin durumuna göre konformasyon değiştiren mobil bölgeyi oluşturur. GTP bağlı durumdayken switch bölgeleri açık konformasyona gelir ve RAS proteininin alt elemanları ile interaksyona girmesini sağlar. RAS'ın tanımlanmış en önemli efektör molekülleri Raf kinazlar, PI3K ve RalGDS (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) dir. Dolayısıyla, RAS-GTP kompleksi RAF ile bağlanarak ER1/2 enzimlerini, PI3Kp100 ile bağlanarak da AKT yolağını aktive edebilir [88-90].

RAF serin treonin kinaz ailesi A-RAF, B-RAF ve C-RAF olmak üzere 3 RAF izoformundan oluşmaktadır. RAF proteinleri yapısal olarak genel ve korunmuş üç bölgeden oluşmaktadır. Proteinlerin N-ter (amino terminal)'inde CR1 (conserved region 1) ve CR2, C-Ter'inde ise kinaz bölgesini oluşturan CR3 bölgeleri bulunmaktadır [91]. RAF proteinlerinin regülasyonu yapısında bulundurduğu bir çok fosforilasyon bölgeleri ile sağlanmaktadır. Bu bölgelerden bazıları üç formda da korunmuştur. Dolayısıyla bu bölgelerin fosforilasyon mekanizması ortak bir regülasyonun olduğunun göstergesi, diğer bölgelerin fosforilasyonu ise izoformları birbirinden ayıran farklı regülasyonların varlığını göstermektedir [92]. RAS'ın RAF aktivasyon mekanizmasına bakıldığında, GTP bağlı RAS'ın RAF proteinin CR1 bölgesinde bulunan RAS bağlanma bölgesine ve sistince zengin alanına bağlandığı görülmektedir. Bu bağlanma RAF'ın membrana doğru çekilmesini sağlar. Ancak bu durum sadece RAF aktivasyonunun başlangıcı olarak değerlendirilebilirken, RAF'ın kinaz aktivasyonu için yeterli değildir. Tam aktivasyon, izoformlara spesifik olarak numaralandırılmış ancak yapısal olarak benzer bölgede bulunan CR3'de lokalize aktivasyon segmentinin fosforilasyonu ve CR2'de bulunan negatif yüklü segmentin fosforilasyonları ile gerçekleştirilir. RAF'ın kinaz aktivitesi MEK1 ve 2 aracılığıyla ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) ve ERK2'yi aktif hale getirmektedir [92-94].

2.2.1.5. ERK1/2

MAPK ailesinin üzerinde en çok çalışılmış elemanlarından bir tanesidir. ERK1 (p44MAPK), ERK2 (p42MAPK) yüksek derecede benzerlik göstermektedirler. Bu nedenle çoğunlukla birbirlerinin görevlerini telafi edebilmektedirler. Aile elemanları bir çok mitojen ve büyüme faktörü tarafından aktive edilebilmektedir. ERK proteinleri yapısında bir çok MAPK'ın aktivasyonunu sağlayan T-X-Y (treonin-herhangi bir aminoasit-tirozin) motifine sahiptir. Her iki ERK proteini tam aktivasyonu için motifte bulunan T ve Y aminoasitlerinin her ikisinden de fosforile olmalıdır. Proteinlerin tek bir aminoasitten fosforilasyonu durumunda kinaz aktivasyonu söz konusu değildir [95].

ERK proteinleri proline yönelen protein kinazlardır. Dolayısıyla proline komşu olan serin ve treonin aminoasitlerini fosforile etmektedir. ERK proteinlerinin fosforile ettiği hedef motif Pro-Leu-Ser/Thr-Pro dizisidir. Aynı zamanda diğer MAPK'ların da hedefi olan S-P motiferini de diğer komşu aminoasitler olmadan fosforile edebilmektedir [96].

Hücrede ERK proteinlerinin oldukça fazla sayıda substratı bulunmaktadır. İnsülin ise hücre büyüme ve farklılaşması gibi mitojenik etkilerini bu yolak üzerinden göstermektedir. Ancak metabolik yolak ve mitojenik yolakların regülasyonları birbirinden bağımsızdır. Dolayısıyla insülinin iki yolak üzerinde selektif etkisi söz konusudur. Bu yolağın ağırlıklı olarak mitojenik etkilerden sorumlu olduğu bilinse de ERK1/2'nin substratları göz önüne alındığında metabolik yolaklardan sorumlu proteinlerin aktivasyonunda ya da inhibisyonunda rol oynadığı görülmektedir. Örneğin AKT'nin hedefi olan FOXO1'i fosforile etmektedir. Ancak etkileri henüz tam aydınlatılamamıştır [93]. ERK1/2' in diğer bir hedefi ise insülin indüklü lipogenezden sorumlu olan SREBP ailesi elemanlarının regülasyonunu

sağlamaktır. İnsülin indüklü aktive olan ERK1/2'nin SREBP2 ve SREBP1a'yı fosforile ettiği saptanmıştır. Dolayısıyla, ERK1/2 lipid metabolizmasının anahtar regülatörü olarak da görev almaktadır. [93, 97]. ERK1/2 aynı zamanda adiposit farklılaşmasında da rol oynamaktadır. 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde ERK1 ekspresyonu azaltıldığında adipogenezde azalma olduğu görülmüştür. ERK'ün adipogenesis de geç evrede PPAR γ 'yı inhibe ederek farklılaşmayı baskıladığı saptanmıştır[98]. Ayrıca ERK aktivasyonunun beta hücre gelişiminde de önem taşıdığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ERK sinyalinin beta hücre büyümesi ve proliferasyonu açısından oldukça önemli olduğu görülmüş ve insülin bulunmayan farelerde karaciğer spesifik ERK1/2 aktivasyonunun beta hücre kitlesinde artışa neden olduğu görülmüştür [99].

2.3. IRS1 Proteinin, İnsülin Etkisinde Biyolojik Fonksiyonu

İnsülin, hücrede büyüme, farklılaşma, metabolizmanın gelişimi, protein ve DNA sentezi, gen ekspresyonunun regülasyonu gibi bir çok etkiyi indükleyebilmektedir[10]. Bu nedenle gen baskılama çalışmaları insülin uyarımlı IRS proteinlerinin fizyolojik rolleri üzerine etkilerini ortaya koymakta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalar, IRS1 -/- farelerin pre-postnatal dönemde gelişme geriliğinin olduğunu ve iskelet kasında insülin sinyalinde bozulmaya ek olarak orta derece sistemik insülin direnci geliştirdiğini ortaya koymuştur[100].

Organ spesifik çalışmalarda ise IRS1' in özellikle iskelet kası ve karaciğer gelişiminde önemliyken beyin, ince bağırsak ve dalak gelişimine katkıda bulunmadığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, böbrek ve kalp gelişiminde de cinsiyete bağlı polimorfizimler göstermekle beraber önem taşıdığı saptanmıştır.

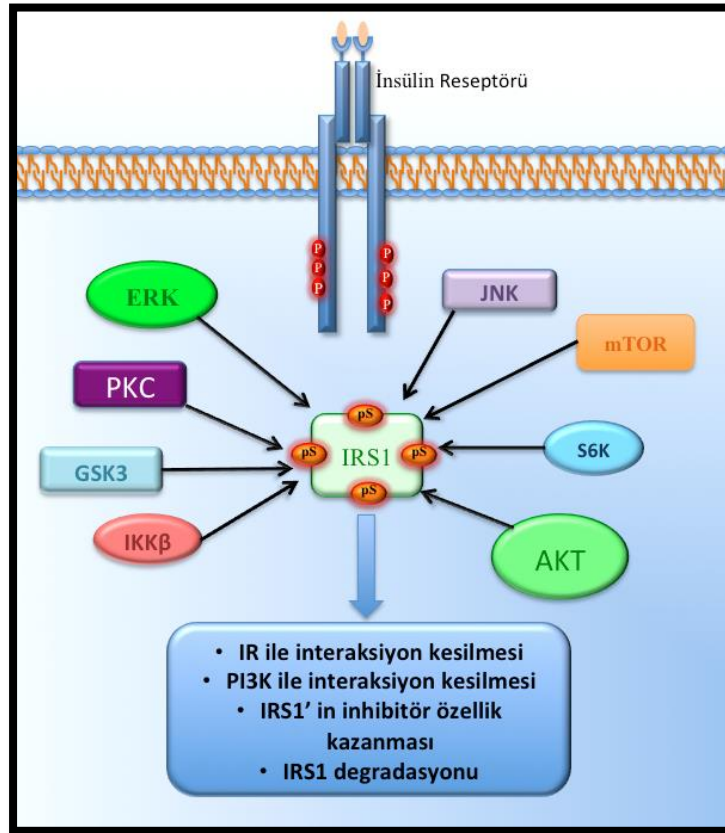
Tokluk plazma glukoz seviyesinin düzenlenmesi, insülinin en önemli görevlerinden bir tanesidir. Bu da yukarıdaki bölümlerde belirtildiği gibi insülin duyarlı dokularda GLUT4'ün membrana translokasyonu ve glukozun hücre içine alımı ile gerçekleşmektedir. IRS1-/- farelerin insülin ve IGF-1 indüklü glukoz alınımlarının oldukça düştüğü görülmüştür. Bu aşamada glukoz alınımlarının tamamen durmamasının nedeni olarak da IRS2 proteinin tirozin fosforilasyonunun artırılması gösterilmektedir. Ancak bu durum insülin direnci gelişimini engellememektedir. Bu hayvanlarda insülin direnci olmasına rağmen, açlık kan şekerlerinin normal olduğu, glukoz intoleransının ise hiperinsülinemi ile azaltıldığı belirtilmiştir [101]. Ayrıca hiperinsülineminin beta hücrelerinin hiperplazisine neden olduğu görülmüştür. Bu hayvanlarda beta hücre kitlesinin artışının yanında glukozu yanıt olarak insülin miktarında ve sekresyonunda da defektlerin olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak ise intraselüler Ca⁺² depolarından otokrin olarak aktive edilen Ca⁺² salınımindaki bozukluk gösterilmiştir [102]. Hiperinsülemik-öglisemik klampler, iskelet kası, karaciğer ve adipoz doku gibi başlıca insülin duyarlı dokulardaki IRS1'in *in vivo* şartlarda insülin direnci gelişimindeki anahtar etkisini ortaya çıkarmıştır. Buna bağlı olarak IRS1-/- modellerde insülin'e bağlı glukoz transportunda ve kas glukojen sentezinde defektlerin olduğu saptanmıştır. Bu durum moleküler olarak incelendiğinde iskelet kasında tirozin fosforile proteinlerle ilişkili olarak insülin indüklü PI3K aktivasyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Bu

durum sürekli eksprese edilen IRS2 proteini ve insülin indüklü aktivasyonu ile bile telafi edilememiştir [103].

Tüm bu verilere ek olarak IRS1^{-/-} farelerde hipertrigliseridemi, hipertansiyon ve endotel-bağı vasküler gevşemede bozulma gibi X sendromunun endikasyonları görülmüştür. Ayrıca, IRS1^{-/-} farelerde ağır osteopeni de saptanmıştır. Bu farelerde insülin ve IGFI indüklü proliferasyon ve farklılaşmanın defekte uğraması nedeniyle osteoklastogenesiste de bozulma saptanmıştır. Dolayısıyla, IRS1'in insülin ve IGF I' in anabolik etkisine bağlı olarak kemik gelişiminde ve devamlılığında önemli olduğu söylenebilir [104, 105].

2.4. IRS1 Proteinin İnsülin Sinyalini Regülasyonu

Hücrel sinyal yollarında kontrol mekanizmaları oldukça önem taşımaktadır. Dolayısıyla insülin sinyalinin kendi kendini kontrol edecek şekilde otoregülasyon sistemi bulunmaktadır. Hücrel kontrol sistemlerinin, otoregülasyonu “homolog desensitizasyon” adı verilen ve sinyalin alt elemanları tarafından yukarıda bulunan proteinlerin aktivasyonunu inhibe etmesi şeklinde gerçekleşebildiği gibi, “heterolog desensitizasyon” yani başka yolak elemanlarının insülin sinyalindeki ana sinyal elemanlarının aktivitesini inhibe etmesi şeklinde de gerçekleşebilir [106]. (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. IRS1 Ser/Thr fosforilasyonunun protein yapısı ve yolak üzerindeki etkileri

İnsülin sinyal yolağının regülasyonu temel olarak geri bildirim mekanizması şeklinde IRS proteinleri tarafından regüle edilmektedir. IRS proteinleri üzerinden insülin sinyali regülasyonu, proteozom aracılı degradasyon, fosfataz aracılı defosforilasyon ve IRS1'in Ser/Thr fosforilasyonu mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu genellikle IRS1'in tirozin fosforilasyonunun azalmasına, IRS1'in PI3K bağlayamamasına ve hatta IRS1'in degradasyonuna neden olarak insülin sinyal yolağını baskılamaktadır. İnsülin sinyalinin kontrolü fizyolojik olarak geri bildirim "negatif feedback" şeklinde kendi sinyal akışını kapatmaya yönelik gerçekleşse de proinflamatuvar sitokinler, oksidatif stres ve yağ asitleri IRS1'in Ser/Thr fosforilasyonunu indükleyerek insülin sinyal iletimine ciddi zararlar verebilmektedir [54, 106].

Son yıllarda bir çok çalışma "IRS1 kinazlar" üzerine yoğunlaşmıştır. IRS1 kinazlar genel olarak iki gruba ayrılabilir. Birinci grup, insülin ve IGF1 sinyalinin mediyatörlerini içermektedir. Bu grupta bulunan kinazlar uzun süreli insülin uyarımlarında IRS1'i negatif etkilemektedir. Diğer grup ise insülin yolağı dışındaki yollara ait insülin ya da IGF1 etkisini inhibe eden kinazları içermektedir. Böyle bir gruplamanın yanında insülin sinyalinin diğer sinyal yollarıyla sıkı etkileşimde olması, bazı IRS kinazların hem insülin tarafından hem de insülin direncini indükleyen kinazlar tarafından da aktive olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle IRS1'in fosforilasyonuna neden olan hücre ortamının, uyarının, fosforilasyon bölgesinin ve etkilerinin belirlenmesi insülin direnci gelişiminin patogenezinin ortaya çıkarılması açısından oldukça önem taşımaktadır [7, 54, 107].

2.4.1. İnsülinle İndüklenen IRS1 Ser/Thr Fosforilasyonu

Bu grup IRS kinazlarını, insülinle stimüle olan sinyalin alt elemanları oluşturur. İnsülin stimüle IRS kinazların etkilerinin, PI3K inhibitörleri tarafından ortadan kaldırıldığı görülmüştür. Bu sayede PI3K yolağının alt elemanlarının IRS1 protein fonksiyonunun negatif regülatörleri olduğu ortaya çıkarılmıştır [108].

PKC ζ , IRS proteinin indüklediği alt yolak elemanlarından bir tanesidir. PKC ζ , insülin uyarımına bağlı olarak adipositlerde ve iskelet kasında glukoz alımını uyarmaktadır [109]. PKC ζ , insülinin fizyolojik etkilerini gerçekleştiren araçlardan olmasının yanında fizyolojik "negatif geri bildirim" mekanizmasını IRS1 üzerinde Ser/Thr fosforilasyonu yaparak gerçekleştirmektedir [108]. Fao ve NIH3T3 hücre hatlarında PKC ζ 'nin, uzun süreli insülin muamelesinde ve ekspresyonunun artışında insülin sinyalini baskılandığı belirlenmiştir. PKC ζ ekspresyonunun artışında endojen IRS1'in PKC ζ ile insüline bağlı bir durum olarak kompleks oluşturduğu ve sinyalin durmasına neden olduğu saptanmıştır [110]. Uzun süreli insülin muamelesi durumunda ise IRS1 i S323 pozisyonunda fosforile ederek IRS1'in IR'dan ayrılmasını sağladığı bulunmuştur. Bu verilere ek olarak S323A değişimini eksprese eden hücrelerde IRS1'in tirozin fosforilasyonunu azaldığı ve AKT S473 fosforilasyonunun da defekte uğrattığı saptanmıştır [111]. Bu bölgenin yanında IRS1'in S503, S574 ve S616 bölgelerinin de PKC ζ tarafından fosforile edildiği ve bu bölge fosforilasyonlarının IRS1'in PI3K ile olan etkileşimini kestiği gösterilmiştir [112].

İnsülin uyarımına bağlı olarak IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu gerçekleştiren diğer IRS kinazlar mTOR ve S6K dir. mTORC1 ve S6K, IRS1'i sırasıyla S312, S616, S636 ve S307, S527, S270, S1101 bölgelerinden fosforilasyona uğratmaktadır. Bu fosforilasyonların IRS1 tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. S6K'in insülin sinyalinin regülasyonundaki fizyolojik önemi S6K -/- modeller ile gösterilmiştir. HFD (yüksek yağlı diyet) le beslenen S6K-/- farelerin insülin reseptörlerini tam otofosforile ve aktive edemedikleri saptansa da hayvanların insülin direnci geliştirmediği belirlenmiştir. Bunun nedeninin ise IR'ın alt sinyal elemanlarının, insülin sinyal akışını hızlandırarak durumu telafi etmesi olarak açıklanmıştır. [113]. Bu farelerin adipoz dokularında S307, S636 ve karaciğer dokularında S1101 bölgelerinin fosforilasyonunda azalma olduğu görülmüştür. Buna karşın, HFD' la beslenen yabanıl tip farelerin insülin direnci geliştirdiği ve IR ile birlikte alt elemanlarının da aktivasyonlarında azalma olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda bu hayvanlarda IRS1 S636 ve S307 pozisyonlarındaki fosforilasyonlarda da artış görülmüştür [114].

AKT'nin IRS kinaz olarak etkisi hem pozitif hem negatif yöndedir. Membran lokalize AKT'yi ektopik eksprese eden CHO-T hücrelerinde 1 saatten daha uzun süreli insülin muamelelerinde IRS1 tirozin fosforilasyonunu kalıcı kıldığı ve sabitlediği ancak 2 dk. insülin muamelesinde böyle bir etkinin görülmediği ortaya çıkarılmıştır [115]. Ancak, IRS1'in S270/S307/S330/S636A mutasyonlarından oluşan vektörün ekspresyonu bu pozitif etkiyi elemine etmiştir. Başka bir çalışmada ise IRS1'in AKT bağımlı S629 fosforilasyonunun IRS1 tirozin fosforilasyonuna ve p85'e bağlanmasına yardım ettiği saptanmıştır. Bu bölge ratlarda bulunmamaktadır [116]. Ayrıca bu bölgenin fosforilasyonunun mTORC1 ve ERK1/2' nin hedefi olan S636 fosforilasyonunu da azalttığı belirlenmiştir. Ancak tip 2 diyabet, obez ve normal bireylerin kas dokuları üzerinde gerçekleştirilen MS (kütle spektrometre) analizlerinde bu bölgenin fosforilasyonu arasında belirgin bir değişim saptanmamıştır. S629 fosforilasyonunun insülin sinyali üzerindeki pozitif etkisine karşın S527'nin AKT tarafından fosforilasyonunun sinyal üzerinde negatif etki yarattığı saptanmıştır. S527 fosforilasyonunun HEK293 hücrelerinde IRS1'in tirozin fosforilasyonunu azalttığı ve IRS1 - PI3K etkileşimini engellendiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu fosforilasyonun sağlıklı bireylerin kas dokusunda hiperinsülinemik clamp süresince de artış gösterdiği saptanmıştır [117, 118].

Kısmi olarak IRS'ten bağımsız, insülin uyarımlı ERK1/2 aktivasyonu bu kinazları metabolik hastalıklarda, kronik IRS Ser/Thr fosforilasyonu açısından iyi bir aday haline getirmektedir. Yapılan çalışmalarda insülin indüklü ERK1/2 aktivasyonunun artmasının yüksek yağlı diyetle beslenen bireylerin adipositlerinde hücreleri insüline daha duyarlı hale getirdiği görülmüştür. Bunun nedeninin ise ERK aktivasyonunun adipositlerin büyümesine katkıda bulunması olduğu belirtilmiştir. Bu durumu destekleyici nitelikte HFD ile beslenen ERK1-/- farelerde beyaz yağ dokusu kitlesinde azalma ve insüline olan duyarlılıkta daha da artış olduğu saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak ERK1/2' nin lipolizisi indüklediği ve insülin direncine neden olabildiği söylenebilmektedir [119].

IRS benzeri adaptör protein ya da SHP2'yi kodlayan Gab1 ve Ptpn11 delesyona uğratılmış farelerin karaciğerinde insülin uyarımlı ERK1/2 aktivitesinde belirgin bir düşüş olurken IRS1 tirozin fosforilasyonunda ve insülin duyarlılığında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum ERK1/2 aktivitesinin azalmasından çok Ptpn11 delesyonu kaynaklı olabileceği düşünülse de bu farelerin karaciğer dokularında, hücre kültüründeki negatif etkilerinden farklı olarak IRS1 S307 fosforilasyonunda artış olduğu saptanmıştır. Gab1-/- farelerde ise S616 fosforilasyonunda azalma olduğu ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda S616 fosforilasyonunda azalma Grb2 heterozigot farelerde de görülmüştür. Bu nedenle bu alanın ERK1/2 fosforilasyon alanı olabileceği düşünülmektedir[120, 121]. ERK1/2-aracılı IRS1 S616 fosforilasyonunun vasküler endotel hücrelerinde anjiyotensin II-aracılı nitrik oksit sentetaz aktivasyonunu da bozduğu ortaya çıkarılmıştır. Grb2-/-, C2C12 kas hücrelerinde ise S616 ve S636 fosforilasyonlarında azalma olduğu saptanmıştır. ERK bağımlı IRS1 fosforilasyonunun patolojik etkileri üzerine gerçekleştirilen tüm bu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ek olarak Tip 2 diyabetli bireylerin kas hücrelerinde S636 fosforilasyonunda artış olduğu görülmüştür. Bu bölgenin fosforilasyon seviyesinin, ERK1/2 aktivitesinin kimyasal olarak baskılandığında ise azaldığı gözlemlenmiştir [122, 123].

GSK3, insülin bağı bir kinaz olmasa da insülin ile düzenlenen bir kinazdır. AKT tarafından GSK3 inhibisyonu ve GSK3'ün IRS1 regülasyonu üzerindeki etkisi, hücrenin insülinle uyarımlı durumundan çok bazal seviyedeki durumu açısından daha önemlidir. Yapılan çalışmalar, GSK3'ün bazal durumdaki IR aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonunu azalttığını göstermektedir. IRS1 geni üzerinde yapılan SDM (site directed mutagenesis) çalışmalarında, GSK3'ün fosforilasyon motifi olan SXXXS aminoasit dizisindeki S337 ve S341 aminoasitelerinin alanin formlarını eksprese eden hücrelerde bazal ve insülin uyarımlı durumlarda IRS1 tirozin fosforilasyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, insülin uyarımlı AKT aktivasyonunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla GSK3 proteini ve aktivasyonundaki artış insülin direnci ve diyabet gelişiminde IRS1 regülasyonu açısından oldukça önem taşımaktadır [124, 125].

2.4.2. Hücresel Stres ve İnsülin Direnci Uyarımları Tarafından İndüklenen IRS1 Ser/Thr Fosforilasyonu

Fizyolojik koşullar altında insülin sinyal yolağında, insülin etkisinin regülasyonunun sağlandığı bir çok hücresel kontrol bölgesi olmasının yanında insülin direncinde IRS sinyali homeostatik değildir. Bunun nedeni insülin direnci durumunda hiperinsülineminin sürekli devam etmesi ve insülin bağımsız geri bildirim yollarının da devreye girmesidir. Bu süreç ilerledikçe lipid ve inflamatuvarla ilişkili yollar da IRS sinyaliyle etkileşime girmeye başlamaktadır. Böylece, IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu-aracılı insülin sinyal yolağı regülasyonunda, bir çok enzim IRS1'i aynı veya farklı bölgelerden fosforile ederek patolojik durumun gelişimine sebep olmaktadır [52, 54, 124].

mTOR ve S6K, insülin bağımlı ve normal fizyolojik koşullar altında insülin sinyalini geri bildirim mekanizması aracılığıyla kontrol etmekteydi. Ancak insülin direnci gibi patolojik durumlar altında insülin bağımsız olarak da aktive

olabilmektedirler. Bu yolak aminoasit ve glukoz gibi besinlere karşı oldukça hassas bir yoldur. Nitekim besin alımının artışı durumunda insülin duyarlılığında belirgin derecede azalma meydana gelmektedir [126]. Yapılan çalışmalarda, hücrelerin yüksek glukoz ve lüsin ile muamelesi sonucunda bu yolağın aktive olduğu ve IRS1'i S307 ve S1101 pozisyonlarından fosforile ettiği saptanmıştır. Benzer şekilde mTOR inhibitörleri olan TSC1/TSC2 ekspresyonu baskılanmış fare embriyonik fibroblast hücrelerinde, artan mTOR aktivasyonuna paralel olarak insülin direnci geliştiği de gözlemlenmiştir. Bu hücrelerde IRS1'in S307, S312, S616 ve S636 fosforilasyonlarında artış saptanmıştır. mTOR ve S6K yolağı aminoasit ve glukoz gibi besinler için bir sensör durumundadır. Dolayısıyla, besinlerin aşırı tüketimine bağlı olarak aktif hale gelmekte ve IRS1 Ser/Thr fosforilasyonunu gerçekleştirerek insülin direncine sebep olmaktadır [127]. Bu açıdan bakıldığında mTOR inhibisyonu tedavi için bir hedef gibi gözükse de uzun süreli mTOR inhibitörü Rapamycin kullanımının insülin direncini artırdığı görülmüştür. Bunun nedeninin ise yüksek enerjili diyetle ilgili olarak kas ve adacıklarda stresle aktive olan enzimlerin miktarındaki artış olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bu yolağın hem aktivasyonu hem de inhibisyonu farklı yollar üzerinden insülin direncine sebep olmaktadır [128].

İnsülin direnci gelişiminde en önemli etkenlerden bir tanesi inflamasyondur. İnflamasyon yollarının aktivitesine neden olan TNF α , IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler insülin duyarlılığının azalmasına neden olmaktadır. Çünkü bu sitokinler tarafından aktive edilen ERK, JNK ve IKK enzimlerinin IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu yaparak insülin sinyal yolağını baskılamaktadır. TNF α insülin sinyali üzerindeki negatif etkisini, JNK aktivasyonu aracılığıyla IRS1 S307 fosforilasyonu ile gerçekleştirmektedir. Bu bölgenin fosforile edilemeyen alanin aminoasiti ile değiştirilmesi durumunda TNF α 'nın negatif etkisi ortadan kalkmaktadır. Benzer şekilde JNK aktivitesinin hayvanlarda inhibitör peptidler ya da hücre kültürü ortamında dominant negatif JNK ekspresyon ile engellendiği durumlarda insülin sinyalinin normale dönmesi sağlamaktadır [52].

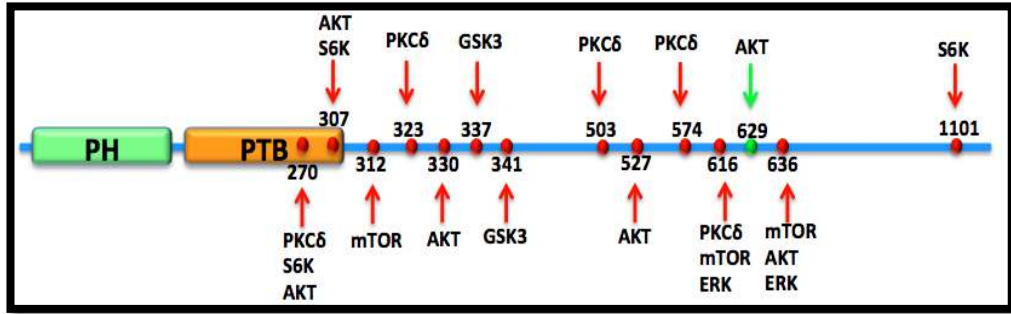
TNF α indüklü insülin direnci gelişimine katkıda bulunan diğer bir protein ise IKK β dir. IKK β , NF κ B aktivasyonunu sağlayan bir enzim kompleksinin üyesidir. IKK β -/- farelerin HFD ile gelişen insülin direncine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. IKK inhibitörü olan salisilatların kullanımının, TNF α aracılı baskılanan IRS1 tirozin fosforilasyonunu ortadan kaldırdığı da saptanmıştır [2]. Tip 2 diyabetli hastaların dolaşımında, iskelet kasında ve adipoz dokusunda TNF α konsantrasyonu yüksektir. Ayrıca sağlıklı bireylere TNF α infüzyonu durumunda insülin direncinin geliştiği gösterilmiştir. Kaslarda TNF α aktivasyonu, yukarıda belirtilen yolların yanı sıra S6K, ERK1/2 gibi bir çok kinazın aktivasyonuna da sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda böyle bir durumda S307 fosforilasyonunda artış saptanamazken, IRS1 tirozin fosforilasyonunun azaldığı görülmüştür. Bunun nedeninin ise TNF α infüze edilmiş bireylerde artan IRS1 S636 fosforilasyonu olduğu düşünülmektedir [129]. IL6 ve IL1'nin ise TNF α 'ya benzer şekilde IKK, JNK, ERK aktivasyonu aracılığıyla özellikle IRS1 S312 ve S616 fosforilasyonlarını arttırarak insülin direncine neden olduğu saptanmıştır [130].

İnsülin direnci gelişimine katkıda bulunan çevresel faktörlerden bir tanesi de vücutta artış gösteren lipid türevleridir. Genellikle diyetlerde bulunan doymamış uzun zincirli yağ asitlerinin JNK aktivasyonuna etkisinin olmadığı gözlenirken, palmitat gibi doymuş yağ asitlerinin JNK aktivasyonuna ve IRS1 S312 fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca seramid'lerin de hem besin yolağı üzerinden hem de JNK, IKK, NFkB ve TNF α aracılı IRS1 S312 fosforilasyonunu artırarak insülin direncine neden olduğu saptanmıştır[8, 52].

DAG (diacilgliserol) de insülin sinyali üzerinde antagonistik etki yapmakta ve bunu özellikle "atipik PKC" enzimleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Bir çok PKC türevinin IRS1'i özellikle S307, S312, S323, S341, S574, S616 bölgelerinden fosforile ederek insülin sinyalini baskıladığı saptanmıştır [131].

Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi de insülin direnci gelişiminde önemli rol oynamaktadır. ROS (reaktif oksijen türevleri) ların JNK ve IKK gibi kinazları aktive edip fosfatazları inhibe ederek IRS1 Ser/Thr fosforilasyonuna neden olduğu bilinmektedir. ER stresi özellikle obezite, lipid birikimi ve inflamatuvar sitokinler tarafından uyarılmakta ve insülin direnci gelişimine katkı yapmaktadır. Artan ER stresi özellikle JNK-aracılı S312 fosforilasyonu ile insülin direnci gelişimine sebep olabilmektedir [132, 133].

Tüm bu veriler göz önüne alındığında, IRS1 Ser/Thr fosforilasyonunun, dışarıdan gelen uyarılara ve uyarılara bağlı olarak regüle edildiği söylenebilir. IRS1' in bu regülasyonu bir çok metabolik yolağın ortak noktasını oluşturmaktadır. Dolayısıyla IRS1 üzerinde fosforilasyona uğrayan bölgelerin, uyarıların ve etkilerinin belirlenmesi insülin direncinin patogenezinin açıklanması açısından oldukça önemlidir.



Şekil 2.5. IRS1' in insülinle indüklenen ve/veya hücrel stresle indüklenen kinazlar tarafından gerçekleştirilen Ser/Thr Fosforilasyon bölgeleri ve etkileri (Kırmızı: Negatif etkiyi, Yeşil: Pozitif etkiyi göstermektedir.)

2.5. p38 MAPK

p38 MAPK yolağı, stresle aktive olan ve inflamasyondan, profibrotik cevaptan, glukoz alımından, farklılaşmadan ve proliferasyondan sorumlu yolakları regüle etmektedir [134-136].

p38 MAPK ailesi LPS (lipopolisakkarit) muamelesi sonucunda tirozin fosforilasyonuna uğrayan 38 kDa' luk protein olarak tanımlanmıştır. [137]. p38 MAPK'lar dört farklı genden kodlanmakta ve farklı dokularda ekspresyon göstermektedirler. Ailenin yaygın ekspresyon gösteren elemanı p38 α ' dır [136].

İnflamatuar sitokinler, çevresel stres, büyüme faktörleri, cAMP üreten hormonlar, yüksek glukoz konsantrasyonu, serbest yağ asitleri tarafından aktive edilen enzimler "dual specificity kinaz" olan MKK3 ve MKK6 enzimlerini aktive ederler. Aktifleşen MKK3 ve MKK6 p38 MAPK'ı aktivasyon segmentindeki Thr180-Gly-Tyr182 motifinde bulunan Thr ve Tyr aminoasitlerinin ikisini birden fosforile ederek aktivasyonunu sağlarlar [138, 139].

p38 MAPK pek çok transkripsiyon faktörü ve enzimi fosforile ederek aktive veya inhibe eder [136, 140]. İnsülin, insülin sinyali aracılığıyla karaciğerde glukoneogenesi inhibe ederken glikojen sentezi aktivasyonunu sağlamaktadır. Buna ek olarak lipolizin artması glukoneogenesinin substratı olan serbest yağ asitlerinin plazmada artışına neden olur. Tip 2 diyabetli ve insülin direnci bulunan bireylerde hepatik glukoneogenesinin arttığı, hepatik glikojen sentezinin ise inhibe olduğu bilinmektedir [141]. Yapılan çalışmalarda FFA (serbest yağ asidi)'nın ve glukagonun karaciğerde p38 MAPK aktivasyonuna sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır [142, 143]. Tip 2 diyabetli hastalarda p38 MAPK'ın kontrol edilemeyen hepatik glukoneogenezisde önemli rol oynadığı belirtilmektedir. p38 MAPK, hepatik glukoneogenesi bir çok mekanizma aracılığı ile kontrol etmektedir. Bunlardan birincisi PGC1alfa (peroxisome proliferator-activated receptor- α co-activator) aracılığıyla glukoneogenesisden sorumlu genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır. İkincisi CREB (c-AMP response binding element) protein aracılığıyla PGC1 alfa genlerinin ekspresyonunu indükler. Üçüncüsü ise C/EBP (CAAT/enhancer-binding protein) proteinin fosforilasyonunu sağlayarak PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) transkripsiyonunu aktive eder. Ayrıca p38MAPK'ın açlık durumunda glukoz üretme kapasitesi olan temel organ böbreklerde de PEPCK geninin transkripsiyonu aracılığıyla glukoneogenesi düzenlediği bilinmektedir [143-146].

p38 MAPK'ın iskelet kasları ve adipoz dokudaki rolü ile ilgili veriler çelişkili olsa da glukoz alımı ve kullanımında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. p38 MAPK'ın insülin ve egzersiz uyarımlı GLUT4 aracılı glukoz alımında pozitif rol oynadığı düşünülmektedir. p38MAPK'ın iskelet kaslarında egzersize bağlı aktivasyonu sonucundan MEF2 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayarak GLUT4 ekspresyonunu uyardığı da saptanmıştır [147]. p38 MAPK'ın lipid metabolizmasındaki rolüne bakıldığında ise hepatik lipogenezinin inhibisyonunda önemli rol oynadığı görülmektedir. p38 MAPK baskılanması sonucunda plazma trigliserit seviyesinin ve hepatik lipid içeriğinin hızla arttığı görülmüştür. p38 MAPK'ın hepatik lipogenezdeki inhibitör rolünün hepatik glukoz üretimindeki

uyarıcı etkisi ile dengede olduğu düşünülmektedir. Çünkü, p38 MAPK lipogenezi inhibe ederek, glukoneogenezis için substrat moleküllerin kullanımını engellemektedir [148].

p38 MAPK'ın insülin direncindeki moleküler rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da yapılan çalışmalarda bazal p38 MAPK ekspresyonunun Tip 2 diyabetli ve insülin dirençli bireylerin karaciğer ve adipoz dokularında arttığı saptanmıştır. İskelet kaslarındaki p38 MAPK artışının TNF aracılı p38 MAPK aktivasyonundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. İnsülin direnci ve Tip 2 diyabet gelişiminde etkisi olan sistemik inflamasyonun, FFA'nın ve birçok çevresel ajanın p38MAPK'ı aktive ettiği bilinmektedir. Bunun yanında p38 MAPK'ı aktive eden TNF gibi faktörlerin de IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu aracılı insülin direncini indüklediği bilinmektedir.

2.6. Hipotez

Bu noktadan yola çıkarak, IRS1 proteininin aminoasit dizisini incelediğimizde PI3Kp85'in bağlanma bölgelerinin (YxxM) hemen devamında bulunan 4 adet spesifik dizilimin p38 α 'nın substratı olabileceğini saptadık. Bu diziler insanda GYMPMS₆₁₆P, DYMPMS₆₃₆P, GYMMMS₆₆₆P, DYMNMS₇₃₆P sırasına sahiptirler ve hepsi p38 MAPK fosforilasyon bölgesidir. Bu bağlamda, aktive olan p38 α 'nın IRS1'i yukarıda belirtilen amino asitlerden fosforile etmesi durumunda YxxM dizisinin adeta dibinde olan böyle bir fosforilasyonun getireceği negatif yükten dolayı insülin reseptörünün YxxM'de Y fosforilasyonu yapamayacağını ve bu yüzden IRS1 aktivasyonunun inhibe edileceğini düşündük. Bizim hedeflediğimiz bölgelerin IRS1 aktivasyon noktasına bu kadar yakın oluşu ve bu bölge modifikasyonlarının p38 MAPK ile daha önce ilişkilendirilmemiş olması İnsülin-aracılı IRS1 aktivasyonuna ayrıca bir önem katmaktadır. Bu nedenle, projemizdeki esas amacımız, p38-aracılı IRS1 fosforilasyonunun (S616, S636, S666, S736 üzerinden) hücrenin insülin duyarlılığını ve proliferasyonunu nasıl etkilediğini açığa çıkarmaktır.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda SV-40 transforme insan embriyonik böbrek hücreleri (293T) kullandık. Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Bovin serum (FBS-Biochrom cat. no: S0115) ve PSA (Penisilin /Streptomisin/Amfoterisin) (BI- 03 033 113) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium-Biochrom FG0415) içinde monolayer kültürler olarak %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde (Shellab) çoğaltıldı.

3.2. pcDNA3 Flag Tagged İnsan IRS1 (İnsulin Reseptör Substrat 1) Memeli Ekspresyon Vektörünün Filtre Kağıdından Sökülmesi

Kullanılan Solüsyonlar

Tris- EDTA (TE): 10 mM Tris-Cl (Vivantis pro612) (pH 7.5)
1 mM EDTA (Sigma)

Uygulama

pcDNA3 Flag tagged insan IRS1 ekspresyon vektörü Kaliforniya Üniversitesi Jonsson Comprehensive Kanser Merkezi öğretim üyesi Prof. Dr. Alan Lichtenstein tarafından temin edildi. Ekspresyon vektörü whattman kağıdına emdirilerek gönderilmiştir. Plasmid emdirilen bölge 56°C derecede TE tamponu içerisinde vortekslenerek çözüldü.

3.3. pcDNA3 Flag-tagged insan IRS1 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması İçin E.coli DH5α Suşuna Transformasyonu

Vektörün çoğaltılması için E.coli DH5α suşu kullanıldı. Transformasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi amacıyla öncelikle DH5α suşu, plazmid vektörü alabilecek kompetan hale getirildi ve ardından transformasyon işlemine geçildi.

3.3.1. CaCl₂ Yöntemiyle Kompetan DH5α Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar

1. LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri: %2' lik olacak şekilde 4 g LB (Merck 1.10285.0500) toz 200 ml distile su içerisinde çözülerek otoklav edildi.
2. 50 mM CaCl₂ (Sigma C1016) /10 mM Tris (pH:7.4)
3. %100 gliserol (Sigma G2025)

Uygulama

1. Bir koloni ya da dondurulmuş DH5 α E.coli suşundan 20 μ l alındı ve 10 ml LB sıvı besiyerine konuldu.
2. 37°C çalkalamalı etüvde gece boyu inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonucunda 1-2 ml alınarak 200 ml LB besiyerine kondu ve 4 saat inkübe edildi.
4. Bakteri yoğunluğu O.D₆₀₀ =0,2-0,5 aralığında olmalıdır.
5. 200 ml besiyeri 10 dk buzda bekletildi.
6. 50 ml' lik falkonlara bölündü ve 2000 rpm'de 4°C' te 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine önceden soğutulmuş 50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH: 7.4)' den 100 ml ilave edildi.
8. 15 dk buzda bekletildi. 2000 rpm'de 4°C' de 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 9 ml 50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH: 7.4) ve 1 ml %100 gliserol karışımından konarak homojenizasyon sağlandı.
10. 250 μ l miktarlarında 1,5 ml'lik ependorf tüplere bölündü ve -80°C' de saklandı.

3.3.2. Agar Hazırlanması

2 gr LB Broth ve 1 gr Bakteriyolojik agar (Oxoid L11) üzerine 100 ml distile H₂O ilave edilerek otoklavlandı. Agar donmadan hemen önce (yaklaşık 40 °C' de) 100ml agara 100 μ l ampicilin (50mg/ml) eklendi ve petri kaplarına dağıtılarak soğuması beklendi.

3.3.3. E. Coli DH5 α Suşuna Plazmid Transformasyonu

1. DH5 α kompetan E.colilerden 75 μ l ve plazmidten 7 μ l alınarak ependorfa kondu.
2. 30 dk buzda bekletildi.
3. 1 dk 42 °C' de su banyosunda bekletilerek tekrar buza alındı.
4. Tüpe 1 ml LB besiyeri kondu ve 1 saat 37°C' de 150 rpm'de çalkalayıcıda (Sartorius) inkübasyona bırakıldı.
5. Petriye ekim yapılacaksa 4 °C' de 5000 rpm' de 10 dk ya da 2500 rpm' de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 900 μ l'si atıldı. Geri kalan 100 μ l ile pelet süspanse edildi.
6. "L" şeklindeki pastör pipeti ile 50mg/ml ampicilinli (Sigma A9393) LB agara yayarak ekildi ve gece boyu 37°C' de inkübe edildi.
7. Ertesi gün oluşan koloni alınarak 200 ml ampicilinli sıvı LB içerisine alınarak gece boyu 37°C' de 150 rpm' de inkübasyon yapıldı.
8. 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet -20°C' de saklandı.
9. Daha sonra peletten plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

3.4. Bakteriden Plazmid İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyonlar

50 mM D-Glukoz (Sigma 16301) (MA: 180) Hazırlanışı: 0,9 gr glukoz 100 ml distile H₂O'da çözüldü.

10N NaOH (Sigma 06203) (MA: 40) Hazırlanışı: 40 gr NaOH 80 ml distile H₂O çözüldükten sonra hacim 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon I Hazırlanışı:

1. 50 mM D-Glukoz : 0,9 gr D-Glukoz
 2. 25 mM TrisHCl (pH:8.0) : 2,5 ml (1M tris stoktan)
 3. 10 mM EDTA : 10 ml (100mM EDTA stoktan)
- Karışım 100 ml'ye tamamlandı.

Solüsyon II Hazırlanışı: (Kullanımdan hemen önce hazırlanır)

1. 0,2 N NaOH : 2 ml (10 N NaOH stoktan)
 2. %1 SDS : 10 ml (%10' luk SDS stoktan) (SDS-Merck 8.22050.1000)
- Karışım 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon III Hazırlanışı:

1. 5M potasyum asetat (Codex 358907): 49,075g 100 ml' de çözülerek 60 ml' si kullanıldı.
2. 11,5 ml glasial asetik asit (Sigma 27222)
3. 28,5 ml steril H₂O.

Uygulama

1. 100 µg/ml Ampisilin içeren 100 ml besiyerinde gece boyu üretilen transforme bakteriler çoğaldıktan sonra 50 ml' lik falkonlara bölündü.
2. 5000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve pelet kaldırıldı. Pelet üzerine 5 ml Solüsyon I' den ilave edilerek vortekslendi ve 5 dk buzda bekletildi.
4. Üzerine 10 ml Solüsyon II'den ilave edildi. Tüp alt üst edilerek buzda 5 dk bekletildi.
5. Buzda bekletilen tüplere 7,5 ml Solüsyon III'den ilave edildi ve karıştırılarak 10 dk buzda bekletildi.
6. Tüpler, 5000-8000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
7. Üst faz yeni tüpe alınır, final konsantrasyonu 0,5mg/ml olacak şekilde RNAz ilave edildi. 37°C' de 30 dk su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
8. Süre sonunda eşit hacimde üzerine fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi ve 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Üzerine 2 hacim saf etanol eklendi. - 80°C'de 1 saat ya da gece boyu bekletildi.
10. Tüpler 8000 rpm' de 1 saat santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı, pelet kurutuldu ve 1 ml TE' de çözüldü.

3.5. 293T Hücrelerine Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu

Kullanılan Solüsyonlar

1. 2XHEPES – pH: 7,05

500 ml hazırlamak için;	
280mM NaCl (Merck 1.06404.1000)	8g (susuz)
10mM KCl (Sigma H3375)	0,37g
1,5 mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck 1.06345.1000)	0,3g
12 mM D-Glukoz (Sigma 16301)	1g
50 mM Hepes (Sigma H3375)	5g

2. 2M CaCl₂ (Sigma C1016): 5,88 gr 20 ml distile suda çözülür. Deney aşamasında 0,25 M oranında kullanılır.

3. 0,1X TE pH:8.0

4. %10 gliserol içeren DMEM

5. Phosphate Buffer Saline (PBS) Solüsyonu: 8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözülür. NaOH ile pH 7.4' e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildi.

Uygulama

293T hücreleri transfeksiyondan bir gün önce 100 mm' lik petrilere pasajlandı ve ertesi gün yaklaşık %70-80 konfluent olan hücrelere transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonda 30 µg vektör DNA'sı Sodyum asetat/Etanol çöktürme yöntemi ile sterilize edildi ve çöken pelet 1 ml 2xHEPES pH:7.05 içinde çözülür. Bunun üzerine 0.25 Molar 1 mL CaCl₂ solüsyonu damlalar halinde ilave edildi ve iyice karıştırılan örnek laminar kabin içinde 30 dk bekletildi. Bu süre sonunda oluşan ve net olarak görülen kalsiyum fosfat-DNA kompleksi pipetaj ile daha küçük parçalara bölündü ve örnek 10 ml besiyerinde bulunan hücrelerin üzerine 20 cm mesafeden damlalar halinde bırakıldı. Gece boyu inkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler %10 gliserol içeren DMEM ile 1 dk şoklandı. Şoklamanın ardından şoklama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1XPBS ile iki kere yıkandı ve normal büyüme ortamı (PSA ve %10 serum içeren DMEM) hücrelere verildi.

3.6. Transfekte Olan 293T Hücrelerinin Seçilmesi

pcDNA3 vektörünün seçim belirteci olarak yapısında neomisin/G418 geni mevcuttur. Bu nedenle vektör ile transfekte olan 293T hücrelerinin seçilimi için neomisin/G418 (Calbiochem 345810) (0,4g/mL) içeren DMEM besiyeri kullanıldı. Transfeksiyon işleminden iki gün sonra 293T hücreleri tripsinize edilerek kaldırıldı ve 96 kuyucuklu neomycinli DMEM içeren kültür kaplarına ekildi. Yaklaşık 1 ay süresince yapılan seçimde neomycinli ortamda çoğalabilen koloniler seçildi.

3.7. Hücrelere Anisomisin (p38 MAPK aktivatörü), SB203580 (p38 MAPK inhibitörü) ve İnsülin İle Muamelesi

1. Hücreler %70-80 konfluent olana kadar %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde %5 CO₂’ li etüvde kültüre edildi.
2. Hücrelerin bulunduğu besi ortamı uzaklaştırıldı.
3. İki defa 1xPBS ile yıkandı.
4. Hücrelere serum içermeyen besiyeri verildi.
5. Hücreler gece boyu veya 16 saat süresince serumsuz ortamda bekletildi.
6. Süre sonunda ilgili gruplara 100 ng/μl konsantrasyonunda insülin, 10 μg/ml konsantrasyonunda anisomisin ve/veya 2 μM konsantrasyonda SB203580 içeren DMEM eklendi. İnsülin muamelesi için 5 dk., Anisomisin ve SB203580 muameleleri için 1 saat beklendi.
7. Muamele sonunda hücreler tekrar 1xPBS ile iki defa yıkandı.
8. Hücre kazıyıcısı (Greiner cell scraper 541 080) yardımıyla hücreler Liziz tamponu içerisinde kaldırıldı ve lizatları hazırlandı.

3.8. Hücre Lizatı Hazırlanması

Kullanılan Solusyonlar

Triton-X Lizis Tamponu

100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadat (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001). Solusyon pH: 7,4 (pH metre:Hanna Instruments pH 211)’ e ayarlandı.

Uygulama

Besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 10 mL soğuk 1xPBS ile yıkandıktan sonra 1 mL Triton-X Lizis tamponu hücrelerin üzerine konarak hücreler kazındı ve steril 1,5 mL’lik ependorf tüpüne alındılar. Buz içinde 10 dk tutulan örnekler 1 dk. vorteksledikten sonra 10.000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant lizat olarak steril bir ependorf tüpe transfer edildi. Örnekler kullanılabilecek kadar -80°C’de (Thermo scientific 994) saklanmıştır.

3.9. Protein Miktar Tayini

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standartına karşı gerçekleştirildi. Stok BSA (10mg/mL) Solüsyonundan 1μg/μl olacak şekilde Solüsyon hazırlanır. Standart eğrinin çizilmesi için bu solüsyondan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15 μg olacak şekilde ayrı ayrı konuldu. Yine -80°C’deki hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1’er μl ilave edildi. BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Üçlü tekrarların ortalama verisi alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.10. İmmünopresipitasyon Yöntemi

IRS1 ve p38 MAPK' ın fiziki olarak birbirine bağlandığını göstermek için her iki protein hem ekspresyon yapılmamış hem de 48 saat boyunca ekspresyonu yapılmış 293T hücrelerinden hazırlanan 2 mg hücre lizati kullanılarak immunopresipitasyona tabii tutuldu.

Uygulama

1. 2mg protein lizatları üstüne 950 µl' ye tamamlayacak şekilde Triton X liziz tamponu eklendi.
2. Karışımın üstüne 50 µl Agaroze G/A bead (sc-2003) eklendi ve 1 ml' ye tamamlandı. Bu aşamada beadlerin homojenizasyonu oldukça önemlidir. Bu nedenle pipetaj yapılmalıdır.
3. Karışım nutatör yardımıyla 4°C'de 30 dk çalkalandı.
4. Süre sonunda tüp 10.000 rpm'de 4°C'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant yeni ependorflara dökülerek aktarıldı, bead içeren pellet atıldı. 20 µl Anti-IRS1 (Santa Cruz Sc-7200) eklendi. Nutatörde, 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda üzerine 100µl agaroze A/G bead eklenir ve gece boyu 4 °C çalkalandı.
7. Ertesi gün örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılır ve pelet üzerine 1 ml Triton-X Liziz Tamponu eklenerek alt üst edilir ve bu yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı.
8. A/G beadler üzerinde tampon kalmayacak şekilde süpernatant atıldı.
9. Pelet üzerine 100 µl β-merkaptotanol içeren SDS yükleme tampon konuldu ve tüpler kaynar suda 5 dk. bekletilerek vortekslendi.
10. Son olarak, örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
11. A/G beadlerden kurtulan ve süpernatantta mevcut olan proteinlerin 50 µl'si western blot yöntemiyle analiz edildi.

3.11. Western Blot Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5M TrisBase pH: 8.8. 1 lt.' si için 181,64 gr TrisBase tartıldı ve distile H₂O'da çözüldü.

Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5M TrisBase pH:6,8. 1 lt' si için 60,5 gr TrisBase tartıldı ve distile H₂O'da çözüldü.

Running Buffer (10X): 15 gr. TrisBase, 94 gr. Glisin (Vivantis PR0608), 50 ml %10 SDS karışımı 1lt' ye distile H₂O ile tamamlandı. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.

1xPBST: 1 lt 1xPBS solüsyonuna 1ml Tween20 (Merck 8.22184.1000) ilave edildi.

SDS Yükleme Tamponu: 1ml gliserol, 3ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000), 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH:6,7, 1-2 µg bromofenol mavisi eklendi. Filtreden geçirilerek kullanıldı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptoetanol (Sigma M3148) ilave edildi.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 gr APS (Sigma A3678) 1 ml distile suda çözöldü. Taze hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

Transfer Tamponu: 3,75g Glisin ve 7,25g TrisBase 1 lt distile suda çözölerek karışına 250 ml metanol eklendi.

Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8): 29g Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ve 0,8g Bisakrilamid (Merck 2610) 100 ml bidistile H₂O'da çözölerek 0,22 um' lik filtre kullanılarak filtre edildi.

3.11.1. Jelin Hazırlanması

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking	5ml' lik	10ml' lik
Su	15ml	11,55ml	10,5ml	7.05ml	Su	3ml	6ml
Resolving Buffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml	Stacking Buffer	1.25ml	2,5ml
Acr(29:08)	7,05ml	10,5ml	12ml	15ml	Acr(29:08)	0,625ml	1,25ml
%10SDS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	%10SDS	50µl	100µl
%10 APS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	%10 APS	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml		5 ml	10 ml

3.11.2. Örneklerin Jelde Yürütölmesi

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 150 µg alınarak üzerine eşit volumde β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dk bekletildi. Uygun pipet uçlarıyla hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 120 voltta, resolving jelde ise 150 voltta yürütöldü (Cihaz : Amersham 80-6171-96). Yürüme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.11.3. Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütöldükten sonra transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah veya negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri yerleştirildi. Üzerine transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı yerleştirildi. Bunun üzerine örneklerin yürütöldüğü jel cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak kondu. Jel üzerine saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) ve diğér sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletmeden transfer tamponuyla doldurulan ve buz içérisine konulmuş transfer cihazına yerleştirildi. Örnekler gece boyu 40 voltta transfer edildi.

3.11.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi

Transferin ardından blot PBST-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) solüsyonunda 2 saat bloklandı. Bunun ardından, PBST-BSA içinde hazırlanan primer antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile 2 saat işaretlendi, takiben, antikor uzaklaştırıldı ve blot PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, PBST-BSA içinde hazırlanmış uygun anti-mouse veya anti-rabbit sekonder antikorunun 1/2000 dilüsyonu ilave edildi ve işaretleme 1 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot PBST ile 30 dk yıkandı. ECL reaktifi (GE Health care RPN2209) ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra bu da uzaklaştırıldı ve kemilüminas'a duyarlı film karanlık odada blot'ın üzerine konarak 1-5 dk. bekletildi. Görüntüleme için film, film banyo cihazında (Kodak 8116428) banyo edildi.

Görüntülenerek fosforilasyon seviyesi belirlenen proteinlerin, bazal seviyelerinin belirlemesi amacıyla işaretleme yapılacak spesifik antikor uygulamasından önce fosforile formun belirlendiği membrana "strip off" işlemi uygulandı.

3.11.5. Strip Off İşlemi

Kullanılan Solüsyonlar:

Strip off Solüsyonu: 12.5 ml 0.5 M Tris PH.6.8, 20 mL %10'luk SDS, 67 ml steril distile su ve hazırlandıktan sonra 704 µl β-merkaptoetanol eklenecektir.

1X PBS, %0.1 Tween-20: Bölüm 3.11.' de açıklandığı gibi hazırlanmıştır.

Uygulama:

Hazırlanmış olan strip off solüsyonu 55°C'e ısıtıldı (Stuart-Heat stir SB162) ve solüsyona kabin içerisinde 704 µl β-merkaptoetanol eklendi. Aynı zamanda işlemin gerçekleştirileceği çalkalamalı inkübatör de aynı sıcaklığa getirildi. Ağzı kapalı plastik kaba konan membranın üzerine ısıtılmış strip off solüsyonu konuldu. Membran aynı dereceye ısıtılmış çalkalamalı inkübatörde 30 dk çalkalandı. Bunun ardından solüsyon uzaklaştırıldı ve blot PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Bu aşamadan sonra 3.11.4. bölümündeki işlemler tekrar edildi.

3.12. Site-Directed Mutagenesis Yöntemi

İnsan yabanıl tip IRS1 ekspresyon vektörü üzerinde oluşturmak istenilen Alanin (S616A, S636A, S666A, S736A) ve Glutamik asit (S616E, S636E, S666E, S736E) mutantları için <https://www.genomics.agilent.com> internet sitesi aracılığıyla ilgili bölgelere özgü mutagenез primer çiftleri dizayn edildi. Bu mutagenез primerlerinin dizileri aşağıdaki gibidir.

Alanin Mutantı Primerleri:

S616A İleri	5'-ggctacatgcccattggcccccagggtggcccca-3'	(33 mer; Tm:86)
S616A Geri	5'-tggggccaccctggggccatgggcatgtagcc-3'	(33 mer; Tm:86)
S636A İleri	5'-gactatatgcccattggccccaagagcgtatct-3'	(33 mer; Tm:73)
S636A Geri	5'-agatacgtcttggggccatgggcatatagtc-3'	(33 mer; Tm:73)
S666A İleri	5'-ggctacatgatgatggcccccagcgggtggctgc-3'	(33 mer; Tm:82)
S666A Geri	5'-gcagccaccgctggggccatcatcatgtagcc-3'	(33 mer; Tm:82)
S736A İleri	5'-gactacatgaacatggcaccagtgggggactcc-3'	(33mer; Tm:63)
S736A Geri	5'-ggaagtccccactggtgccatgttcatgtagtc-3'	(33mer; Tm:63)

Glutamik Asit Mutantı Primerleri:

S616E İleri	5'-ggctacatgcccattggagccagggtggcccca-3'	(33 mer; Tm:68)
S616E Geri	5'-tggggccaccctgggtccatgggcatgtagcc-3'	(33 mer; Tm:68)
S636E İleri	5'-gactatatgcccattggaaccaagagcgtatct-3'	(33 mer; Tm:59)
S636E Geri	5'-agatacgtcttgggtccatgggcatatagtc-3'	(33 mer; Tm:59)
S666E İleri	5'-ggctacatgatgatggaaccagcgggtggctgc-3'	(33 mer; Tm:64)
S666E Geri	5'-gcagccaccgctgggtccatcatcatgtagcc-3'	(33 mer; Tm:64)
S736E İleri	5'-gactacatgaacatggaaccagtgggggactcc-3'	(33mer; Tm:62)
S736E Geri	5'-ggagtccccactggttccatgttcatgtagtc -3'	(33mer; Tm:62)

Uygulama:

IRS1' in mutant formlarını oluşturmak amacıyla yukarıda belirtilen primer çiftleri ile Pfu DNA Polimeraz (Fermentas EP0501) enzimi kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Reaksiyon koşulları:

1x Reaksiyon Tamponu,
125'er ng konsantrasyonunda ileri ve geri primerler
1pmol dNTP
2,5 ünite PFU DNA Polimeraz
50 ng kalıp plazmit
Steril H₂O.

Reaksiyon 50 µl'de kuruldu. Reaksiyon koşulları; ön denatürasyon 95°C'de 30 sn, 16 döngü olmak üzere 95°C'de 30 sn, 55°C'de 1 dk ve 68°C'de 14 dk ve daha sonrasında 4°C'de ∞ olarak belirlendi.

Bu reaksiyon koşulu temel alınarak IRS1' in yukarıda belirtilen bölgelerine yönelik olarak tekli ve kombinasyonel mutanlarını içeren memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu.

3.13. Plazmitlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi

In vitro plazmit amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra reaksiyonda kalıp olarak kullanılan plazmit, önceden DH5 α 'dan izole edildiği için GATC dizilerinden G metile vaziyettedir. Bu metillenmiş dizilere spesifik kesim yapan Dpn-I enzimi (Roche 10 742 988 001) kullanılarak vektör parçalanmıştır. Mutant dizileri içeren vektörler Dpn-I dirençli olduğundan enzim kesimi sonucunda sağlam olarak kalacaklardır.

Dpn-I enzim kesimi Reaksiyon Koşulları:

1x Reaksiyon tamponu,
20 μ l SDM ürünü plazmit
1 μ l Dpn-I enzimi
Steril H₂O

Reaksiyon 50 μ l'de kurulmuş ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.14. Dpn-I Kesimi Ürünlerinden Mutant Plazmidlerin Seçimi

Dpn-I enzim kesimi yapılmış bu vektörler DH5 α 'ya transforme edilerek 50 mg/ml konsantrasyondaki Amphisilinli agar petrilere ekim yapıldı. Petriler geceboyu 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan koloniler seçildi ve her biri geceboyu amphisilinli LB sıvı besiyeri ortamında 37 °C'de çalkalamalı etüvde çoğaltılarak plazmid izolasyonları gerçekleştirildi. Beklenen mutasyonları tanımlamak ve doğrulamak için ilgili bölgelerin dizi analizini yapıldı.

3.15. IRS1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgelerine Yönelik PCR Reaksiyonu

Dpn-I kesimi sonrasında elde edilen bakterilerden izole edilen plazmidlerin beklenen mutasyonları taşıdığını tanımlamak ve doğrulamak amacıyla IRS1 geninin ilgili bölgelerini kapsayacak şekilde amplifikasyon primerleri dizayn edildi. Amplifikasyon primer dizileri aşağıdaki gibidir.

IRS1 İleri 5'-ggaggtggcagtgaggccgactgcc-3' (26 mer; Tm:75)

IRS1 Geri 5'-cctcagggccgtagtagcagtc-3' (22 mer; Tm:65)

Uygulama

IRS1 geni amplifikasyonu Qiagen Taq Polimeraz kiti ile aşağıda belirtilen reaksiyon içeriği ve koşullarında gerçekleştirildi.

Reaksiyon koşulları:

1X Reaksiyon tampon
1 μ M konsantrasyonda ileri ve geri primerler
0,2 mM dNTP karışımı
1,25 ünite Taq polimeraz
50 ng DNA
Steril H₂O.

Reaksiyon 50 µl’de kuruldu. Reaksiyon koşulları; ön denatürasyon 94°C’de 5 dk , 35 döngü olmak üzere 94°C’de 30 sn, 56°C’de 30 sn ve 72°C’de 45 sn , son uzama ise 72 °C’ de 7 dk ve daha sonrasında 4°C’de ∞ olarak belirlendi.

3.16. Agaroze Jel Elektroföze ve Görüntüleme Sistemi

3.16.1. % 1.8’lik Agaroze Jelin Hazırlanması

1.8 gram agaroz (Sigma) tartılarak 100 ml 1XTBE tamponu içinde (Tris-Borat-EDTA) (Sigma) çözüldü. 50-55 °C’ye gelene kadar soğutuldu. 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi. Elektroföze kuvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektroföze kuvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel, elektroföze tankına yerleştirildi.

3.16.2. İşlemler

%1.8’lik agaroz jel, içerisinde 1XTBE tamponu bulunan elektroföze tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50bç’lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroföze tankına bağlı güç kaynağı ile 120 voltta 30 dakika yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ışık veren transilluminatör Syngene (Ingenius) yardımıyla incelendi.

3.17. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

PCR veya enzim kesimi sonrası tüp içerisindeki ürün dışı reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı Invitrogen PCR Purification Kit (250’lik K3100-01) kullanılarak uygulandı.

Uygulama

1. PCR ürününün üzerine 100 µl B3 tamponu eklendi.
2. Pipet ile biraz karıştırıldıktan sonra filtreli tüplere aktarıldı.
3. 10 000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi.
4. Filtreli tüpün altı boşaltılmadan üzerine 325 µl Yıkama Tamponu eklendi.
5. 10 000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Filtreli tüpün altında biriken dökelti boşaltıldı.
7. 14 000 rpm de 2 dk. kuru santrifüj yapıldı.
8. Sonra filtreli tüp 1,5 ml’ lik ependorf tüplerine alındı.
9. Üzerine 30 µl elüsyon tamponu eklendi.
10. Oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
11. 14 000 rpm de 2 dk. santrifüj edildi ve filtreli tüp atıldı.

3.18. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonları PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka Thermal Cycler kullanılarak aşağıdaki programa göre yapıldı.

3.18.1. Dizileme Reaksiyonu

5X Tampon, Big Dye Terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit-Applied Biosystems), geri primer (3,2 pmol), kalıp DNA ve H₂O konularak final hacmi 10µl olacak şekilde hazırlandı.

3.18.2. Dizileme PCR Programı

Ön denatürasyon 96°C’de 1 dk; denatürasyon, 96°C’de 10 saniye; birleşme, 50°C’de 5 saniye, uzama, 60°C’de 4 dakika ve 25 döngü olacak şekilde ayarlandı. Pürifikasyon işlemine kadar tüpler +4°C’de bekletildi.

3.19. Dizi Analizi Yapılacak Amplikonların Temizlenmesi

Dizileme reaksiyonu sonrası tüp içerisindeki ürün dışı reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı etanol- Sodyum Asetat çöktürmesi yöntemiyle gerçekleştirildi.

Uygulama

1. Hazırlanan yeni 1.5 ml’lik ependorf tüplere 2µl 3.2M sodyum asetat (pH:4.6) konuldu.
2. Üzerine 30µl %99 soğuk etanol ilave edildi.
3. Bu karışımın üzerine amplifikasyon ürününün tamamı eklendi ve vortekste karıştırıldı.
4. 20 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. Süre sonunda oda sıcaklığında 14000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Pipetle dökelti alınarak atıldı.
6. Çökelti üzerine 250µl %70 etanol ilave edildi.
7. Oda sıcaklığında 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Tekrar dökelti pipetle alınarak atıldı.
8. Tüplerin 10-15 dakika karanlıkta kuruması beklendi.
9. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 25µl formamid ilave edildi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı
10. Formamid eklenmiş olan dizileme reaksiyonu ürünleri tüp (Applied Biosystems) içerisine alındı.
11. Tüpün ağzı septa (Applied Biosystems) ile kapatıldıktan sonra 95 °C’de 5 dk. denatüre edildi.
12. Buzda 2 dk. bekletildikten sonra ABI Prism dizi analizi cihazına örnekler yüklendi. Daha sonra kapiller (Applied Biosystems), POP-6 polimer (Applied Biosystems), EDTA içeren Buffer (10x) (Applied Biosystems) ile dizi analizi cihazında (ABI 310 Prism) 36 dk. yürütüldü.
13. Örnekler yürütüldükten sonra, ABI sequence analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi.
14. Sonuçlar NCBI aracılığıyla IRS1 cDNA dizisi referans alınarak diziler okundu ve mutasyonlar doğrulandı.

3.20. İmmünfloresan Sitokimya Yöntemi

Hücre kültürasyonu için 96 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Hücre sayımı için hücreler tripsinize edilerek homojenize edildi ve Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı belirlendi (3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri). Kontrol, yabancı tip ve mutant IRS1 eksprese eden 293T hücreleri, %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li %95 nemli kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri eklenerek hücreler 16 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile muamele edildi. 48. saat sonunda hücrelerim immünohistokimya boyaması gerçekleştirildi .

Kullanılan Solüsyonlar:

Bloklama Solüsyonu:

Bloklama için BSA, %5 oranında PBS içinde sulandırılarak kullanıldı.

Uygulama

1. 96 kuyulu kültür kaplarında eşit sayıda büyütülen hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı
2. Üzerine 100 µl soğuk metanol (Merck) eklenerek -20°C’ de 20 dakika fiksasyon yapıldı.
3. Süre sonunda metanol çekilerek uzaklaştırıldı ve 3 kere 5’ er dakika PBS ile yıkandı.
4. Bloklama için hücrelerin üzerine 50’ şer µl bloklama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat tutuldu.
5. Süre sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve 50’ şer µl primer antikor solüsyonu eklenerek gece boyu 4°C’ de tutuldu. Primer antikor solüsyonu, anti-Ki67 (BD, 556003), antikor sulandırma solüsyonu (Abcam) içerisinde 1:100 oranında sulandırılması ile hazırlandı.
6. Ertesi gün primer antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve 3 kere 5’ er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra 50’ şer µl sekonder antikor solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat tutuldu. Sekonder antikor solüsyonu, anti-mouse Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch) antikorunun 1:200 oranında PBS içinde sulandırılması ile hazırlandı.
7. Süre sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kere 5’ er dakika PBS ile yıkandı.
8. Hücreler üzerine çekirdek boyası olan 50 µl Hoechst boyası (Sigma H6024) damlatılarak floresan mikroskopunda görüntüler alındı ve incelendi.
9. Örnekler 4°C’de alüminyum folyoya sarılarak saklandı.

3.21. MTT Canlılık/Proliferasyon Testi

Kullanılan Solüsyonlar:

MTT (5 mg/ml): (Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231), belirtilen konsantrasyonda taze olarak PBS içerisinde çözündürüldü ve steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi.

3.21.1 Hücrelerin Ekimi ve FBS İle Muamelesi

Kontrol, yabanıl tip ve mutant IRS1 eksprese eden hücreler, hücre sayımı için tripsinize edildi ve homojenize edildi. Her hücre grubu, Thoma lamında sayılarak 3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 6 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li %95 nemli kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri eklenerek 16 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda FBS(-) grubuna aşağıda belirtilen MTT protokolü uygulanırken, diğer hücre grubunun üzerine her kuyuda son hacim %10 olacak şekilde FBS' li DMEM eklendi ve 48. saatte aynı şekilde MTT protolü uygulanarak spektrofotometrik ölçümleri ve istatistiksel analizleri gerçekleştirildi.

3.21.2. Hücrelerin MTT ile Muamelesi, Ölçümü ve İstatistiksel Analizi

96 kuyulu kültür kabındaki hücrelere, 200 µl besiyeri varlığında 40 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve 4 saat 37°C' de tutuldu. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO (Sigma) eklendi, 5-10 dakika çalkalandıktan sonra test 540 nm, referans 690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen verilerin analizleri Microsoft Excel ve SPSS programları kullanılarak değerlendirildi. Deney sonuçlarının p degerleri One way ANOVA (Dunnet t-test) ile hesaplandı. Sonuçlar normalize edilerek ve ± standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

3.22. Glukoz Alınım Testi

Bu test için glukoz alınımlar test kiti (Cayman-Cell Based Glucose Uptake Assay Kit) kullanıldı.

Uygulama

1. Kontrol, yabanıl tip ve mutant IRS1 eksprese eden hücreler, hücre sayımı için tripsinize edildi ve homojenize edildi. Her hücre grubu, Thoma lamında sayılarak 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂' li %95 nemli kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi.
2. Ertesi gün hücrelerdeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 100 ul glukoz bulunmayan besiyeri ile yıkandı.

3. Bir gruba 1/100 oranında glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımından 100µl, diğer gruba ise bu karışıma ilave olarak son konsatrasyonu 100 ng/µl insülin de eklendi. Bu aşama ve sonraki aşamalar mümkün olduğunca karanlık ortamda gerçekleştirildi.
4. Hücreler 30 dk. 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂' li %95 nemli kültür ortamında inkübe edildi.
5. Süre sonunda glukoz analogu içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl cell based buffer ile 2 kez yıkandı.
6. Yıkama sonrasında hücrelerin üzerine 100 µl cell based buffer eklenerek floresan mikroskobunda görüntüler alındı ve incelendi. (eksitasyon/emisyon=485/535 nm)

3.22.1 Glukoz Alınım Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Floresan mikroskotan elde edilen görüntüler image J programı aracılığıyla analiz edildi. Program kapsamında aşağıda belirtilen formül kullanılarak arka plan ışınması, floresan ışınma ile normalize edildi ve doğrulanmış toplam hücre floresan yansıması (CTCF) değeri hesaplandı.

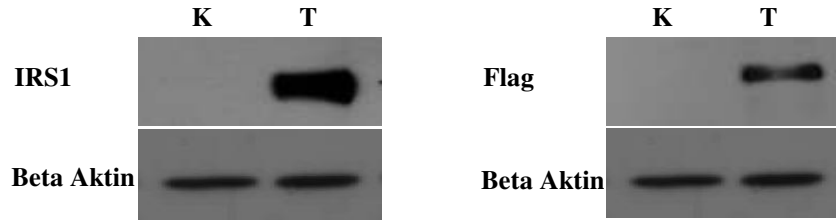
CTCF = İntegre Edilmiş Yoğunluk – (Seçilen Hücrenin Alanı X Ortalama Arka Plan Floresan Yansıması)

BULGULAR

İnsülin sinyalinin iletimi, dağılımı ve regülasyonunda önemli rol oynayan IRS1 proteininin, hücrede hiperinsülinemi, hiperglisemi ya da artan yağ asitleri gibi stres yaratan faktörler tarafından inhibe edilerek, sinyal yolağını baskılayacağını ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayacağını ön gördük. Stres durumunda IRS1 proteininin serin fosforilasyonundaki artışı da göz önünde bulundurarak stresle aktive olan proteinlerden bir tanesi olan p38 MAPK'ın IRS1 proteinini serin aminoasitlerinden fosforile edebileceğini düşündük. Bu bağlamda, insan IRS1 proteininin aminoasit dizisini incelediğimizde PI3K' ın bağlanma bölgesi olan dört YXXM motifinin devamında MAPK kinazların fosforilasyon motifi olan S/TP konsensus dizisinin olduğunu saptadık. Bu diziler insanda GYMPMS₆₁₆P, DYMPMS₆₃₆P, GYMMMS₆₆₆P, DYMNMS₇₃₆P ve hepsi muhtemel p38 MAPK fosforilasyon motifidir. Bu dizilerin bir proteinde bulunması mutlaka p38 MAPK tarafından fosforile edileceği anlamına gelmez. Hipotezin doğru olup olmadığını test etmek için bir dizi biyokimyasal ve genetik çalışmalar yaptık. İlk olarak insan IRS1 geni üzerindeki fosforilasyonu ve yolak üzerindeki etkilerini gösterdik. Ardından bu mutasyonların IRS1'in fonksiyonuna olan etkilerini test ettik.

4.1. İnsan IRS1 Ekspresyon Vektörünün Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

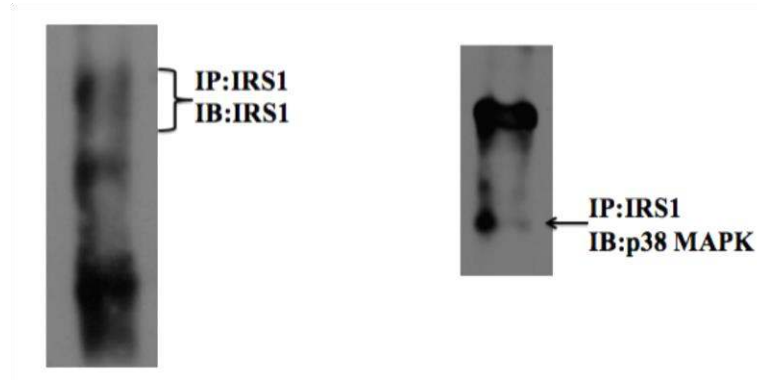
Temin ettiğimiz pcDNA3 Flag-tagged insan IRS1 plazmitinden memeli hücrelerinde protein ekspresyonunun gösterilebilmesi için bu plasmid, E.coli'nin DH5α suşu kullanılarak konvansiyonel plasmid izolasyonu ile çoğaltılıp saflaştırıldı. Elde edilen plasmid 293T hücrelerine transfekte edildi. IRS1'in ektopik ekspresyonunun gösterilmesinde transfeksiyon yapılmamış 293T hücre lizatı "kontrol hücre grubu" olarak kullanıldı. Ayrıca aynı membrana "strip off" işlemi uygulanarak memeli ekspresyon vektöründe bulunan "flag" seçici bölgesine yönelik antikor aracılığıyla da ektopik IRS1 ekspresyonu doğrulandı. Kullandığımız pcDNA3 flag-tagged insan IRS1 memeli ekspresyon vektörünün 293T hücrelerinde başarılı bir şekilde IRS1 ekspresyonu yaptığı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 293T hücrelerinde insan IRS1 ektopik ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi (K: Transfeksiyon yapılmamış 293T protein lizatı; T: Plasmid transfeksiyonu yapılmış 293T protein lizatı) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler ve kontrol hücre grubu TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edils. 100 µg hücre lizatı %7 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle IRS1 antikoru ile strip off işleminde sonra Flag antikoru ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi.

4.2. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan 293T Hücrelerinde IRS1 ve p38 MAPK' ın Birbirine Bağlanmasının İmmünpresipitasyon ile Gösterilmesi

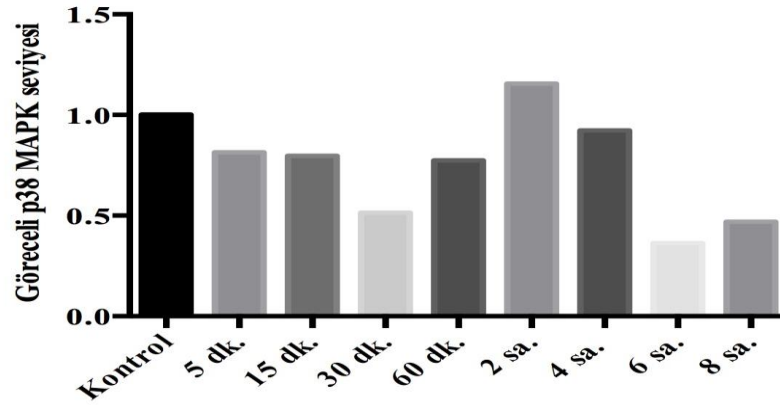
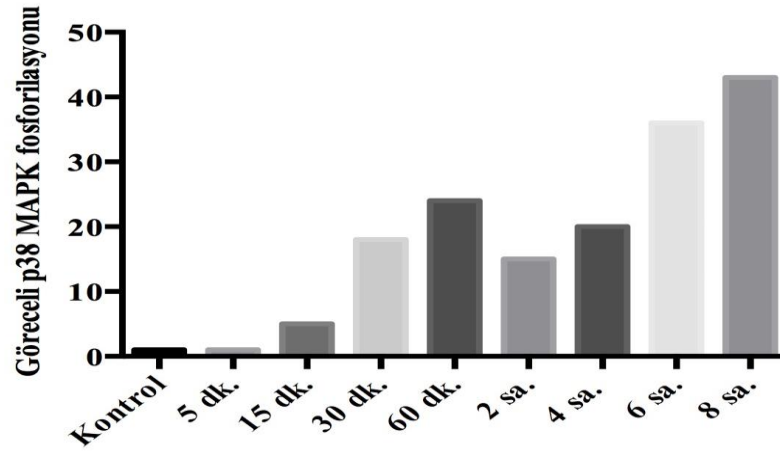
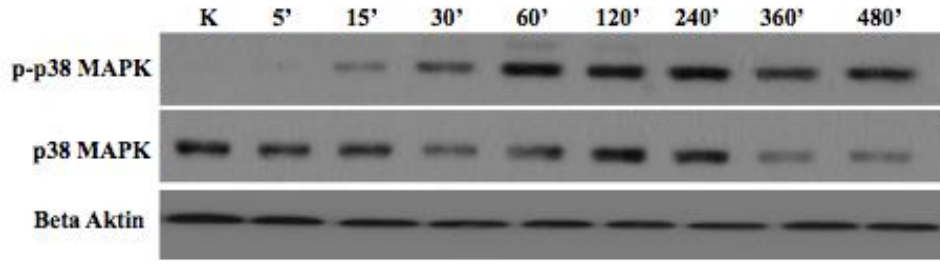
Proteinlerin fosforile olabilmeleri için birbirleri arasında direkt bir interaksiyonun olması gerekmektedir. Bu nedenle birbirine bağlanan iki protein immünpresipitasyon ve proteinlere spesifik antikolar kullanılarak western blot aracılığıyla gösterilebilmektedir. Bu nedenle ektopik IRS1 ekspresyonu gösteren 293T hücrelerinde IRS1 antikoru aracılığıyla immünpresipitasyon gerçekleştirildi. Örnek yürütülüp, transfer edildikten sonra IRS1 ve p38 MAPK antikolarıyla işaretlendi. Proteinlerin pozisyonları “input kontrol” aracılığıyla doğrulandı. IRS1-p38 MAPK bağlantısı şekil 4.2. de görülmektedir.



Şekil 4.2. Ekzojen insan IRS1' i eksprese eden 293T hücrelerinde IRS1-p38 MAPK bağlantısının gösterilmesi (IP: immünpresipitasyon, IB:western blot)

4.3. 293T Hücreslerinde Anisomisin Muamelesi ile Zamana Bağlı p38 MAPK Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi

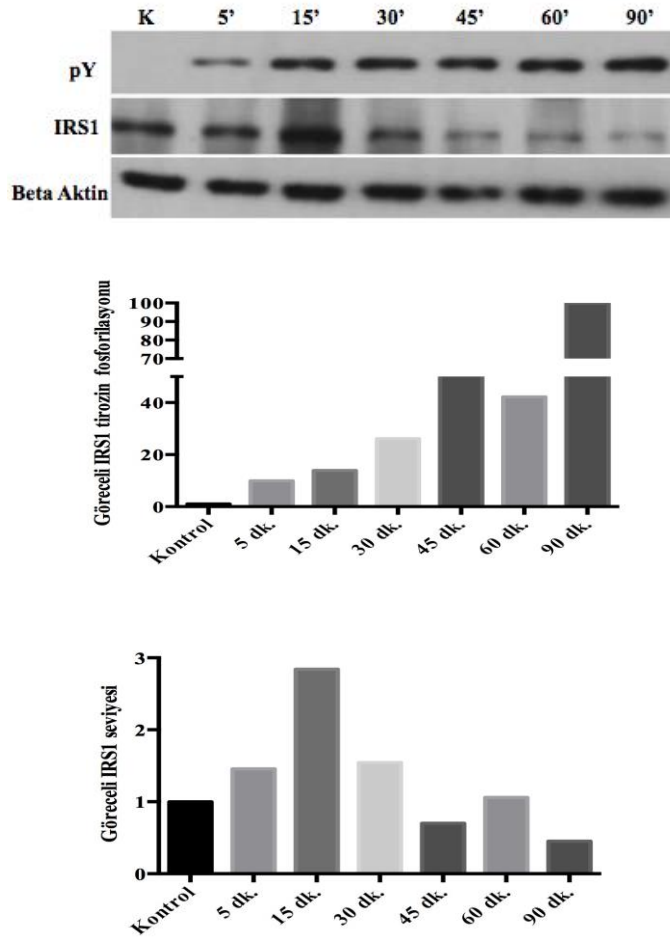
Anisomisin stresle aktive olan proteinlerden JNK ve p38 MAPK'ın aktivatörüdür. p38 MAPK'ın 293T hücrelerinde aktivatörü olan anisomisin tarafından maksimum aktive (fosforile) edildiği sürenin belirlenmesi uygun deney düzeneğinin doğru kurgulanması açısından önemliydi. Bu nedenle zamana bağlı anisomisin aracılı p38 MAPK aktivasyonunu belirlemek için %70-80 konfluent olan 293T hücreleri, hücre sinyalizasyonunu minimum düzeye çekmek amacıyla serum bulunmayan besiyeri ortamında gece boyu (yaklaşık 16 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelere literatür ile de desteklenmiş konsantrasyon olan 10 µg/ml oranında anisomisin muamelesinde bulunuldu ve 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 ve 480 dakika anisomisin ile inkübe edildi. En yüksek p38 MAPK fosforilasyon seviyesinin en erken 15. dakikada başladığı gözlemlendi (Şekil 4.3.). Kontrole göre p38 fosforilasyon seviyesinin kaç kat olduğunu hesaplamak için p-p38 işaretlemesinden elde edilen sinyal p38 işaretlemesinden elde edilen sinyale bölünerek p38 fosforilasyon seviyesi belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 293T hücrelerinde zamana bağlı anisomisin varlığında p38 MAPK' ın fosforilasyon ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi. 293T hücreleri gece boyu serumsuz ortamda bekletildi. Ertesi gün hücreler 10 µg/ml anisomisin ile muamele edilip belirtilen sürelerde inkübe edildi. Hücreler TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatu %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle p-p38 MAPK antikoruna ile strip off işleminde sonra p38 MAPK antikoruna ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.

4.4. 293T Hücrelerinde İnsülin Muamelesi ile Zamana Bağlı IRS1 Tirozin Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi

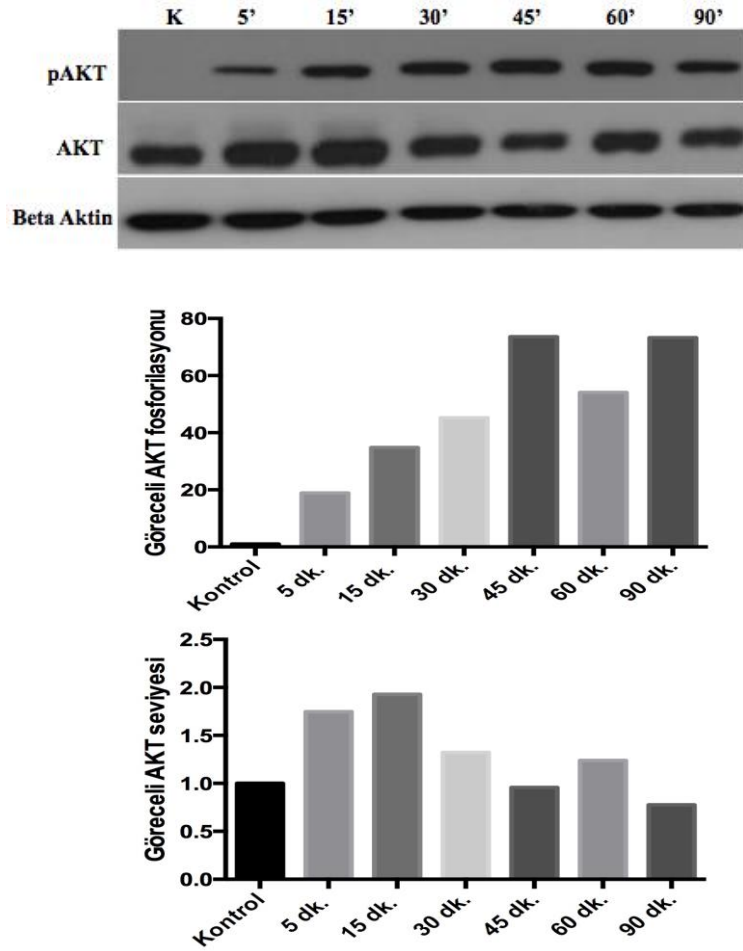
İnsülin sinyal yolağı çok çabuk sinyal başlatan bir yolaktır ve IRS1 mutantlarımızın IRS1'in tirozin fosforilasyonuna olan etkisinin ne olduğunu saptamadan önce insülin-aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonunun zamana bağlı değişiminin saptanması gerekmektedir. Bu nedenle 293T hücreleri bölüm 4.3 de belirtildiği şekilde serumsuz besiyerinde gece boyu inkübe edildikten sonra 100 ng/ml konsantrasyonda insülin ile 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 dakika muamele edildi. Membran öncelikle fosfotirozin antikoru ile işaretlendi. Aynı membran “strip off” işlemi uygulandıktan sonra IRS1 antikoru ile işaretlendi. İnsülin-aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonunun en erken 5.ci dakikada gözlemlendiği ve bunun 90 dakika boyunca artarak devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.4.)



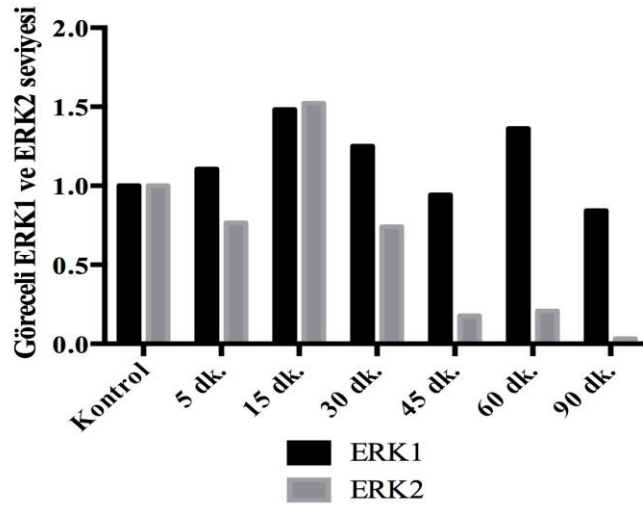
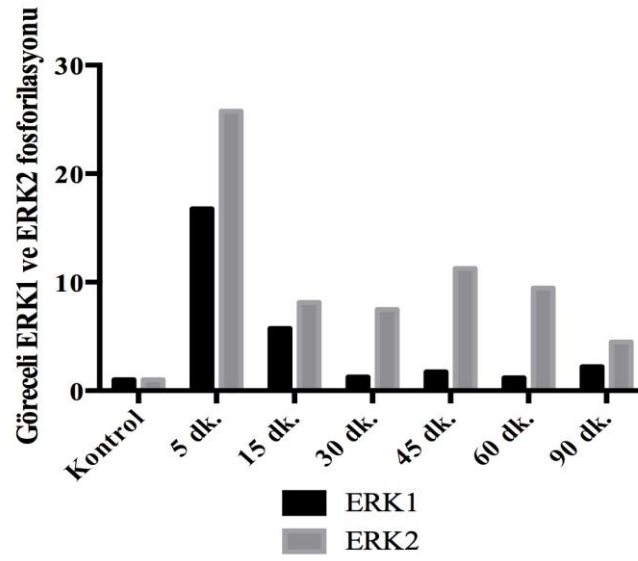
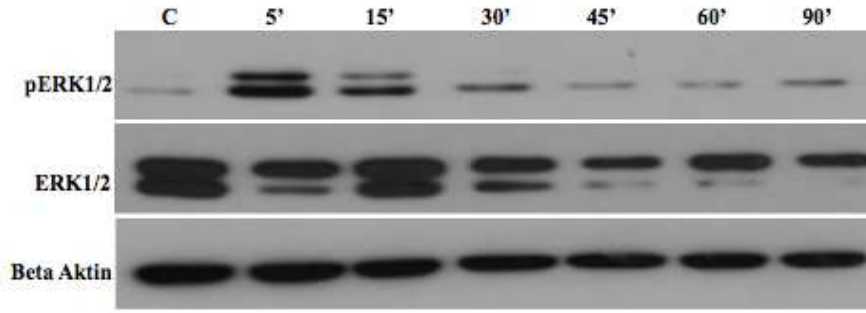
Şekil 4.4. 293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında IRS1 fosfotirozin ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi. (K: Kontrol; pY: Fosfotirozin; ('): dakika) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra belirtilen sürelerde 100 ng/ml insülin ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizati %7 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY antikoru ile strip off işleminde sonra IRS1 antikoru ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.

4.5. 293T Hücrelerinde İnsülin Muamelesi ile Zamana Bağlı ERK ve AKT Proteinlerinin Fosforilasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

İnsülin sinyalinde insülin reseptörü aktivasyonundan sonra ilk basamak olan IRS1 proteininin optimum aktivasyon süresini belirledikten sonra IRS1'in hedefleri olan AKT ve ERK proteinlerinin de zamana bağlı fosforilasyon düzeylerinin belirlenmesi önemliydi. Bu nedenle 293T hücreleri bölüm 4.3 de belirtildiği şekilde serumsuz besiyerinde gece boyu inkübe edildikten sonra 100 ng/ml konsantrasyonda insülin ile 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 dakika süreyle muamele edildi. Membran öncelikle proteinlerin fosforile formlarına yönelik antikorlarla, strip off işleminden sonra ise proteinlerin tamamını tanıyan antikorlarla işaretlendi. Sonuçlarımıza göre insülin-aracılı ERK1/2 fosforilasyonunun en yüksek seviyeye 5.ci dakikada ulaştığı saptanırken, AKT aktivasyonunun 5.ci dakikadan başlayarak 90.cı dakika'ya kadar artarak devam ettiği saptanmıştır. (Şekil 4.5- 4.6)



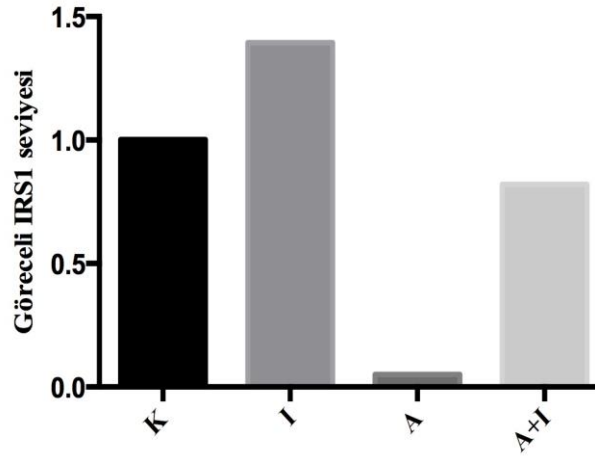
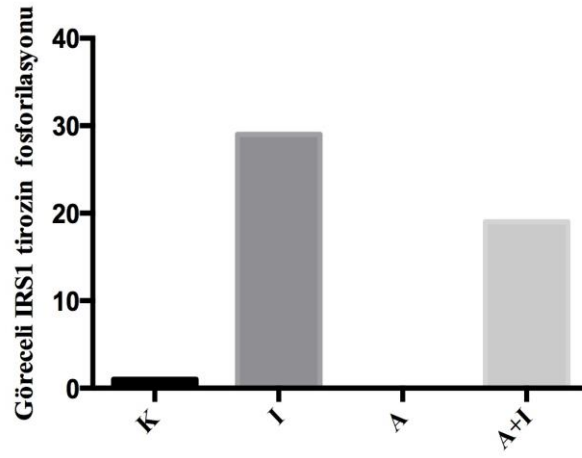
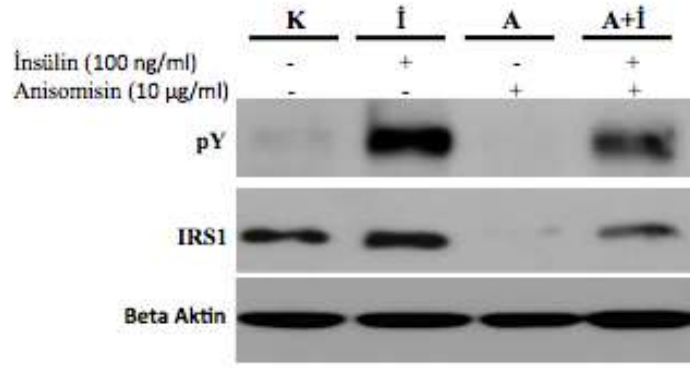
Şekil 4.5. 293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon düzeyinin belirlenmesi. (K: Kontrol) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra belirtilen sürelerde 100 ng/ml insülin ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pAKT antikorı ile strip off işleminden sonra AKT antikorı ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikorı ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.



Şekil 4.6. 293T hücrelerinde zamana bağlı insülin varlığında ERK1/2' nin fosforilasyon ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi. (K: Kontrol) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra belirtilen sürelerde 100 ng/ml insülin ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pERK antikoruna ile strip off işleminde sonra ERK antikoruna ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.

4.6. Anisomisin (p38 MAPK Aktivatörü)' nün İnsülin Aracılı IRS1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

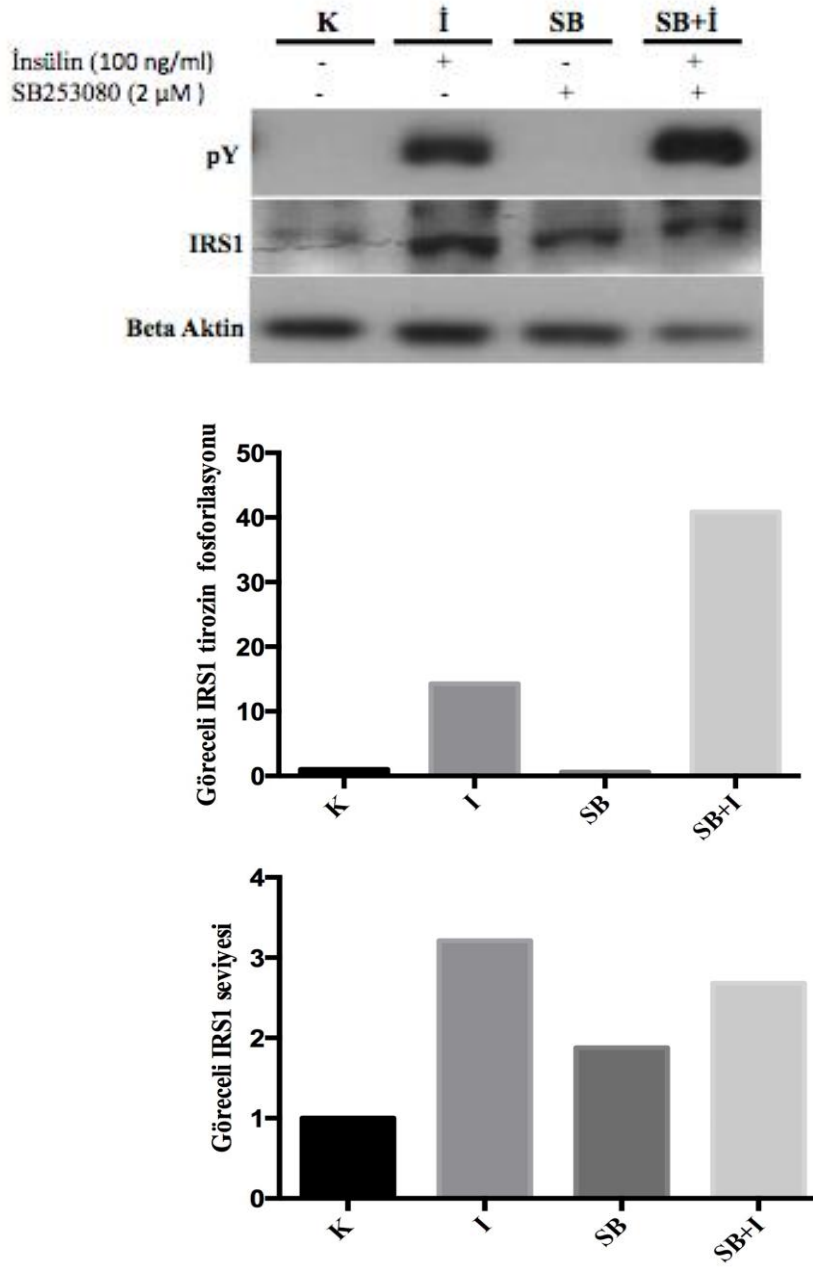
Çalışmamızda p38 MAPK'ın insülin sinyalinde IRS1'i serin bölgelerinden fosforile ederek tirozin fosforilasyonunu negatif etkileyeceğini ön görmüştük. Bu hipotezimizi doğrulayabilmek için %70-80 konfluent olan 293T hücreleri gece boyu serumsuz besiyeri ortamında bekletildikten sonra birinci grup 5 dakika süre ile 100 ng/ml konstrasyonda insülin, ikinci grup 1 saat süre ile 10 µg/ml konstrasyonda anisomisin, üçüncü grup ise belirtilen konsantrasyonlarda önce 1 saat anisomisin sonra 5 dakika insülin ile inkübe edildi ve western blot ile örneklerin normal IRS1 ve tirozin fosforile IRS1 seviyeleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7' de görüldüğü gibi anisomisin ile muamele edilen hücrelerde IRS1 adeta yok olmuştur, insulin ile muamele edilen hücrelerde ise IRS1'in anisomisin'den kısmen korunduğu anlaşılmaktadır. Yani, insulin yokluğunda stress ile aktiveşebilen p38 muhtemelen güçlü IRS1 Serin/Treonin fosforilasyonu yaparak IRS1'in parçalanmasına sebep olmaktadır. Bu mantıkla doğru orantılı olarak da p38 MAPK aktivasyonu insulin-aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonunu yaklaşık % 40 oranında baskılamaktadır. (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. p38 MAPK' ın IRS1 tirozin fosforilasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi (K: Kontrol; İ:İnsülin, A: Anisomisin; A+İ: Anisomisin ve insülin ile muamele edilmiş hücreler) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra 100 ng/ml insülin (5 dk.) ve /veya 10 µg/ml anisomisin (1 saat) ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY antikorı ile strip off işleminde sonra IRS1 antikorı ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikorı ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.

4.7. SB203580 (p38 MAPK inhibitörü)' nün İnsulin Aracılı IRS1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Aktive olmuş p38 MAPK'ın insülin aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonuna olan negatif etkisini gösterdikten sonra, spesifik p38 MAPK inhibitörü olan SB203580 bileşiğinin insülin aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonuna nasıl etki edeceğini belirlemek istedik. Bu nedenle 293T hücrelerine bölüm 4.6' daki işlemler uygulandıktan sonra birinci grup literatürle desteklenen optimum SB253080 konsantrasyonu olan 2 μ M ile 1 saat, ikinci grup 100 ng/ml konsantrasyonda insülin ile 5 dakika ve üçüncü grup ise önce 1 saat SB253080 sonrasında 5 dakika insülin ile muamele edildi ve western blot ile örneklerin toplam IRS1 ve tirozinfosforile IRS1 seviyeleri belirlendi. Beklendiği gibi, elde edilen sonuçlara göre p38 MAPK inhibitörü insülin aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonunu pozitif olarak etkilemektedir. Ayrıca kontrole oranla regüler IRS1 ekspresyonunu da arttırmaktadır. (Şekil 4.8)



Şekil 4.8. SB253080' nin IRS1 tirozin fosforilasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi. IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra 100 ng/µl insülin (5 dk.) ve /veya 2 µM SB253080 (1 saat) ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatu %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY antikoruna ile strip off işlemiyle sonra IRS1 antikoruna ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi

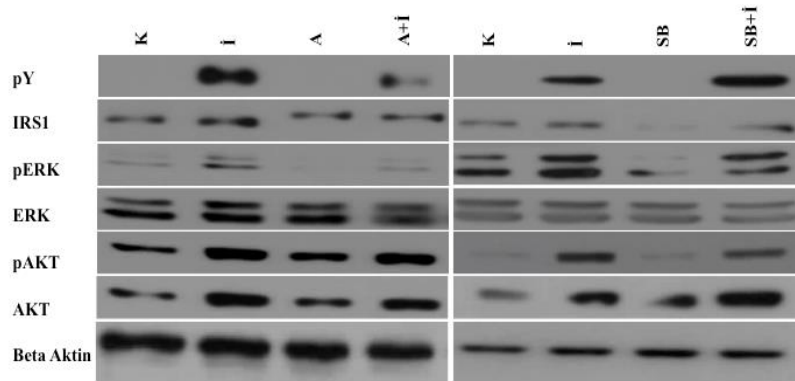
4.8. Anisomisin ve SB203580' nin İnsülin Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

p38 MAPK inhibitörü (SB253080) ve aktivatörünün (Anisomisin) insülin aracılı IRS1 tirozin fosforilasyonu üzerindeki etkisini belirledikten sonra bunların tirozin fosforile IRS1'in hedef proteinleri olan AKT ve ERK üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması p38 MAPK'ın insülin sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin net olarak ortaya koyulabilmesi açısından önemliydi. Bu nedenle 293T hücreleri önceki bölümlerde belirtilen konsantrasyon ve sürelerde anisomisin, SB203580, insülin, anisomisin-insülin ve SB253080+insülin ile inkübe edilerek, hücrelerdeki fosfotirozin, pAKT, pERK, AKT, IRS1 ve ERK seviyeleri karşılaştırıldı. Normal protein ekspresyonlarının belirlenmesi için işaretlemeler aynı membran üzerinde "strip off" işleminden sonra gerçekleştirildi (Şekil 4.9)

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, anisomisin önceki verilerimizi doğrular nitelikte IRS1 tirozin fosforilasyonunu insülinle muamele edilmiş hücre grubuna göre belirgin bir şekilde azaltmaktadır. Hücreler SB253080 ile muamele edildiğinde ise insülin grubuna göre IRS1 tirozin fosforilasyonunda artış görülmektedir. Anisomisin ve SB253080 grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında SB253080'nin IRS1'in aktivasyonu üzerinde pozitif rol oynadığı açıkça görülmektedir.

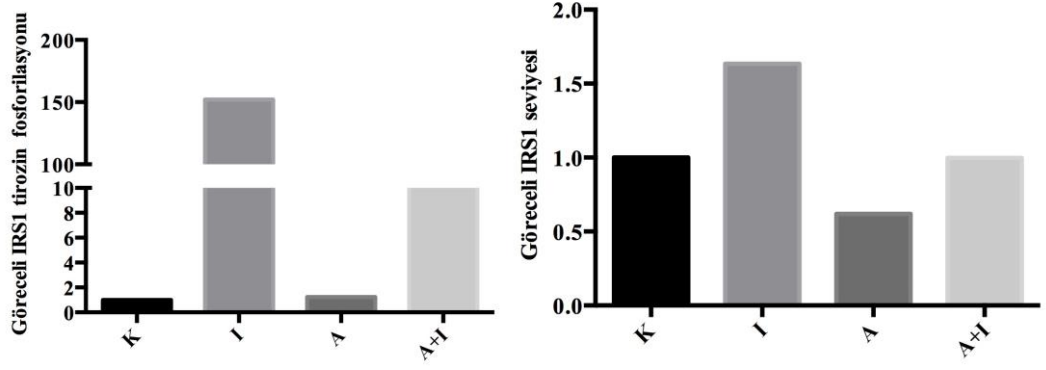
Anisomisin, ERK aktivasyonunu insülin muamele gruba göre etkin bir şekilde inhibe ederken, SB253080 muamelesinde insülin grubuna göre anlamlı bir değişim görülmemiştir.

AKT aktivasyonuna bakıldığında ise anisomisin ve SB253080' nin insülin muamele gruplarına göre AKT aktivasyonu üzerinde negatif rol oynadığı görülmektedir.

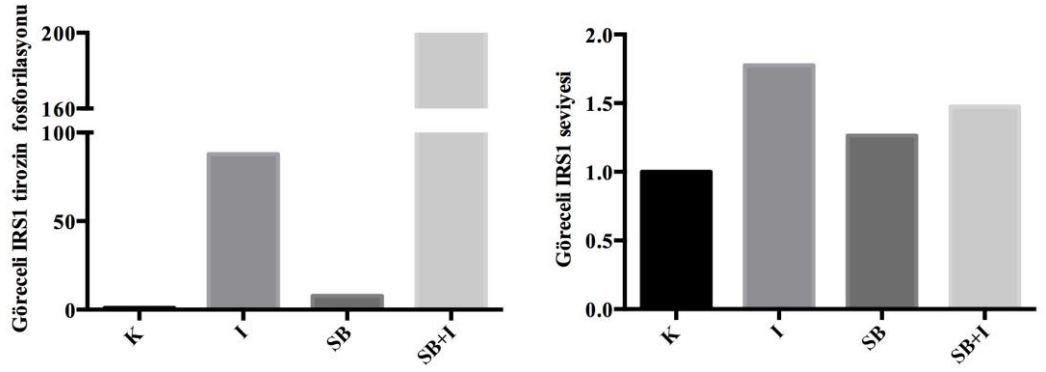


Şekil 4.9. SB253080 ve anisomisinin IRS1' in hedef proteinleri üzerine etkisinin western blot analizi ile belirlenmesi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080) IRS1 memeli ekspresyon vektörü transfekte edilen hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra 100 ng/ml insülin (5 dk.) ve /veya 10 µg/ml anisomisin, 2 µM SB253080 (1 saat) ile inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizati %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pAKT, pERK, pY antikorları ile strip off işleminde sonra AKT, ERK, IRS1 antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikorları ile işaretlendi. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrar edildi.

a.

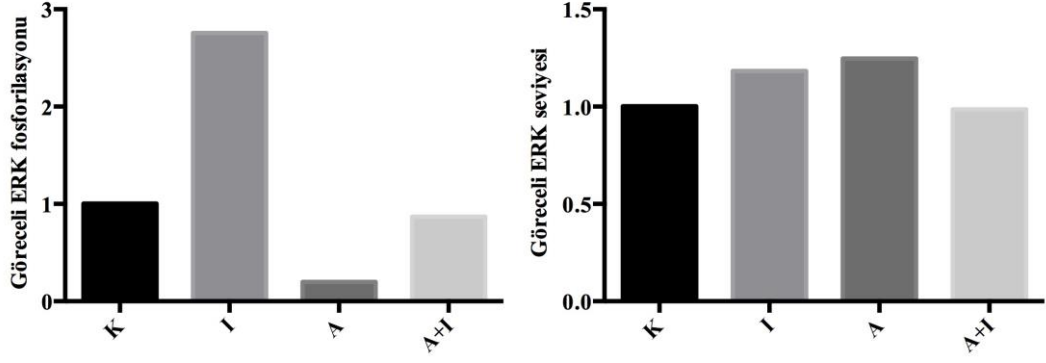


b.

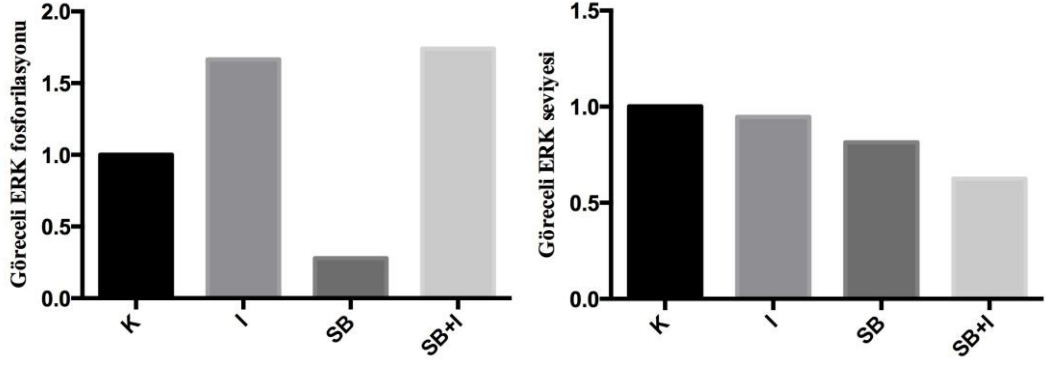


Şekil 4.10. a. Anisomisin ve b. SB253080' nin IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)

a.

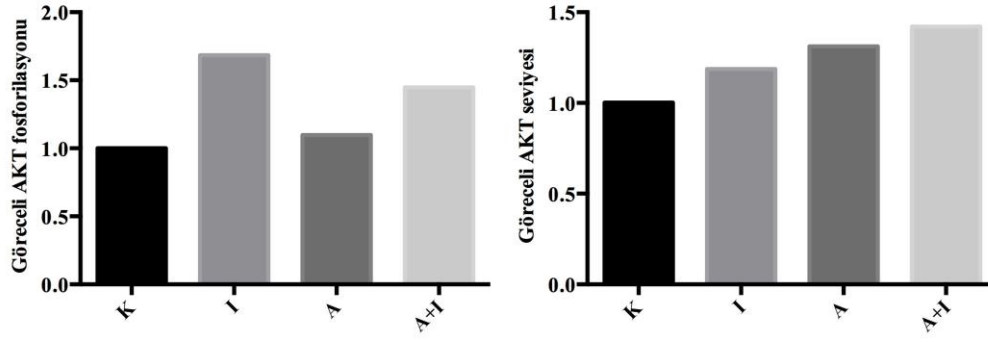


b.

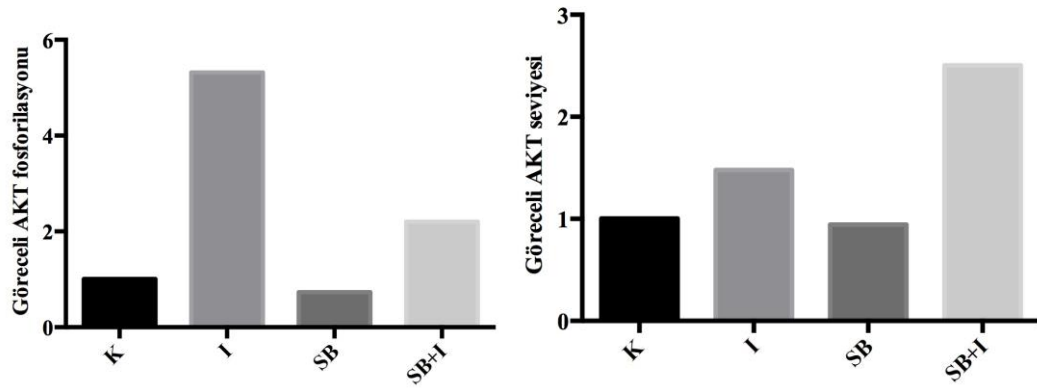


Şekil 4.11. a. Anisomisin ve b. SB253080' nin ERK fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)

a.



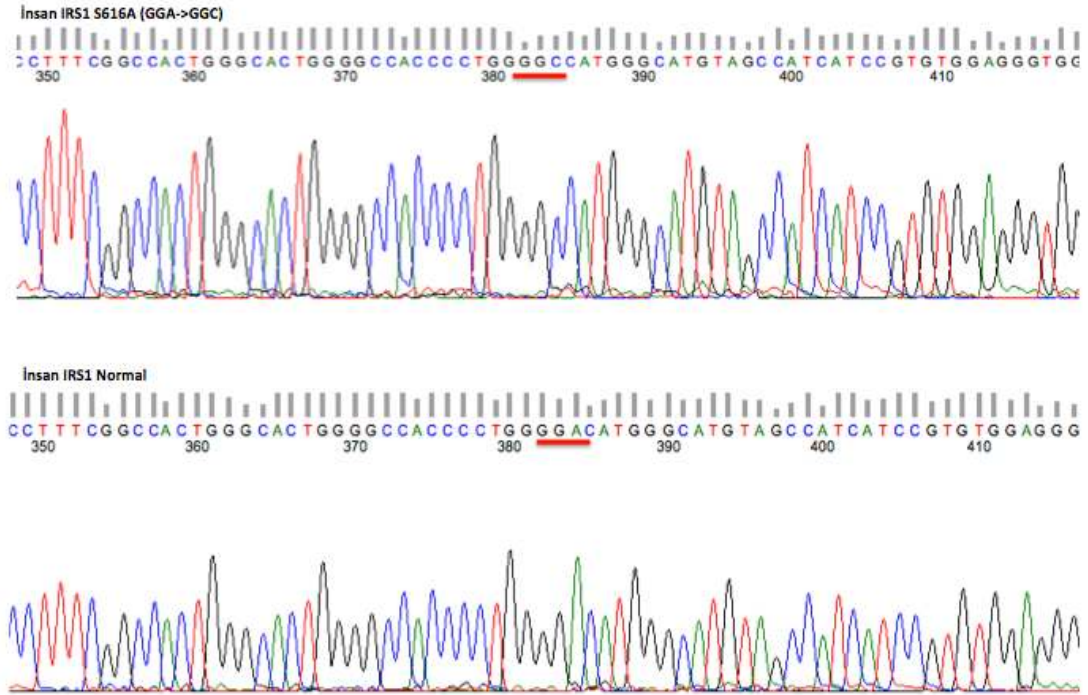
b.



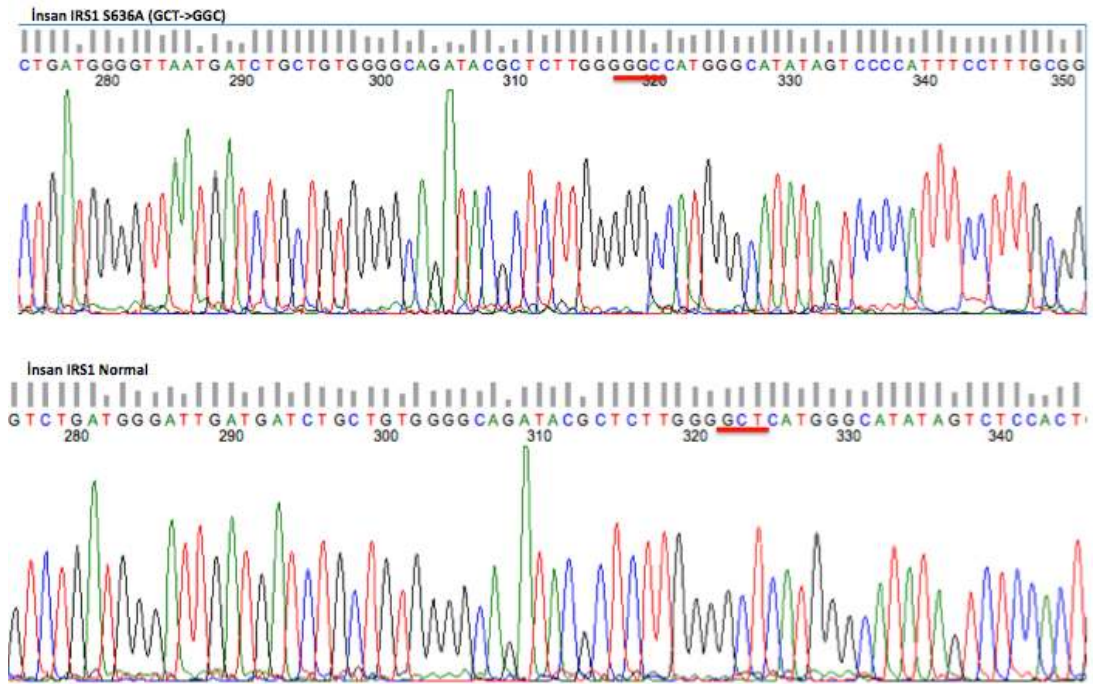
Şekil 4.12. a. Anisomisin ve b. SB253080' nin AKT fosforilasyonuna etkisi (K:Kontrol, İ:İnsülin, A:Anisomisin; SB:SB253080)

4.9. İnsan IRS1 Proteininin Site-Directed Mutagenesis (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Yapılması

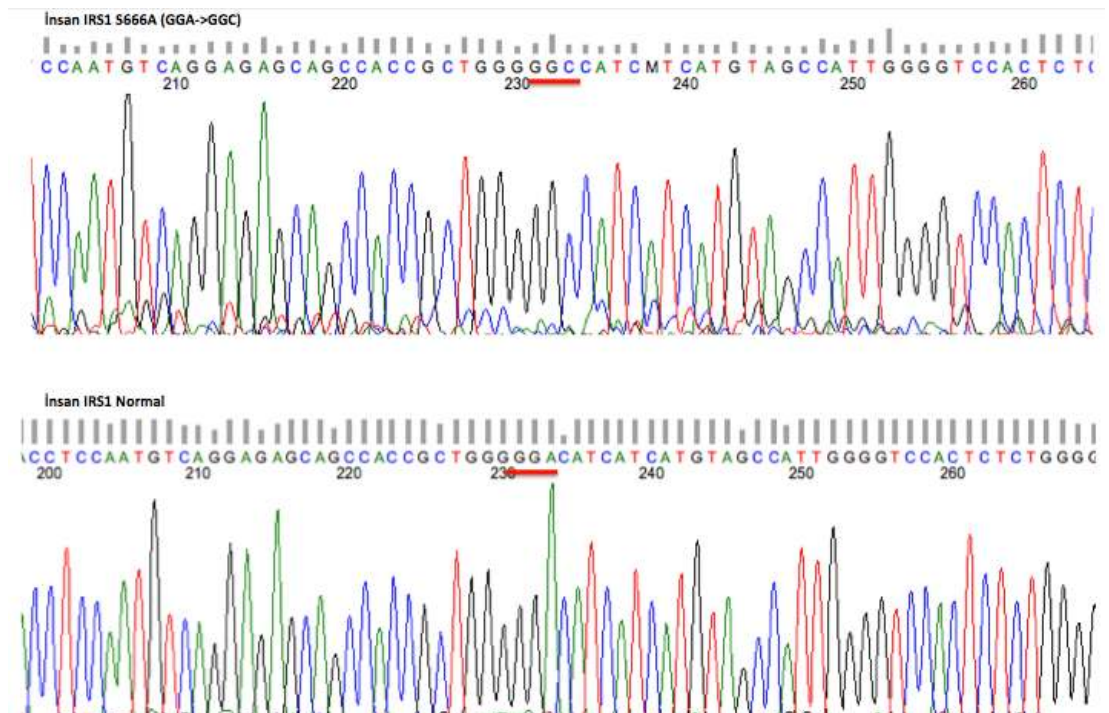
Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak p38 MAPK'ın IRS1'i fosforile ettiğini ve bu fosforilasyondan insulin yolağının negatif etkilendiğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda ileri sürdüğümüz p38 MAPK'ın muhtemel fosforilasyon bölgelerinin yolak üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde gösterebilmek için insan IRS1 proteininin p38 MAPK fosforilasyon noktaları olduğunu düşündüğümüz Serin616 (S616), Serin636 (S636), Serin666 (S666) ve Serin736 (S736) nolu amino asitlerin kodonlarını fosforile edilemez Alanin (A) ve fosforilasyonu taklit eden Glutamik asit (E) kodonlarına tekli ve kombinasyon olarak SDM yöntemi ile çevirdik. Mutant plazmidler E.coli DH5α suşuna transforme edildikten sonra Amfisilin içeren agar petrilerinde oluşan bakteri kolonileri çoğaltılarak bunlardan plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen mutant plazmitler kalıp alınarak IRS1'in ilgili bölgelerine spesifik primerler aracılığıyla PCR amplifikasyonları ve devamında DNA dizi analizleri gerçekleştirildi ve mutasyonlar doğrulandı (Şekil 4.13 - 4.20) SDM yöntemi baz alınarak ilgili bölgelerin tekli ve kombinasyonel mutantları içeren toplam 30 memeli ekspresyon vektörü oluşturuldu.



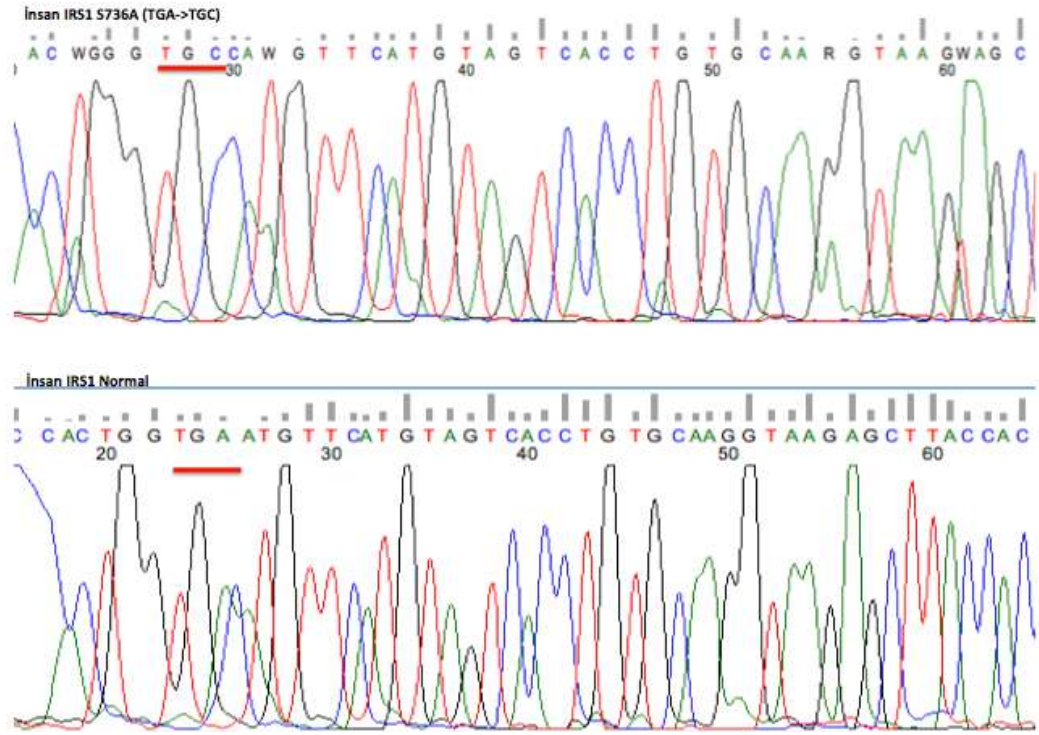
Şekil 4.13. İnsan IRS1 S616A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



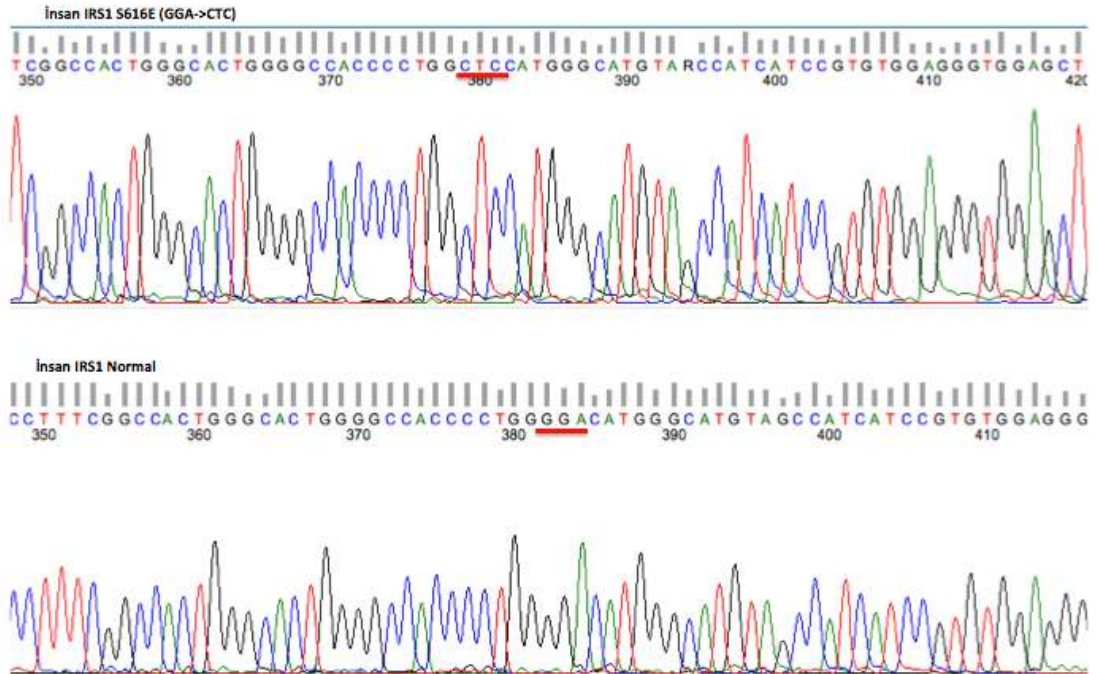
Şekil 4.14. İnsan IRS1 S636A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



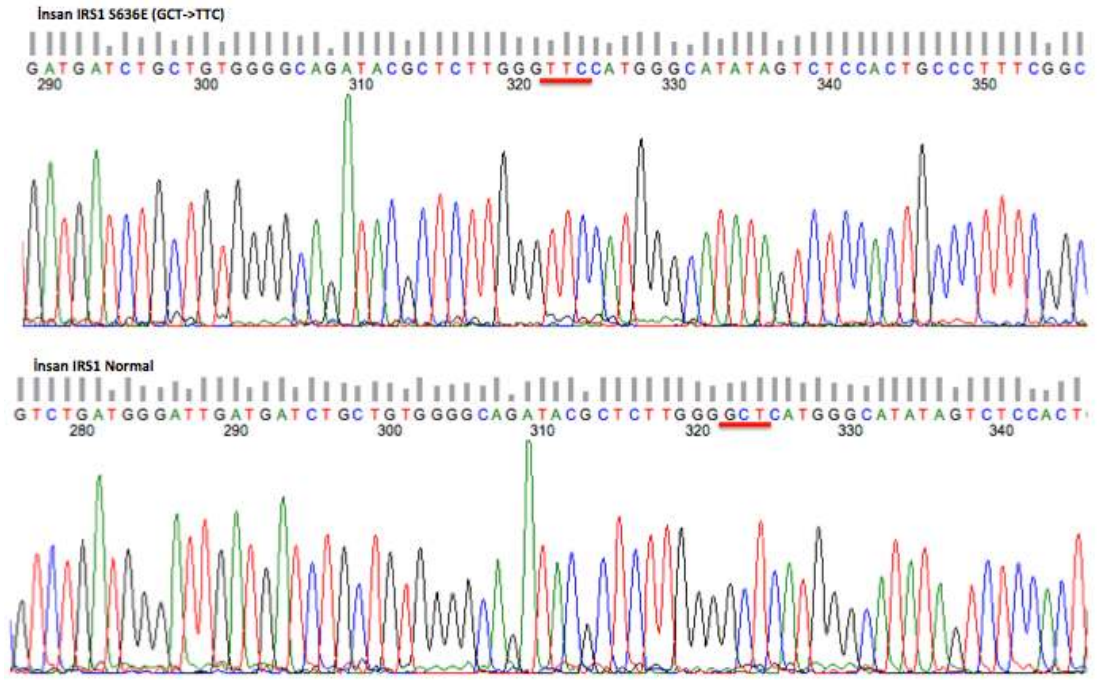
Şekil 4.15. İnsan IRS1 S666A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



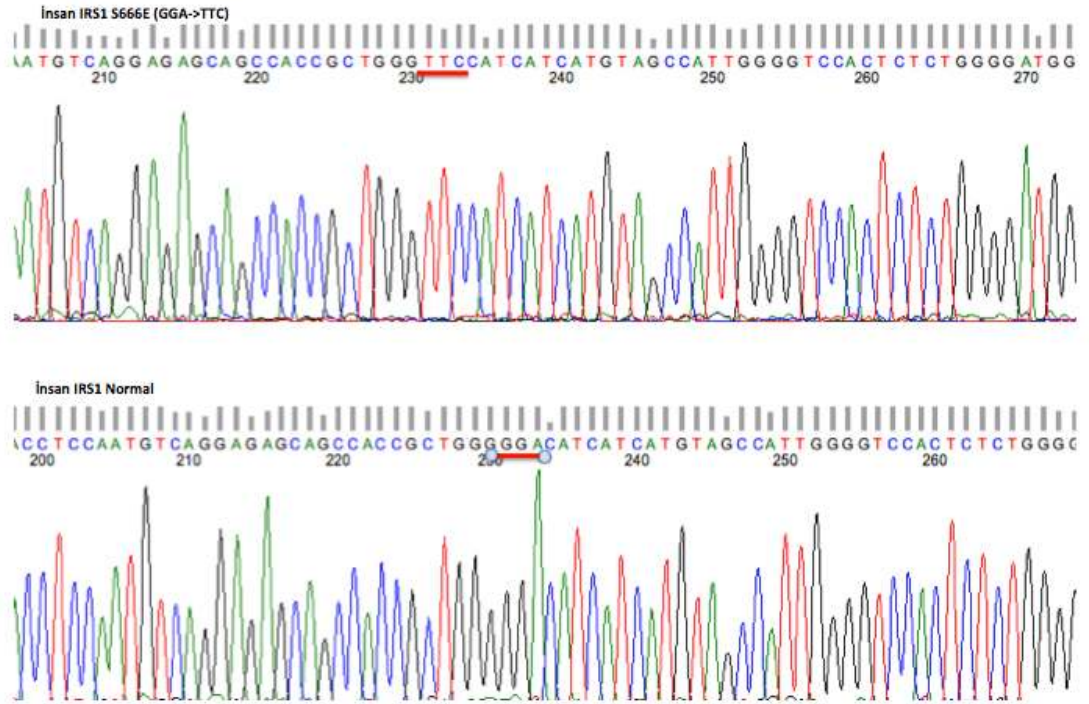
Şekil 4.16. İnsan IRS1 S736A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



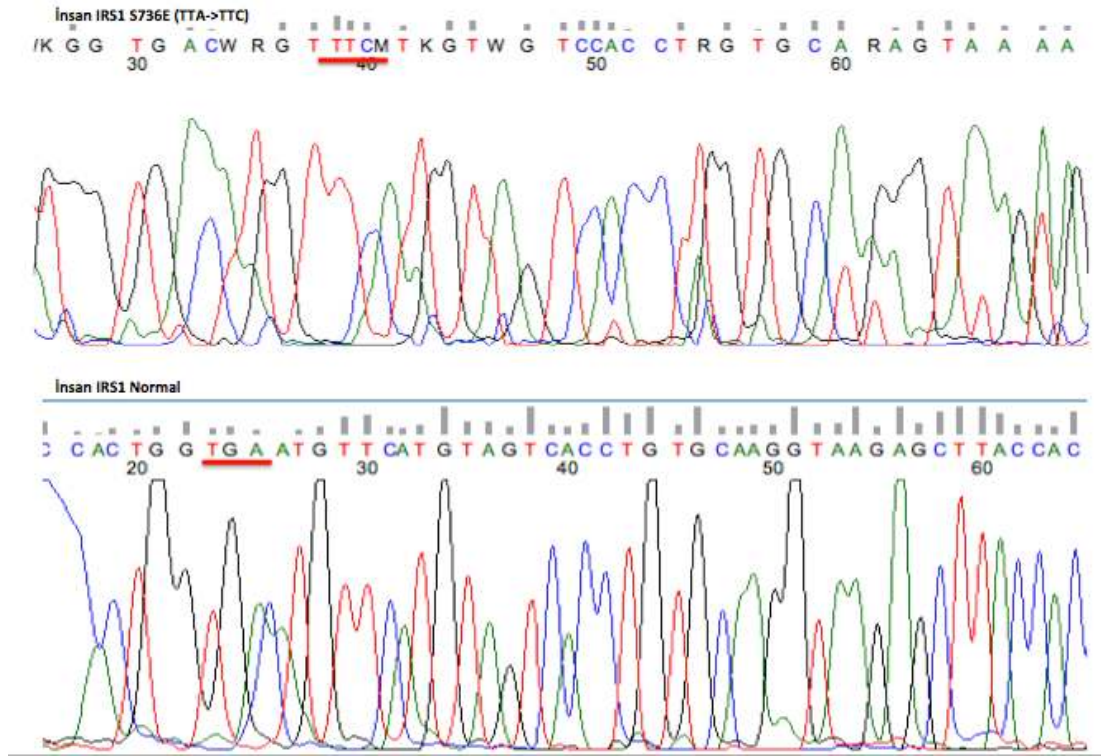
Şekil 4.17. İnsan IRS1 S616E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



Şekil 4.18. İnsan IRS1 S636E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



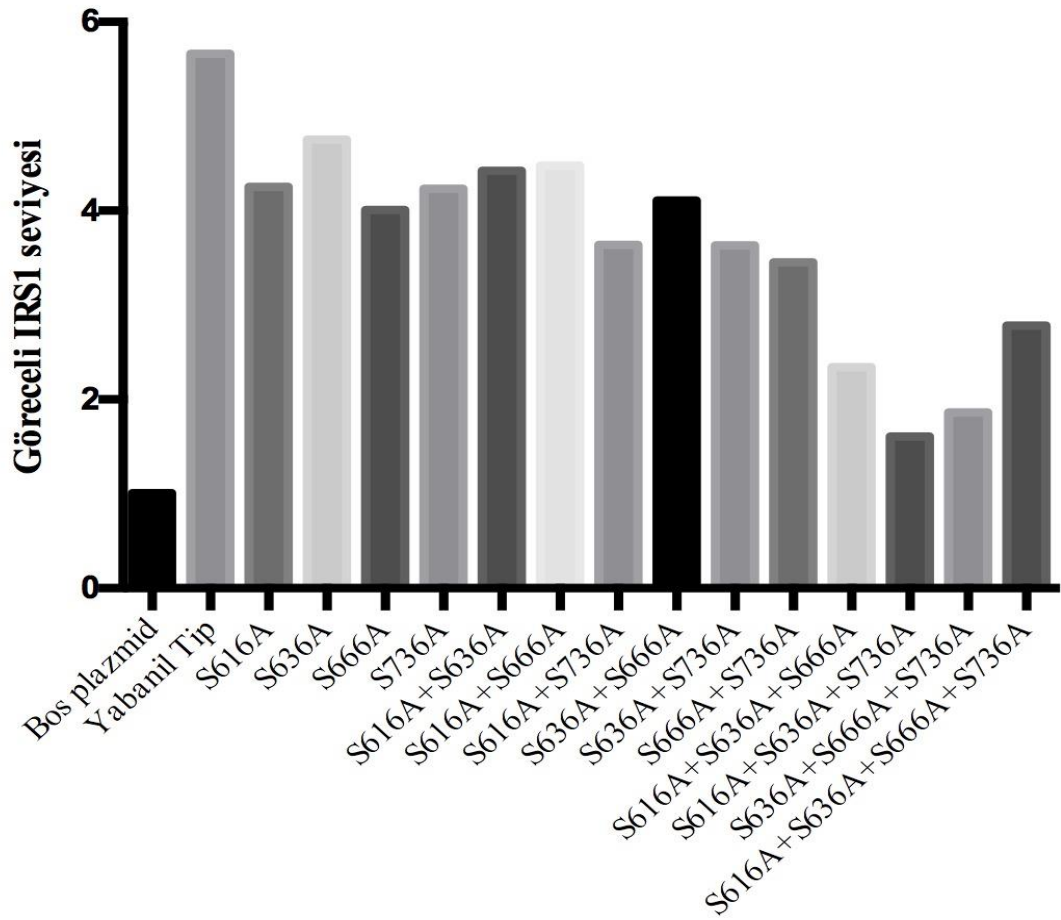
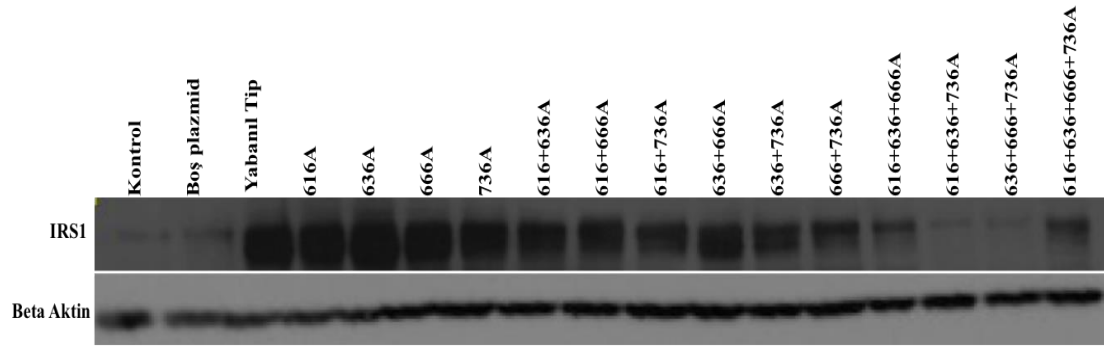
Şekil 4.19. İnsan IRS1 S666E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi



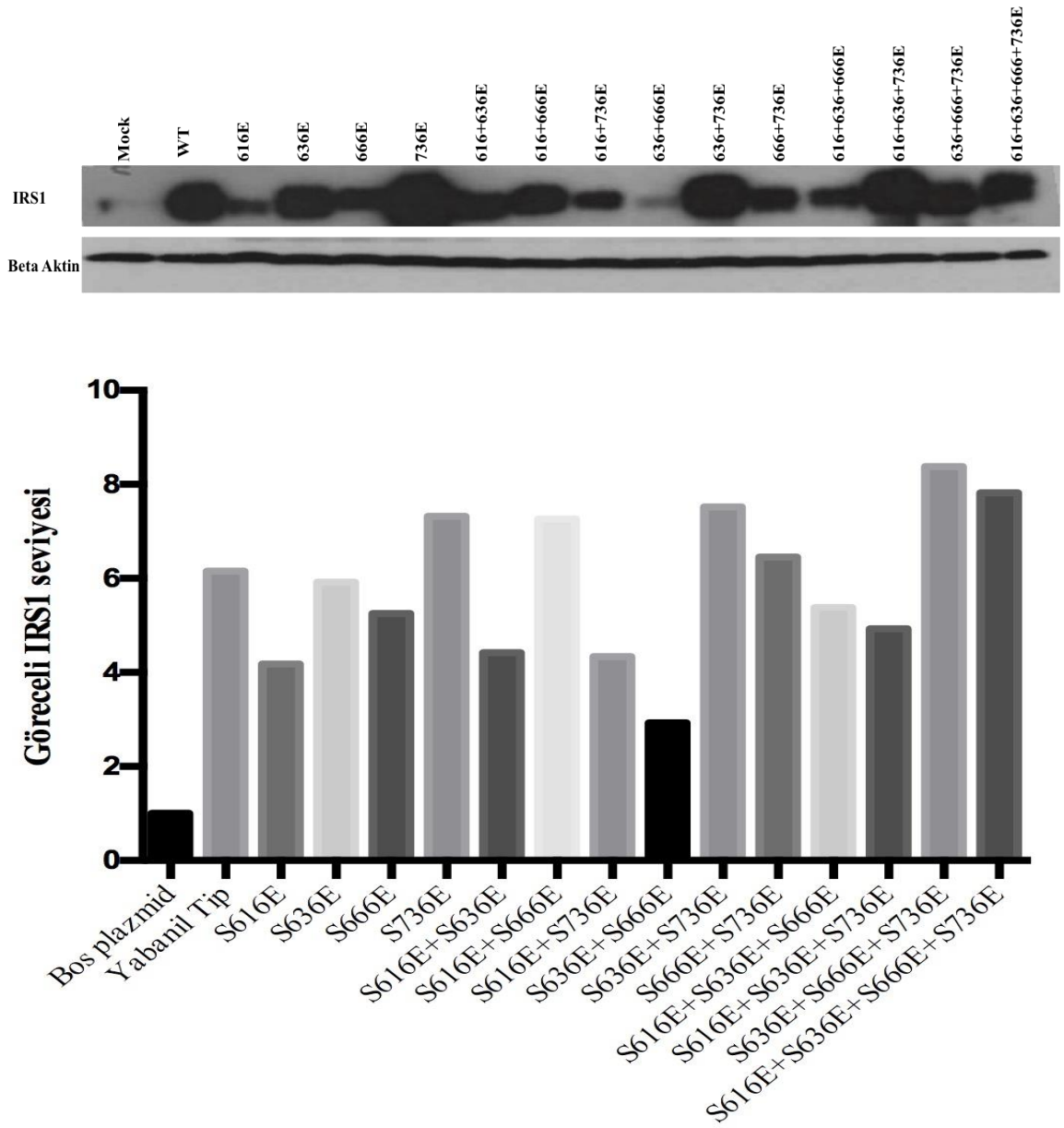
Şekil 4.20. İnsan IRS1 S736E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi

4.10. SDM Yöntemi İle Oluşturulan Mutant İnsan IRS1 Ekspresyon Vektörlerinin 293T Hücrelerinde Ekspresyonlarının Gösterilmesi

SDM yöntemi ile mutasyonlar oluşturulduktan sonra elde edilen vektörlerde SDM amplifikasyonu sırasında sonlandırma kodonlarının oluşma olasılığını dışlamak, plazmidin doğru bir şekilde amplifiye edildiğinden emin olmak ve mutant IRS1'lerin sentezinin yapıldığını göstermek için Kalsiyum Fosfat transfeksiyon yöntemi ile 10 µg plazmit DNA'ları 293T hücrelerine verilmiş ve 72 saat boyunca vektörde bulunan memeli antibiyotik direnç geni baz alınarak G418 (neomisin) içeren ortamda protein ekspresyonuna devam edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen lizatlar kullanılarak mutant IRS1'lerin ekspresyonu western blot ile gösterilmiştir. Western Blot görüntüleme aşamasında protein ekspresyonlarının net görülebilmesi için filmler uzun süreli yansımaya maruz bırakılmıştır. Bu nedenle bazı örneklerde aşırı yansıma görülmektedir. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22' de görüldüğü gibi SDM sürecinde mutantların ekspresyonunu olumsuz etkileyecek bir durum oluşmamış, mutant proteinlerin çoğu yüksek miktarda ekspresyon göstermişlerdir. (Şekil 4.21- 4.22)



Şekil 4.21. İnsan IRS1 A (Alanin) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi. IRS1 yabanıl tip ve mutant memeli ekspresyon vektörleri 293T hücrelerin CaP yöntemi ile transfeke edildi. Hücreler seçiliminden sonra, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %7 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran IRS1 antikoru ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi.

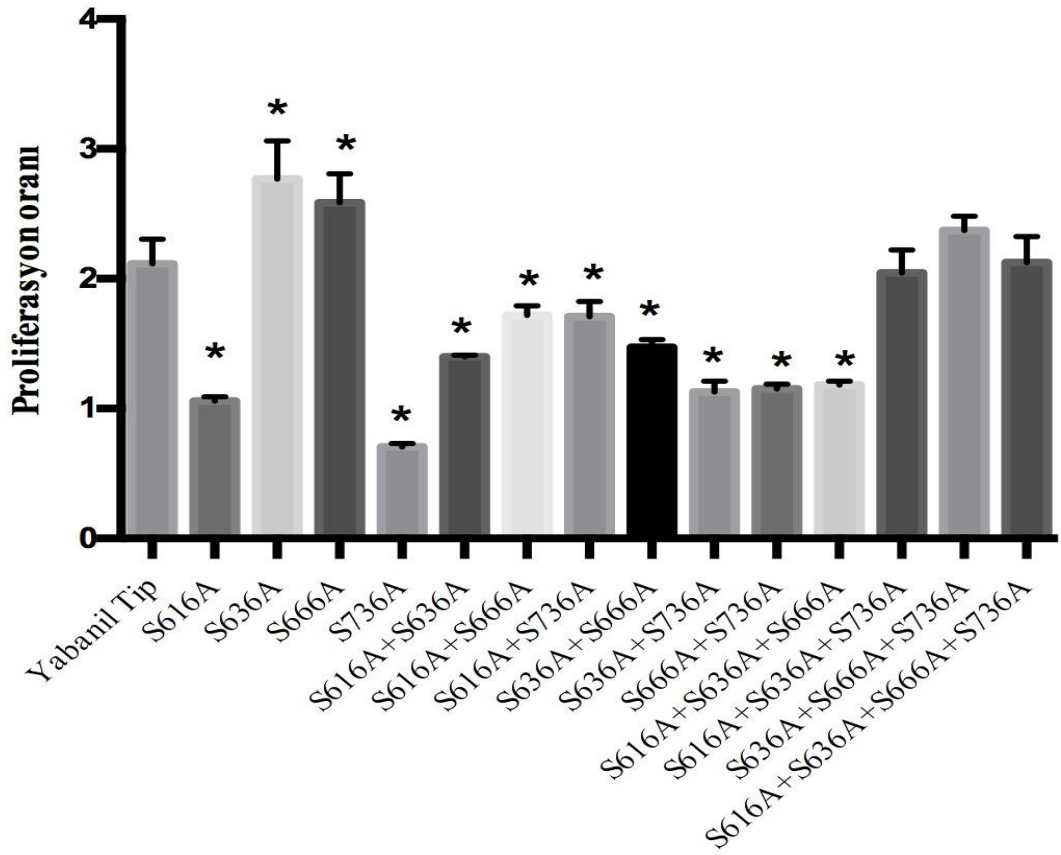


Şekil 4.22. İnsan IRS1 E (Glutamik Asit) mutantlarını içeren ekspresyon vektörlerinin 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi. IRS1 yabanıl tip ve mutant memeli ekspresyon vektörleri 293T hücrelerin CaP yöntemi ile transfekte edildi. Hücreler seçiminden sonra, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %7 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran IRS1 antikoru ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi.

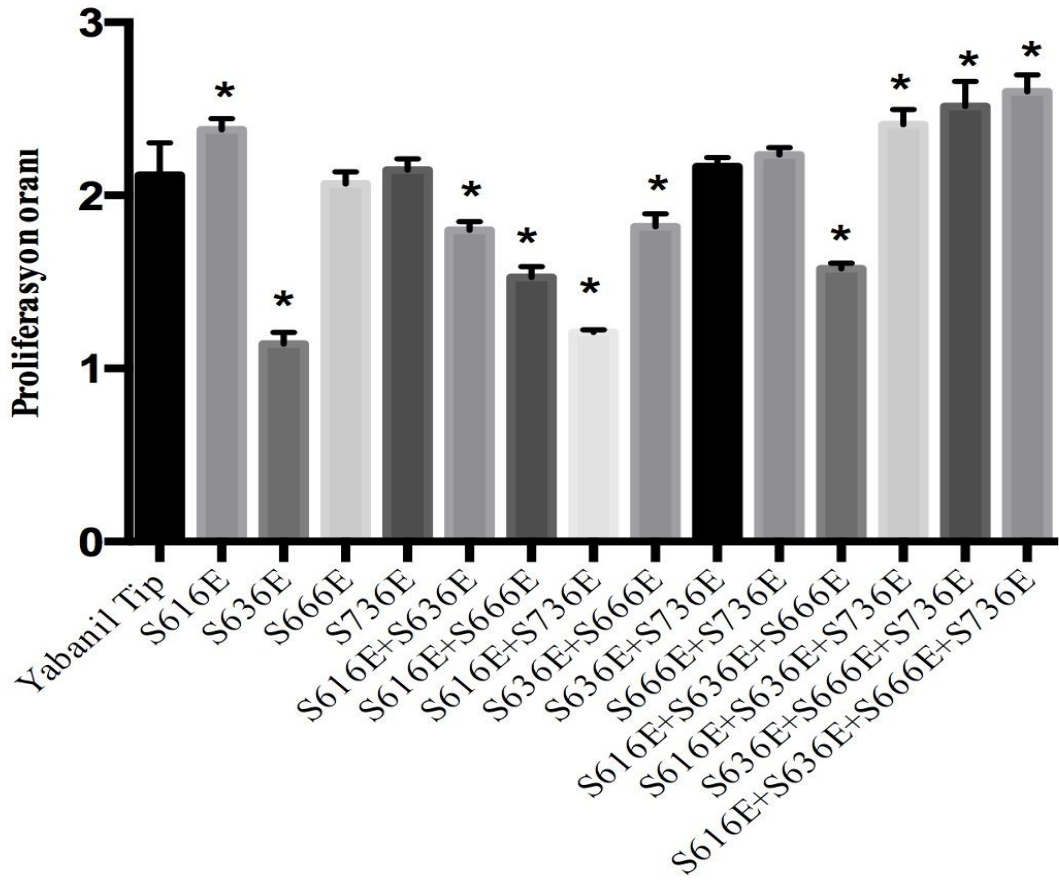
4.11. Yabancıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Proliferasyon Oranlarının Belirlenmesi

p38 MAPK tarafından fosforile edilen IRS1 in hücrelerin proliferasyonları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla fosforilasyonu taklit eden ve fosforile edilemeyen mutant vektörleri ektopik eksprese eden hücrelere MTT analizi gerçekleştirildi. Bu sonuçlar göz önüne alındığında yabancıl tipe oranla S616A, S736A, S616+S636A, S616+S666A, S616+S736A, S636+S666A, S636+S736A, S666+S736A, S616+S636+S666A mutantlarını eksprese eden hücrelerin istatistiksel olarak proliferasyonlarında azalma olduğu belirlendi. Ancak fosforile edilemez A mutantlarını eksprese eden hücrelerin çoğunun proliferasyon oranları azalırken, S636A, S666A ve S636+S666+S736A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyon oranları ise yabancıl tipe göre anlamlı derecede artış göstermektedir. Aynı bölgelerin E mutantlarını eksprese eden hücrelerin yabancıl tipe oranla proliferasyon hızlarına bakıldığında, S636E, S616+S636E, S616+S666E, S616+S736E, S636+S666E ve S616+S636+S666E eksprese eden hücrelerin proliferasyon hızları daha düşükken, S616E, S616+S636+S736E, S636+S666+S736E ve S616+S636+S666+S736E mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyon hızları daha yüksektir. (Şekil4.23, 4.24)

A ve E mutantlarını eksprese eden hücreler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise S636+S666+S736 mutantını eksprese eden hücre grubu dışındakilerin proliferasyon hızları arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır.

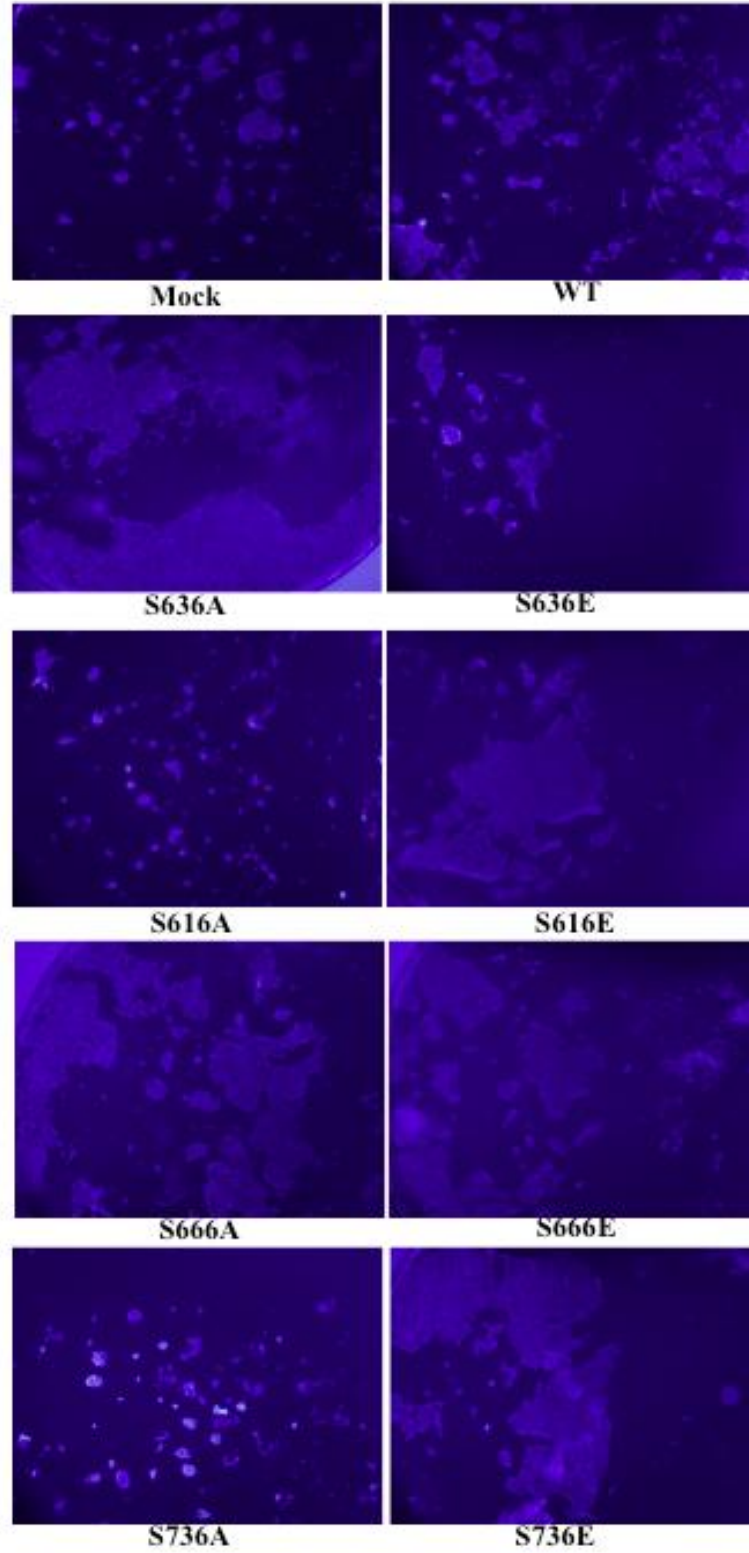


Şekil 4.23.Yabanıl tip ve A mutant IRS1 proteini eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması. Hücreler 3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 6 tekrar halinde 96 kuyulu kültür kabına ekildi. %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li %95 nemli kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri ile 16 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda FBS(-) gruba MTT protokolü uygulanırken, diğer hücre grubunun üzerine her kuyuda son hacim %10 olacak şekilde FBS’ li DMEM eklendi ve 48. saatte bu gruba da MTT protolü uygulanarak spektrofotometrik ölçümleri ve yabanıl tip kontrol alınarak istatistiksel analizleri gerçekleştirildi. (Bir düzenekte her grup n=6 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. *:p≤0,05)

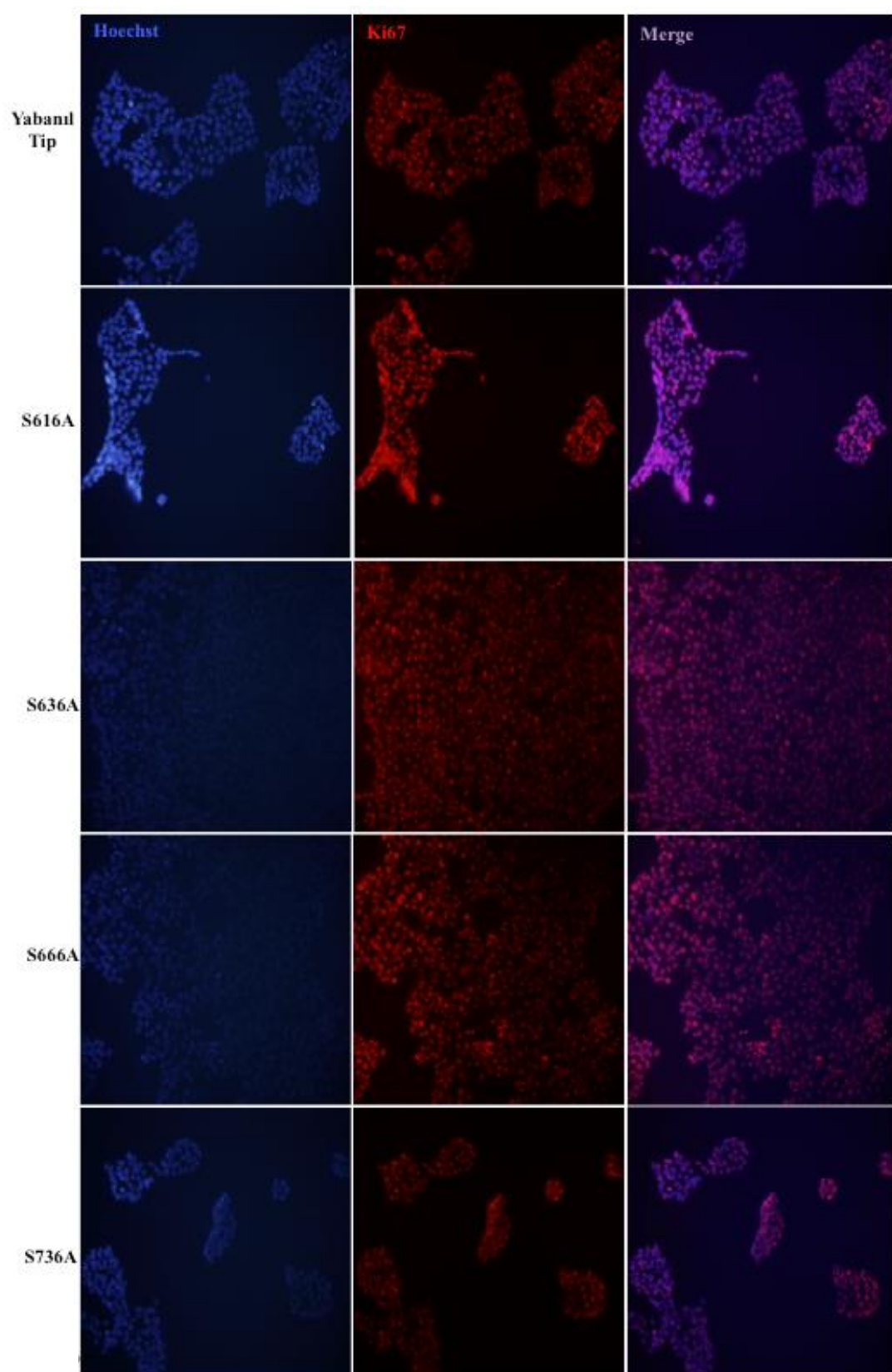


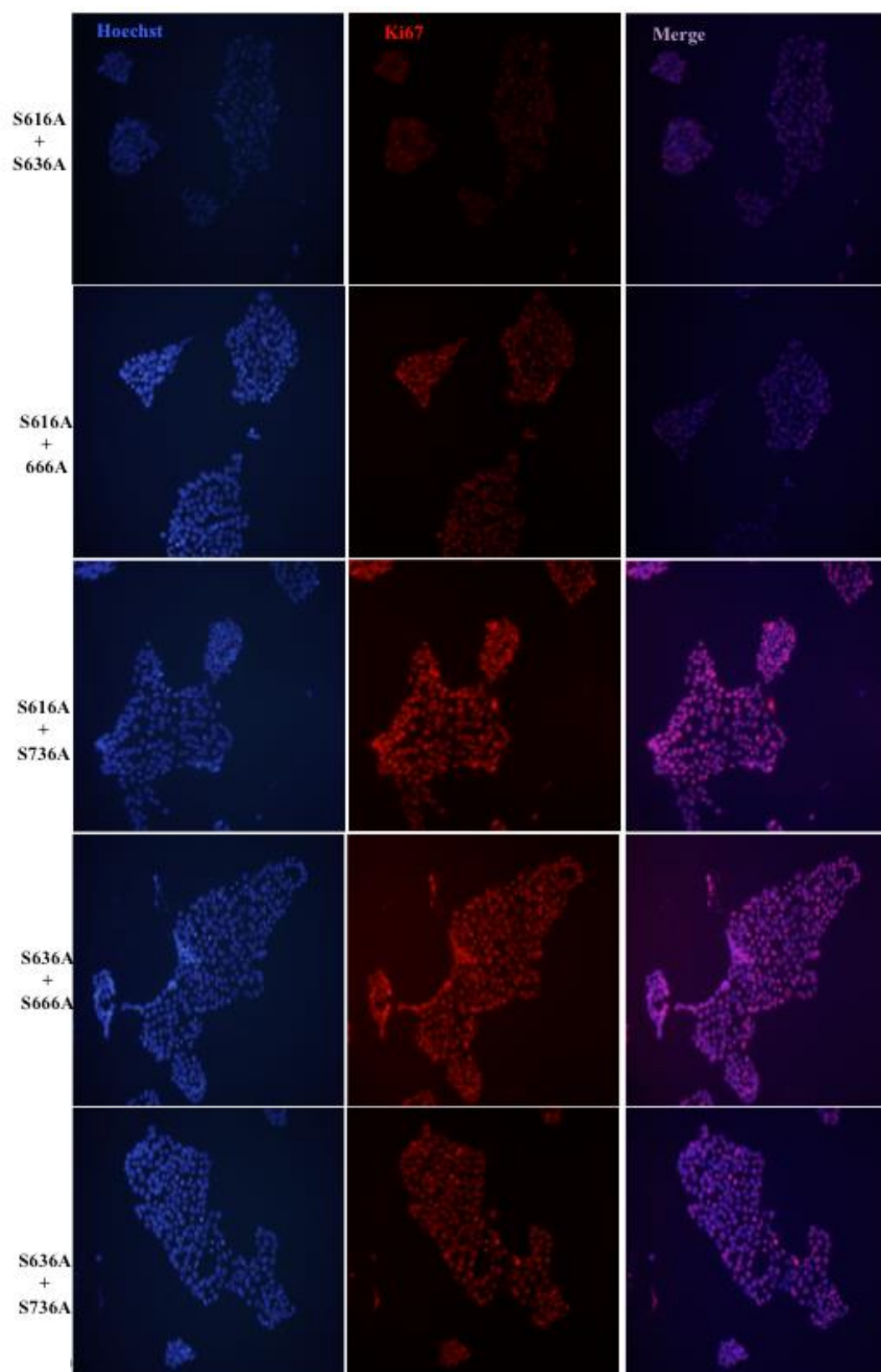
Şekil 4.24.Yabanıl tip ve E mutant IRS1 proteini eksprese eden hücrelerin MTT analizi ile proliferasyon oranlarının karşılaştırılması. Hücreler 3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 6 tekrar halinde 96 kuyulu kültür kabına ekildi. %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂’ li %95 nemli kültür ortamına alındı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün FBS içeren DMEM uzaklaştırıldı ve serum içermeyen besiyeri ile 16 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda FBS(-) gruba MTT protokolü uygulanırken, diğer hücre grubunun üzerine her kuyuda son hacim %10 olacak şekilde FBS’ li DMEM eklendi ve 48. saatte bu gruba da MTT protolü uygulanarak spektrofotometrik ölçümleri ve yabanıl tip kontrol alınarak istatistiksel analizleri gerçekleştirildi. (Bir düzenekte her grup n=6 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. *:p≤0,05)

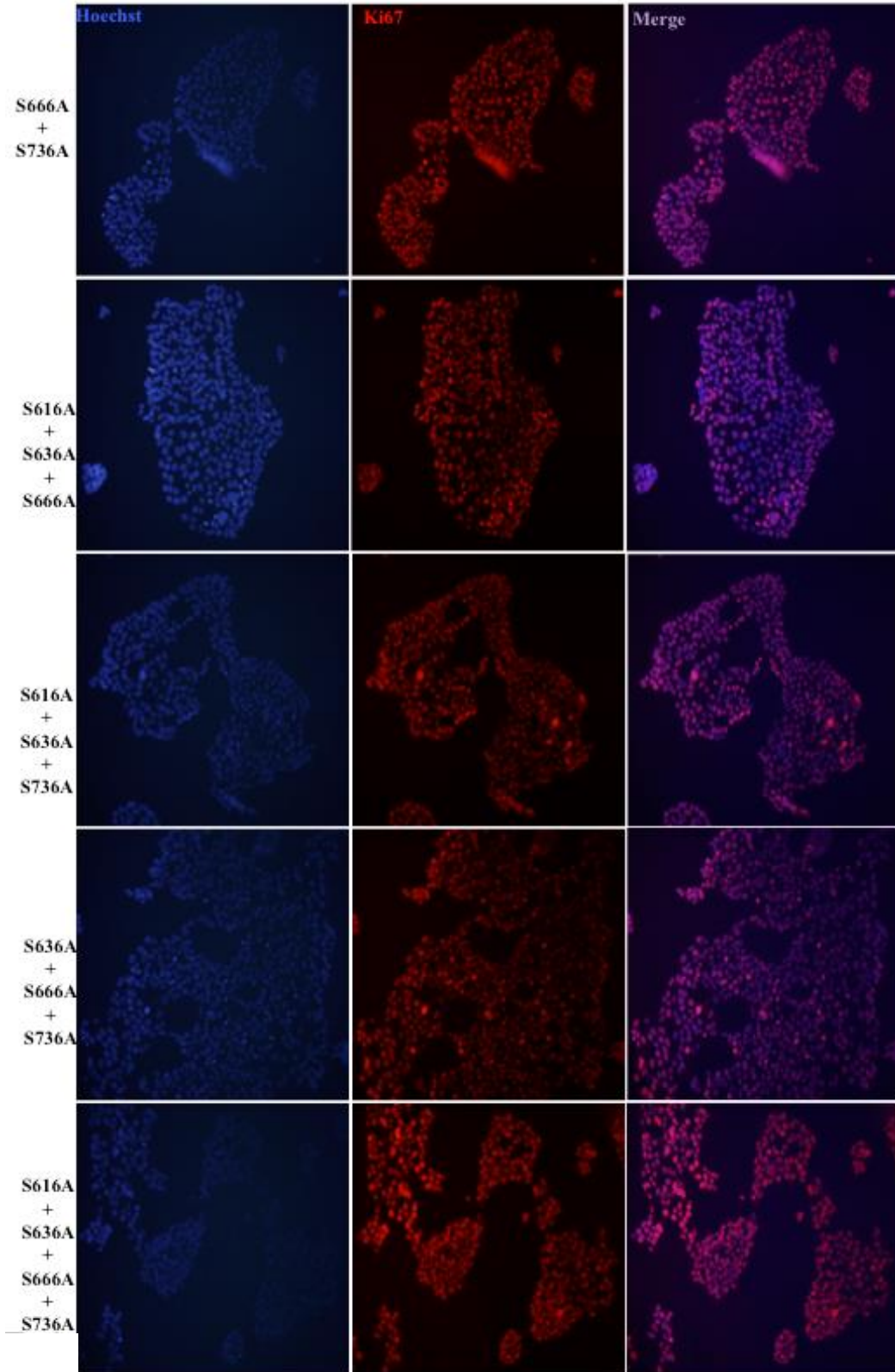
p38 MAPK’ın IRS1 fosforilasyonuna bağlı olarak hücrelerin proliferasyonları üzerine etkisi ayrıca Ki67 ve Hoescht boyası ile teyit edildi (Şekil 4.25, 4.26, 4.27) MTT analizine benzer şekilde %10 FBS etkisi atında 48. saatte hücreler immünfloresan sitokimya yöntemi ile boyandı. Hücrelerin genel yoğunluğunun görüntülenmesi için tekli mutantlar 4X büyütme ile, tüm mutantların Ki67 boyamasının görüntülenmesi ise 20X büyütme ile sağlandı. Elde ettiğimiz sonuçlar MTT analizin sonuçlarını doğrulamaktadır.



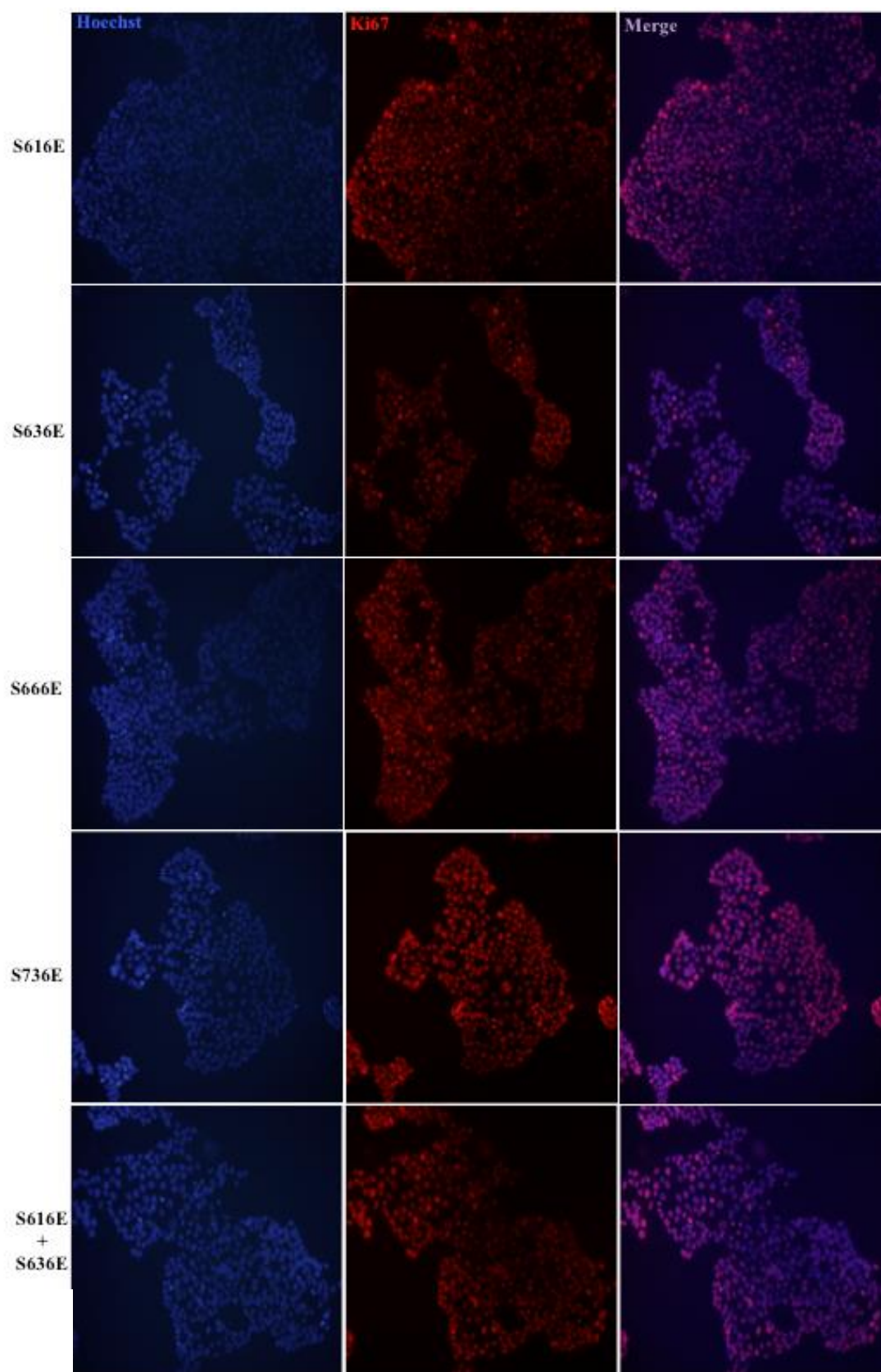
Şekil 4.25.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli mutantları arasındaki hücre yoğunluk farkının belirlenmesi (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzeneğe bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 4X büyütme)

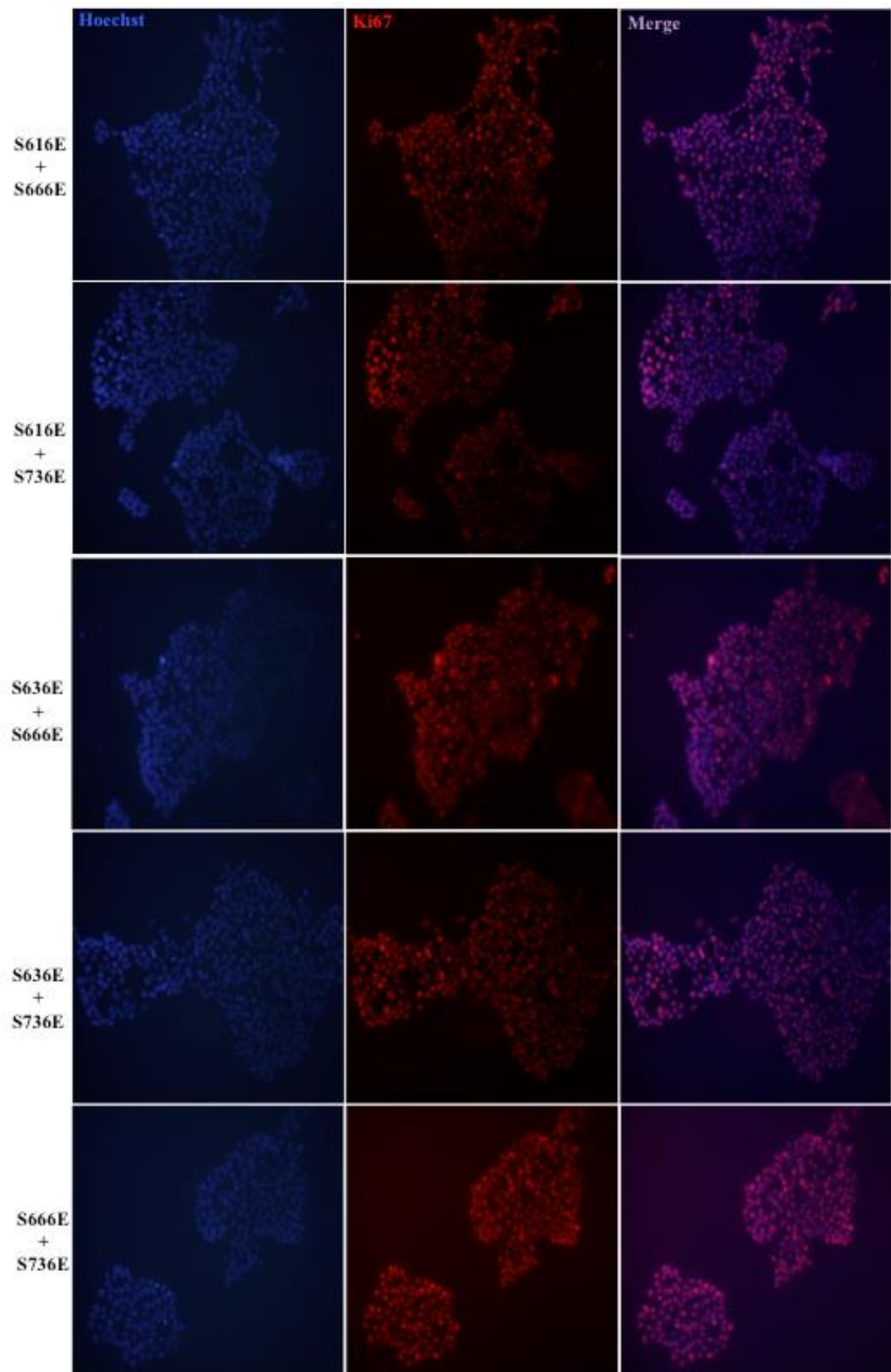


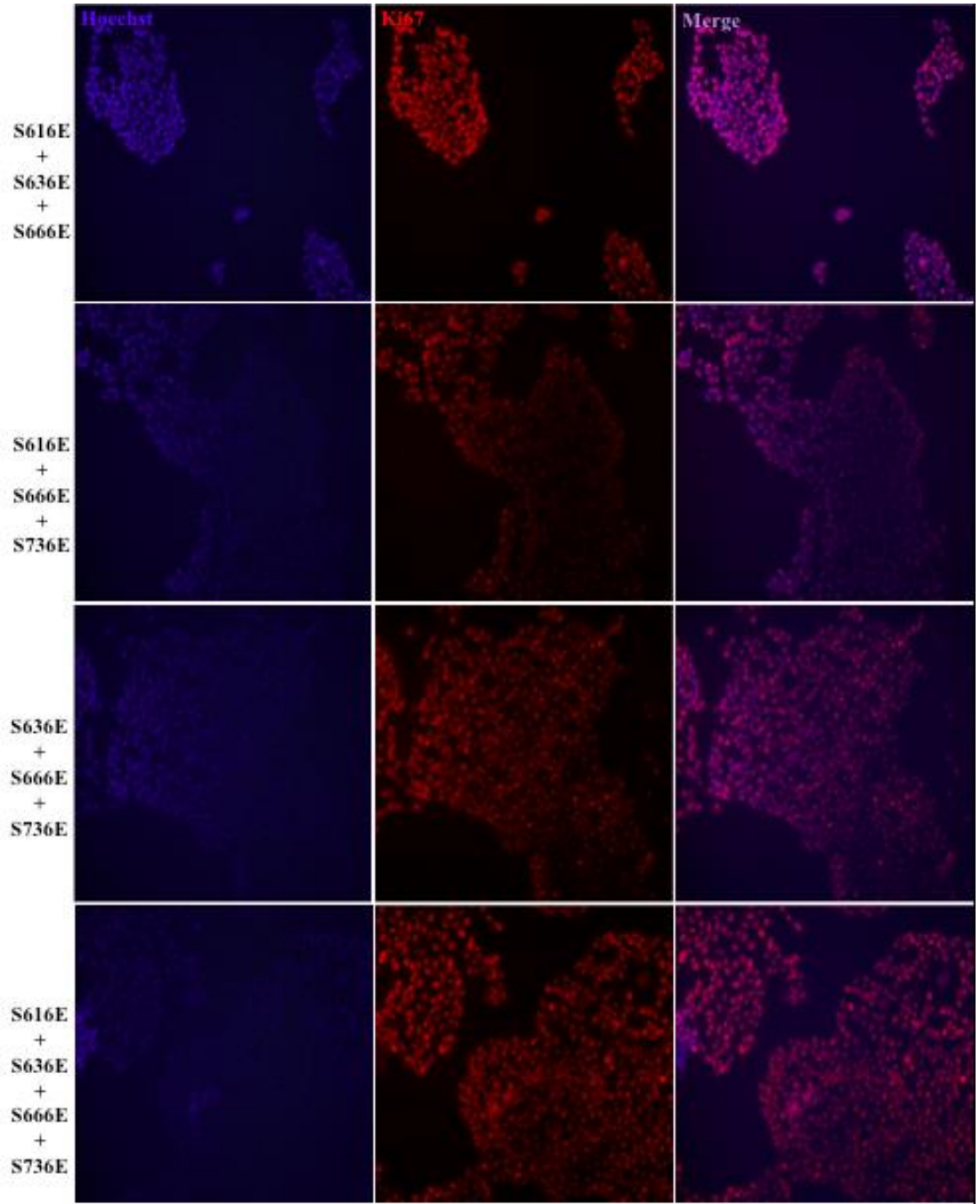




Şekil 4.26.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin A mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının ki67 boyaması ile doğrulanması (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzenek bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme)







Şekil4.27. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin E mutantlarını eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarının ki67 boyaması ile doğrulanması (Bir düzenekte her grup n=3 tekrar halinde ekilmiş olup, düzeneğe bağımsız olarak 3 kere tekrarlanmıştır. 20X büyütme)

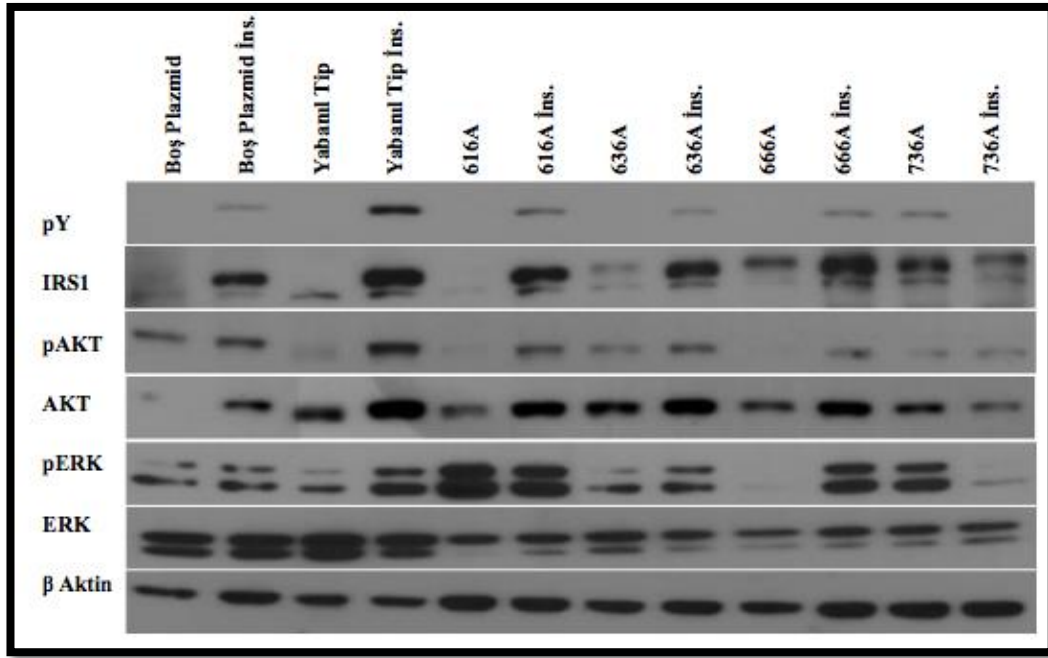
4.12. Yabanıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerin İnsülin Sinyal Yolağına Etkileri

p38 MAPK tarafından fosforile edilen IRS1'in insülin sinyal yolağı üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde belirlemek amacıyla, fosforilasyonu taklit eden ve fosforile edilemeyen mutant vektörleri ektopik eksprese eden hücreler, gece boyu serumsuz ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, bir grup ilgili proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önünde bulundurularak 100 ng/ml insülin ile muamele edildi. Hazırlanan protein lizatlarında pERK, pAKT, ERK, AKT, IRS1 ve IRS1 fosfotirozin oranları belirlendi (Şekil 4.28).

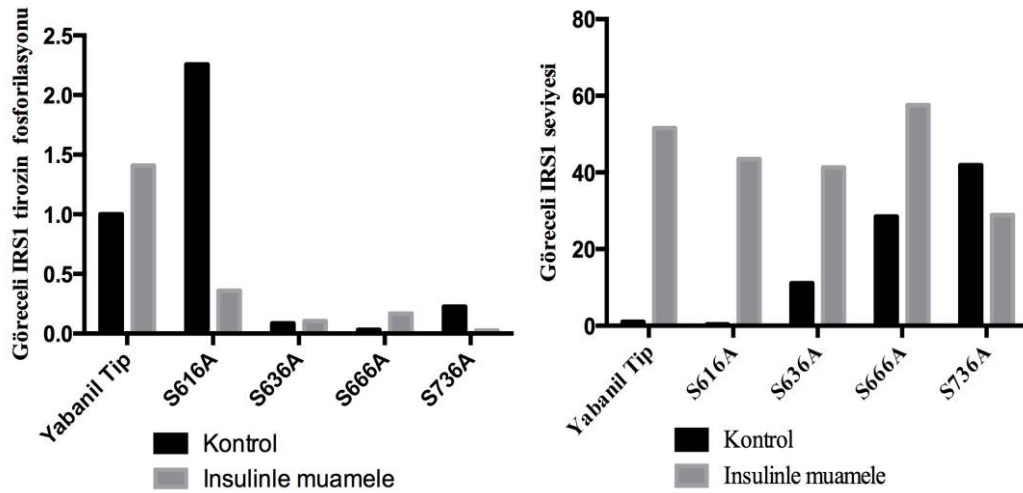
IRS1 Alanin mutantlarının tekli kombinasyonlarını eksprese eden hücrelerin kontrol gruplarının IRS1 fosfotirozin oranlarına bakıldığında S616A mutantının yabanıl tipe oranla yaklaşık 2,5 kat artış gösterdiği, diğer mutantlar da ise azalma olduğu görülmektedir. Aynı karşılaştırma insülin verilen grupta yapıldığında insülin ilavesi sonunda hücrelerin IRS1 fosfotirozin oranları yabanıl tipe göre azalma göstermektedir. Mutantları eksprese eden hücreler, kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında S616A ve S736A ekspresyonu yapan hücrelerde IRS1 fosfotirozin seviyesi sırasıyla yaklaşık 4 kat ve 3 kat azalmıştır. Ancak S666A hücrelerinde ise insülin muamelesi IRS1 fosfotirozin oranını 3 kat arttırmıştır. Hücrelerin bazal IRS1 ekspresyon seviyelerine bakıldığında S736A mutantı dışındaki hücrelerin insülin muamelesi sonucunda IRS1 seviyelerinde artış olduğu görülmektedir. (Şekil 4.29)

Aynı grubun kontroller arasında pAKT oranlarına bakıldığında S666A ve S736A gruplarında yabanıl tipe oranla fosforilasyonun belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir. İnsülin muamele gruba bakıldığında tüm gruplarda yabanıl tipe oranla azalma görülürken, gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında S616A, S666A ve S736A gruplarının yabanıl tip kadar olmasa da insüline cevap verdiği görülmektedir. Mutantların AKT ekspresyonlarına bakıldığında S616A ve S666A vektörlerini eksprese eden hücrelerin AKT ekspresyonları insülin ile muamelesi ile artış gösterirken S736A' da ise azalma göstermektedir. (Şekil 4.30)

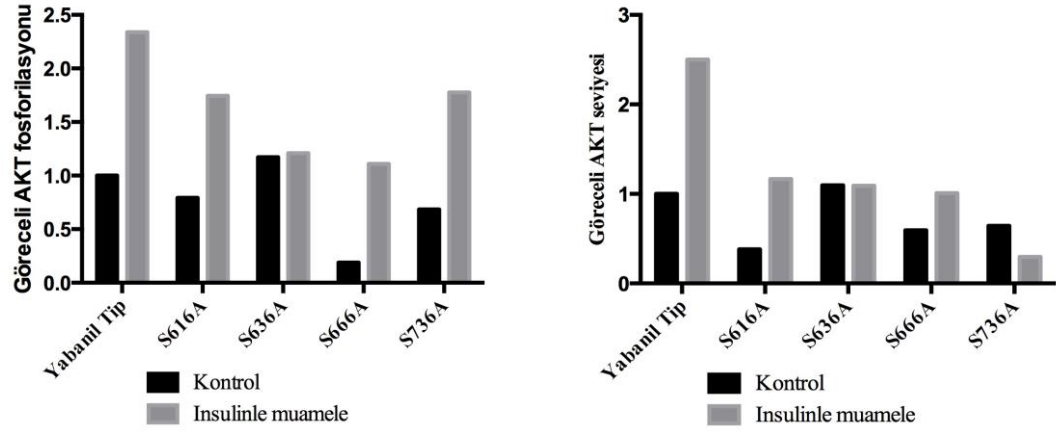
ERK fosforilasyonları incelendiğinde, kontrol grubu içinde yabanıl tipe oranla S616A'da 10 kat ve S736A'da 4 kat artarken, S666A'da yarı yarıya azalmaktadır. İnsülin muamele grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde S616A, S636A ve S666A'da yabanıl tipe oranla pERK seviyesinde artış olduğu görülürken S736A'da ise azalma olduğu saptanmıştır. Grup kendi kontrolleri ile karşılatırıldığında S616A ve S736A insüline cevap vermezken, S636A ve S666A'da ERK fosforilasyonu açısından insüline cevap verdiği görülmektedir. Mutantlar ERK ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde S616A grubunun insülinle muamele edildiğinde ERK ekspresyonun da belirgin bir artış gerçekleştirdiği görülürken, S636A mutantın da ise azalmanın olduğu görülmektedir. (Şekil 4.31)



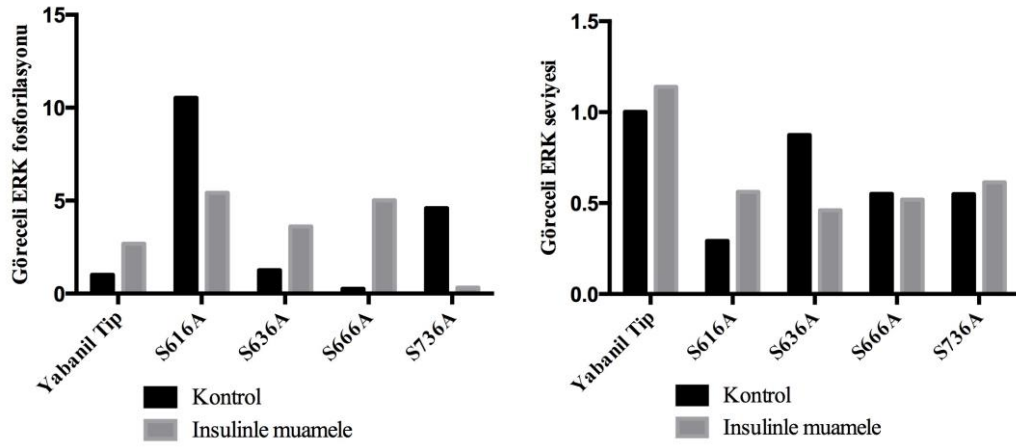
Şekil 4.28. Yabancı tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabancı tip ve A mutantları eksprese eden hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizati %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikorları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi.



Şekil 4.29. Yabancı tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.30. Yabani tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

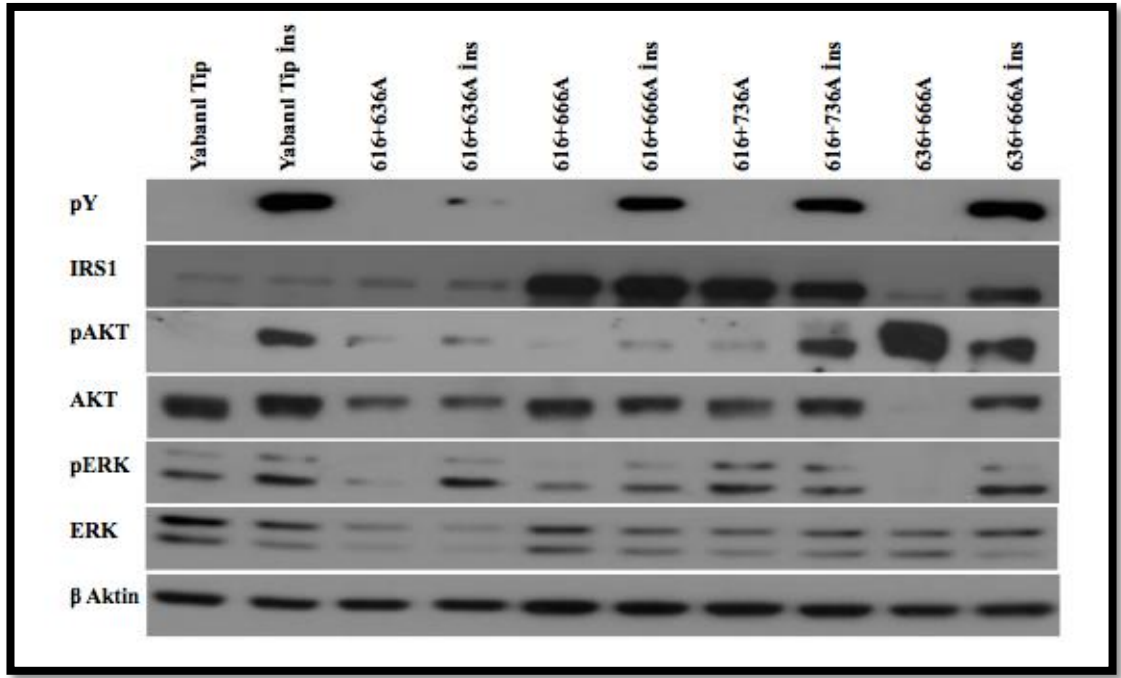


Şekil 4.31. Yabani tip ve IRS1 proteininin tekli A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

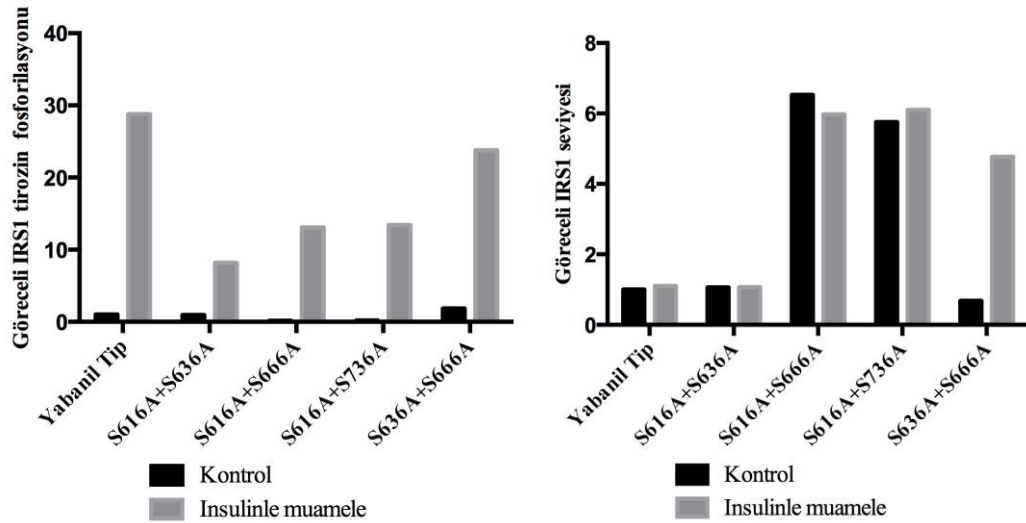
İkili IRS1 A mutantlarının insülin sinyal yolağı üzerindeki etkilerine bakıldığında, IRS1' in tirozin fosforilasyonunda yabancı tipe oranla insülin muamele grupların hepsinde azalma olduğu görülmektedir. Ancak hücreler yabancı tip kadar olmasa da kendi kontrollerine oranla insüline yanıt vermektedirler. Grupların IRS1 ekspresyonları karşılaştırıldığında S616A+S666A ve S616A+S736A mutantlarının kontrol ve insülinle muamele, S636A+S666A mutantının ise insülinle muamele grubunda IRS1 ekspresyonunun yabancı tipe oranla oldukça yükseldiği görülmektedir. İnsülinle muamele edildiğinde IRS1 ekspresyonu en etkin şekilde arttıran grup ise S636A+S666A mutantıdır. (Şekil 4.33).

AKT fosforilasyon düzeylerinde ise S636A+S666A mutantını eksprese eden hücre grubunun kontrolünün pAKT seviyesinin yabancı tipe oranla 100 kat, S616A+S636A' nın 7 kat ve S616A+S736A' nın ise 8 kat arttığı görülmektedir. İnsülin muamele grup değerlendirildiğinde ise S616A+S736A ve S636A+S736A ekspresyonu gerçekleştiren grupların yabancı tipe oranla pAKT seviyeleri 2 ve 2,5 kat artmıştır. İnsülin muamele grup kontrolleri ile karşılaştırıldığında S616A+S636A grubunda anlamlı bir farklılık görülmezken, S636A+S666A grubunda ise insülinle muamele sonrası pAKT oranı yarı yarıya azalmıştır. Diğer gruplar ise kendi kontrolleri göz önüne alındığında insüline AKT fosforilasyonu açısından cevap vermektedir. Grupların AKT seviyelerine bakıldığında S636A+S666A grubunun AKT ekspresyonunu insülinle muamele edildiğinde oldukça arttırdığı görülmektedir. Diğer gruplarda ise AKT ekspresyonunda belirgin bir değişim görülmemektedir. (Şekil 4.34)

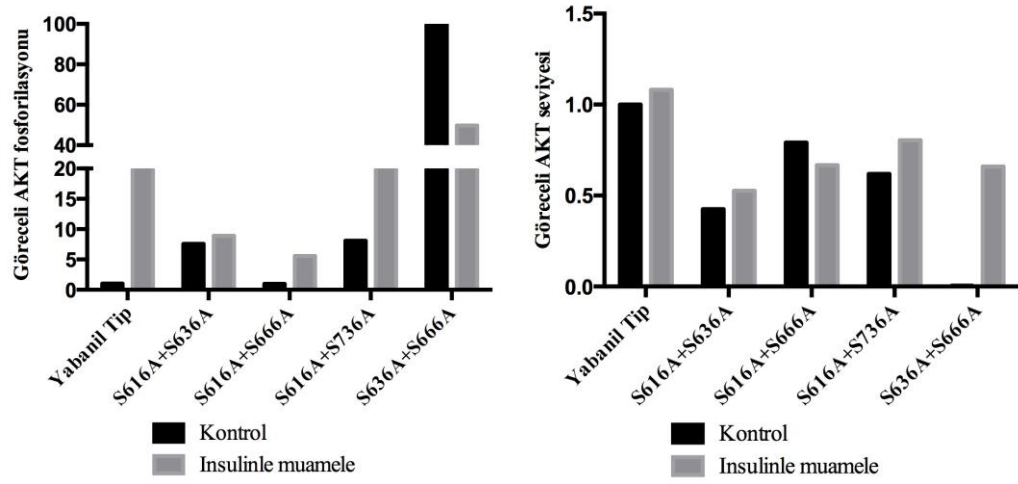
İkili mutantların kontrol grubunun pERK seviyelerinde yabancı tipe oranla S666A+S736A' nın 2 kat, S616A+S736A' nın ise 4 kat arttığı saptanmıştır. İnsülin muamele grupta ise S616A+S636A' nın ve S666A+S736A' nın fosforilasyonlarında yabancı tipe oranla belirgin bir artış gözlemlenmektedir. Gruplar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında tüm grupların pERK açısından insülin cevap verdiği görülürken, S616A+S736A' da yarı yarıya bir azalmanın olduğu saptanmıştır. İkili mutantları eksprese eden hücrelerin ERK ekspresyonlarına bakıldığında S616A+S636A mutantının ERK seviyesinin yabancı tipe oranla oldukça azaldığı saptanmıştır. Ancak örneklerin kendi kontrolleri ile aralarında ERK ekspresyonu açısından belirgin bir değişim görülmemektedir. (Şekil 4.35)



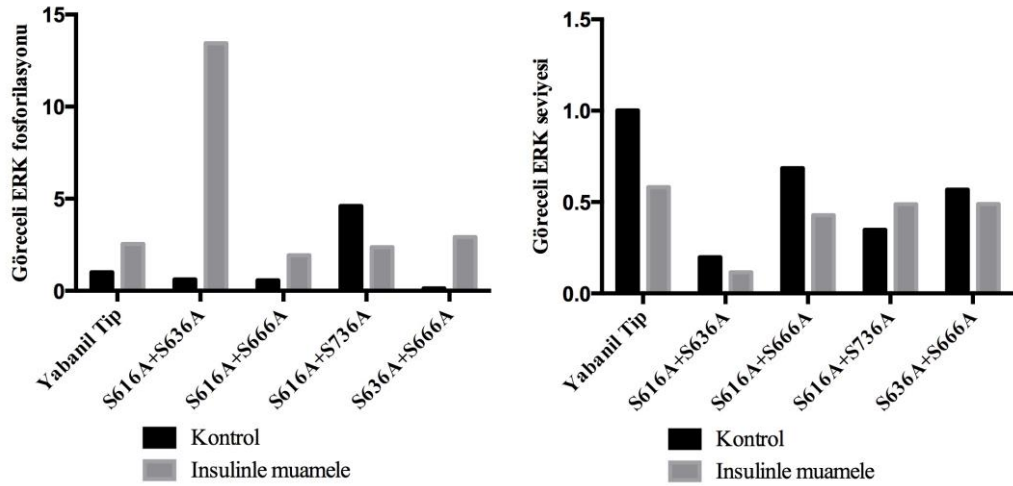
Şekil 4.32. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabanıl tip ve A mutanları eksprese eden hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre lizis tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikorları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi.



Şekil 4.33. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.34. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

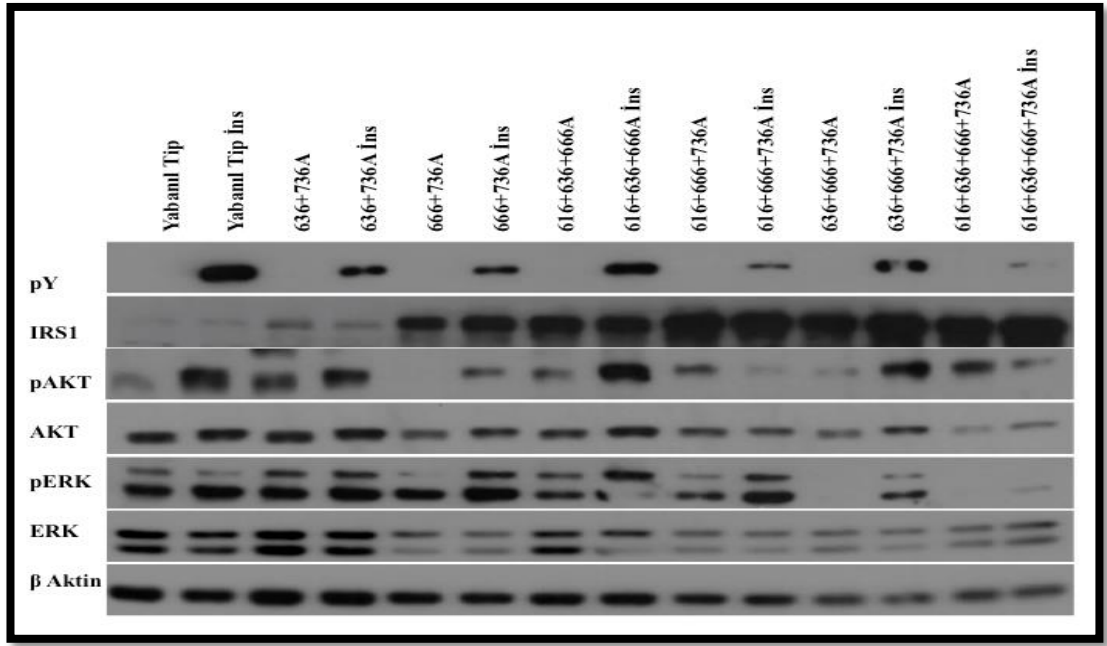


Şekil 4.35. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

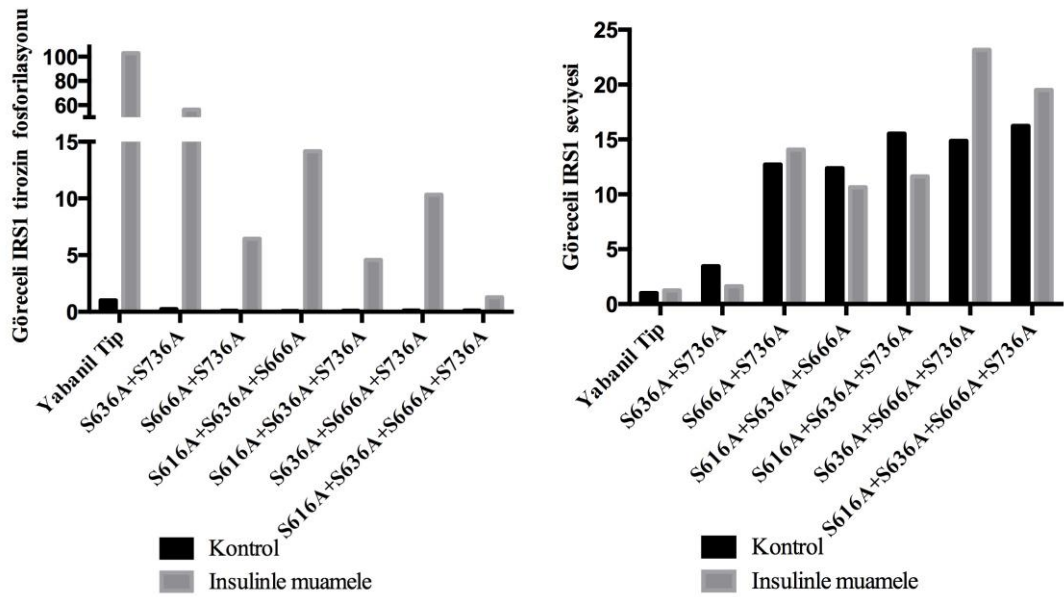
Üçlü ve dördlü kombinasyonlu mutantlarının IRS1 tirozin fosforilasyonlarında tüm mutantların insülinle muamele edildiğinde yabancı tipe oranla belirgin bir azalma görülürken, her mutantın insüline cevap vererek IRS1 düzeylerini insülinle muamele edildiğinde tirozin fosforilasyonuna uğrattığı görülmektedir. Fosfotirozin seviyesi açısından en fazla azalma dördlü mutant ekspresyonu yapan grupta gözlemlenmiştir. IRS1 ekspresyon seviyesi yabancı tipe oranla ikili kombinasyonlarda olduğu gibi üçlü ve dördlü kombinasyonlarda da artış göstermektedir. (Şekil4.37)

Mutantların kontrol grubunun AKT fosforilasyon düzeyleri değerlendirildiğinde S616A+S636A+S666A ve S616A+S636A+S736A eksprese eden hücre gruplarında yabancı tipe oranla pAKT oranı 2 kat, dördlü mutant da ise 14 kat artış göstermiştir. Mutantlar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında S616A+S636A+S736A' nın insülinle muamelesinde pAKT oranının 2 kat, dördlü mutantın ise 4 kat azaldığı görülmektedir. Grupların AKT ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında sadece S636A+S666A+S736A mutantının insülinle muamele edildiğinde AKT ekspresyonunu kontrolüne oranla belirgin bir şekilde arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.38).

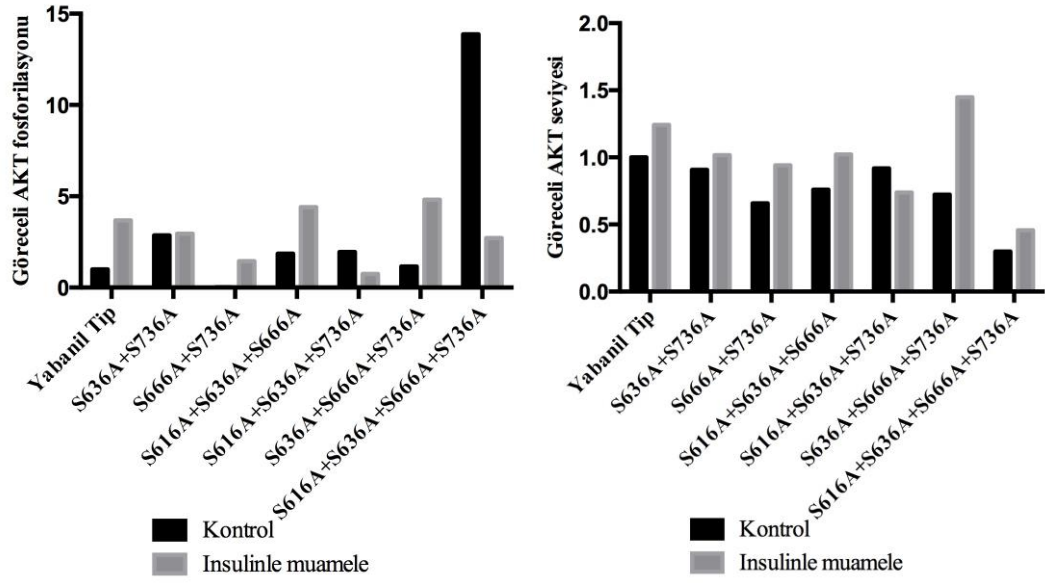
ERK fosforilasyonları kontrol grubunda S636A+S666A+S736A ve dördlü mutantta yabancı tipe belirgin bir şekilde azalma gösterirken, insülin muamele grupta pERK oranı sırasıyla 4kat, 2 kat, 5 kat ve 3 kat artış göstermiştir. Tüm mutant grupların insülinle muamele sonucunda ERK fosforilasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Mutantların ERK ekspresyon seviyelerinden sadece dördlü mutantın insülinle muamele edilen grubunda kontrolüne oranla artış görülmektedir. (Şekil 4.39)



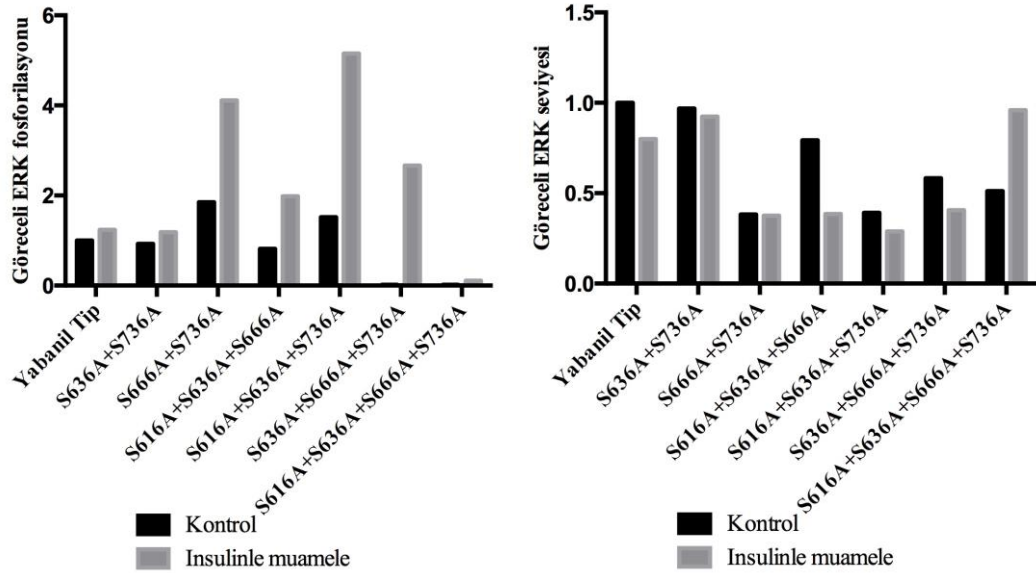
Şekil 4.36.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabanıl tip ve A mutanları eksprese eden hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre lizis tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikorları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi



Şekil 4.37.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.38.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

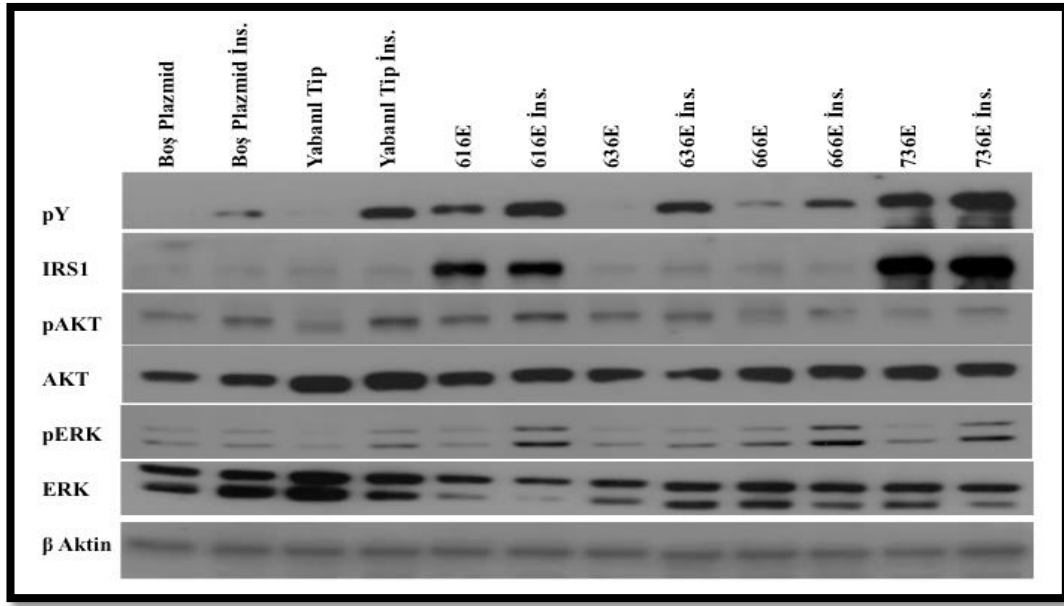


Şekil 4.39.Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

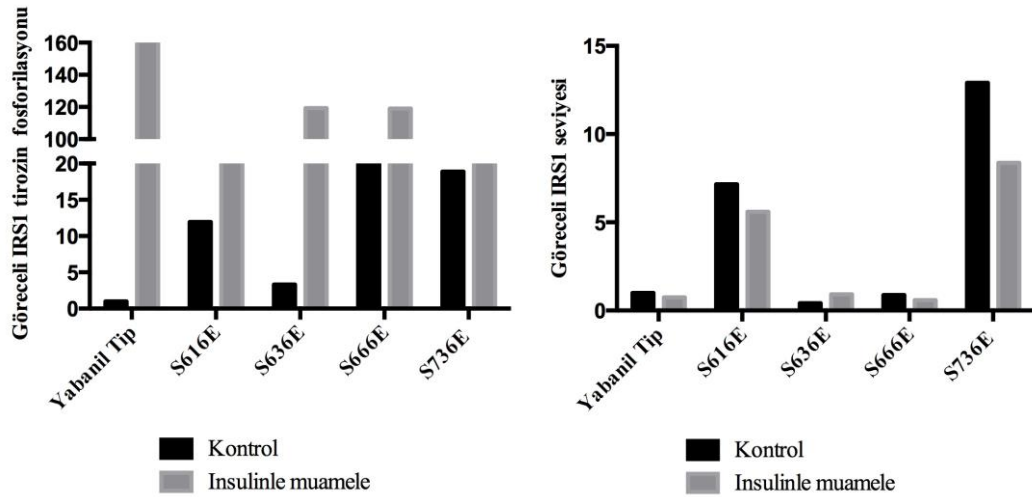
IRS1 E mutantlarının tekli kombinasyonlarını eksprese eden hücrelerin kontrol gruplarının IRS1 fosfotirozin oranlarına bakıldığında yabancı tipe oranla S616E 'nin 12 kat, S636E' nin 3 kat, S666E' nin 23 kat ve S736E' nin 19 kat artış gösterdiği saptanmıştır. Mutantların insülinle muamele grubuna bakıldığında ise genel olarak yabancı tipe göre azalma görülmekle beraber bu oranlar S616E ve S736E için 8 kat, diğer grupla için 1,5 kattır. Kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, S736E mutantı dışında diğer gruplarda insülinle muamele sonucunda pIRS1 oranında anlamlı bir artış gözlemlenmektedir. Tekli mutantları eksprese eden hücrelerin IRS1 seviyelerine bakıldığında S636E ve S666E mutantlarının IRS1 seviyelerinin azaldığı S616E ve S736E mutantlarının ise belirgin derecede yabancı tipe oranla arttığı görülmektedir. (Şekil 4.41)

p38 MAPK fosforilasyonunu taklit eden E mutantının tekli kombinasyonlarının AKT fosforilasyonuna olan etkisine kontrol grubunda bakıldığında S666E' de yabancı tipe oranla anlamlı bir değişim gözlemlenmezken, S616E' de 2 kat, S636E' de 1,5 kat artış, S736E ekspresyonu yapan hücrelerde ise 2 kat azalma görülmüştür. İnsülinle muamele gruba bakıldığında ise yabancı tipe oranla pAKT oranında S636E' de artış, S666E ve S736E ' de ise azalma olduğu görülmüştür. Mutantlar kendi kontrolleriyle karşılaştırıldığında S636E mutant dışındakiler pAKT artışı açısından insülin yanıt vermemektedir. Aynı mutantların AKT ekspresyon düzeyleri incelendiğinde mutantların kendi kontrolleri ve yabancı tip ile aralarında belirgin bir değişim gözlemlenmemiştir. (Şekil 4.42)

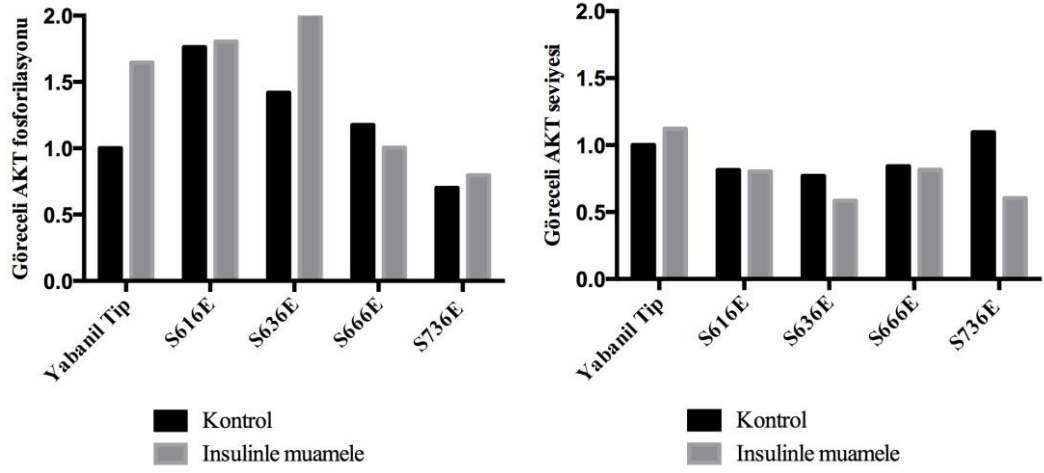
Tekli mutantlar ERK fosforilasyonu açısından değerlendirildiğinde kontrol grubunda yabancı tipe oranla S616E' de 3 kat, S636E' de 2,5 kat, S666E' de 5 kat ve S736E' de 3 kat artış görülmektedir. İnsülin grubu pERK oranı açısından kendi arasında değerlendirildiğinde yabancı tipe oranla S636E değişmezken, S616E 7 kat, S666E 4 kat, S736E 3 kat artmaktadır. Mutantlar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında her mutant insülin pIRS1 açısından cevap verirken S616E' nin pERK seviyesi 9 kat artış göstermiştir. Mutantların ERK seviyelerinde ise S616E' nin yabancı tipe , S736E mutantının ise kontrolüne oranla yarı yarıya azaldığı görülmektedir. (Şekil 4.43)



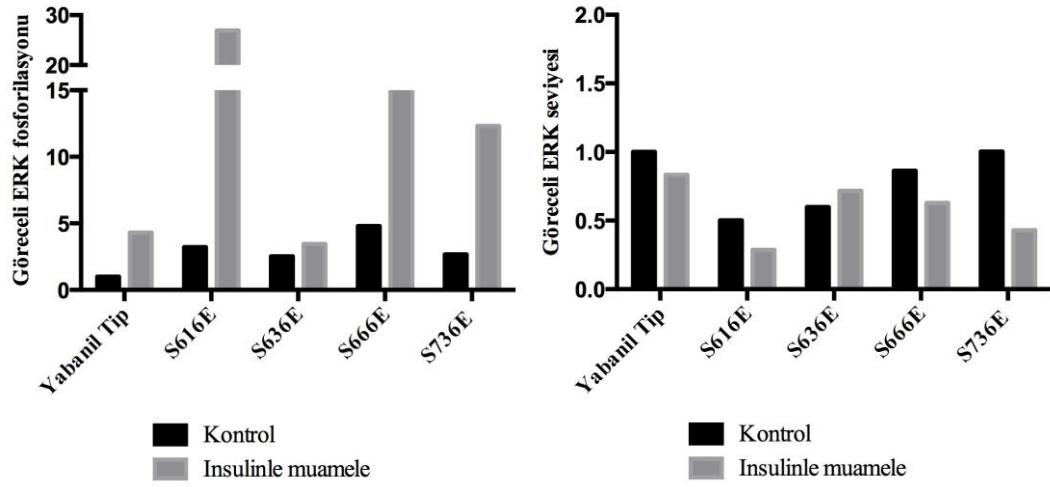
Şekil 4.40. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabanıl tip ve E mutanları eksprese eden hücreler serumuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatı %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikorları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi



Şekil 4.41. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.42. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

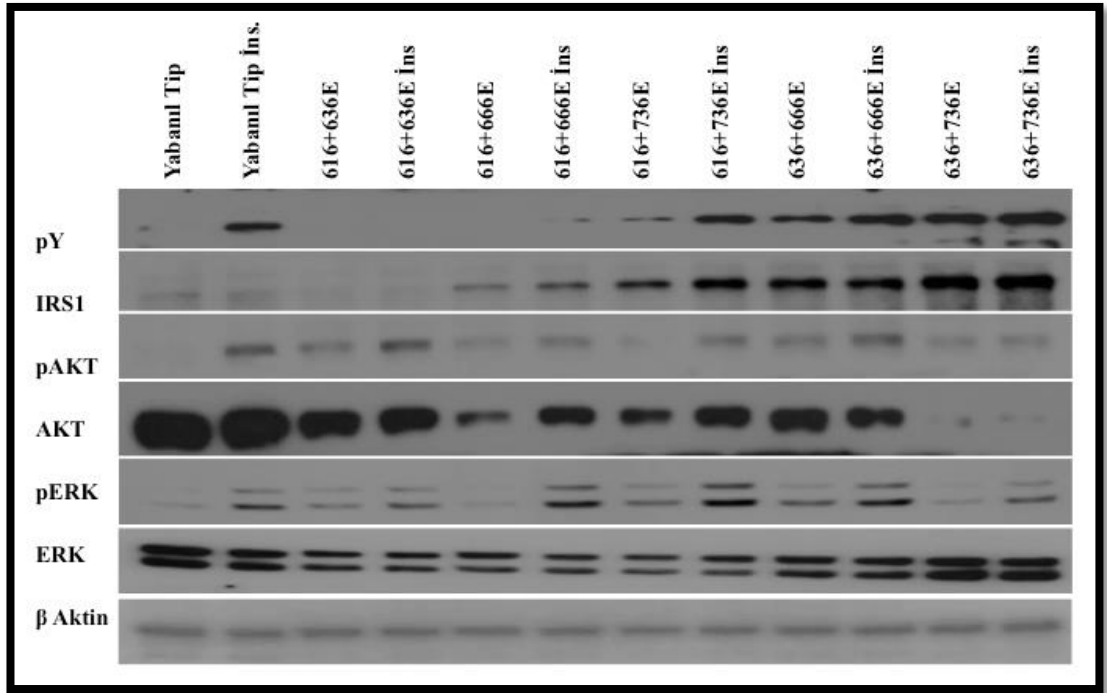


Şekil 4.43. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin tekli E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

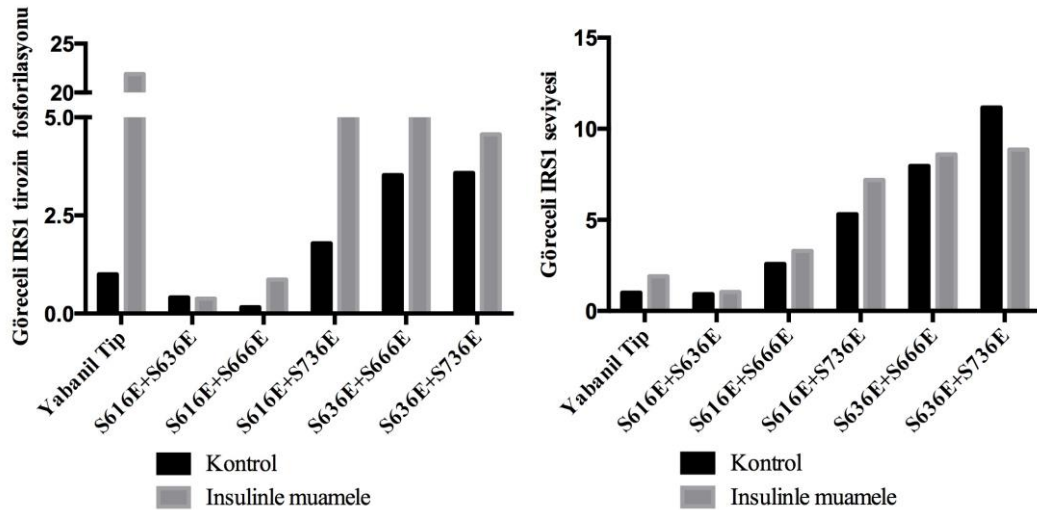
IRS1 ikili E mutantlarının ekspresyonunu yapan hücreler IRS1 fosfotirozin oranları açısından karşılaştırıldığında kontrol grubunda yabancı tipe göre S616E+S736E ve S616E+S666E ekspresyonu yapan hücre gruplarından 2 kat azalma buna karşın S616E+S736E' de 2 kat, S636E+S666E ve S636E+S736E' de 4 kat, S666E+S736E' de 19 kat artış görülmektedir. İnsülin grubunda ise yabancı tipe oranla 6 mutant grubun 4' ünde ortalama 4 kat azalma 2' sinde ise 20 kat azalma olduğu görülmüştür. Mutantlar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında S666E+S736E ve S616E+S636E' nin pIRS1 açısından insüline yanıt vermediği diğer grupların ise insülinle muamelesiyle beraber pIRS1 seviyelerini yükselttiği görülmüştür. İkili mutantların IRS1 ekspresyon düzeylerinde ise S616E+S636E mutantı dışındaki tüm grupların IRS1 ekspresyonunda artış gözlemlenmektedir (Şekil 4.45).

IRS1' in ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerin kontrol gruplarında AKT fosforilasyonunda artış olduğu görülmektedir. pAKT oranındaki artış oranları sırasıyla 20 kat, 30 kat, 7 kat, 20 kat, 60 kat ve 3 kattır. Mutantların insülinle muamele edilen gruplarının pAKT oranları yabancı tipe göre karşılaştırıldığında A636E+S666E' nin 2 kat ve S636E+S736E' nin 5 kat arttığı görülmektedir. Mutantlar kendi kontrollerine göre karşılaştırıldığında S616E+S736E, S636E+S666E ve S636E+S736E grupları AKT fosforilasyonu açısından insülin yanıt verirken, S666E+S736E ve S616E+S636E mutantları yanıt vermemektedir. Ayrıca S616E+S666E ekspresyonu yapan hücre grubunda ise insülinle muamele sonucuna pAKT oranı 1,5 kat azalmıştır. Mutantların AKT seviyeleri göz önüne alındığında S636E+S736E mutantının hem kontrol hem de insülinle muamele grubundan belirgin bir ekspresyon azalması gözlemlenmektedir. (Şekil 4.46).

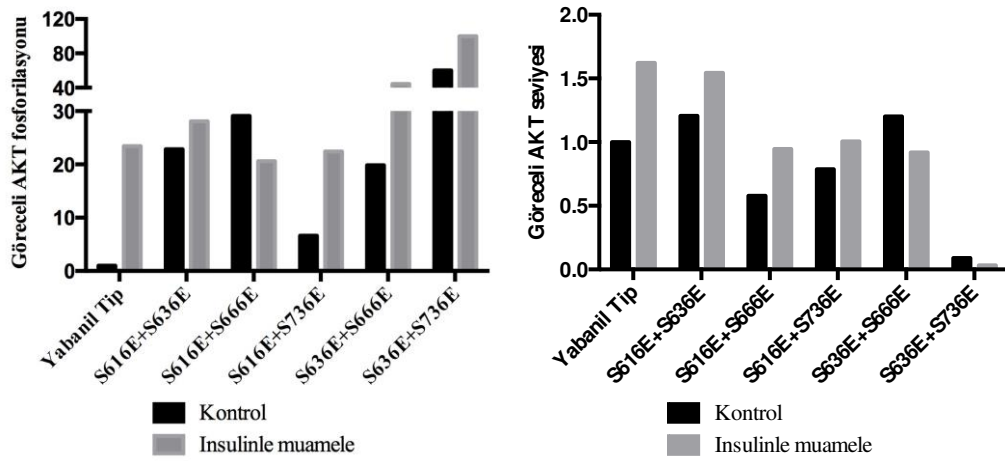
Kontrol örneklerin yabancı tipe oranla ERK fosforilasyon seviyeleri göz önüne alındığında, S616E+S636E' nin 5 kat, S616E+S736E' nin 10 kat, S636E+S666E' nin 7 kat, S636E+S736E' nin 2 kat arttığı saptanırken, S616E+S666E ile S666E+S736E' nin seviyelerinde herhangi bir değişimin olmadığı saptanmıştır. İnsülinle muamele edilen grubun yabancı tipe göre ERK fosforilasyonu S616E+S666E' de 2,5 kat, S616E+S736E' de 3 kat, S636E+S666E' de ve S666E+S736E' de 2 kat artış gösterirken, S616E+S736E ve S666E+S736E gruplarında herhangi bir değişim saptanmamıştır. Bütün mutantların pERK seviyeleri kendi kontrollerine göre insülinle muamele edildiğinde artış göstermektedir. İkili E mutantlarının eksprese eden hücrelerin ERK ekspresyonlarında yabancı tipe ve kendi kontrollerine oranla belirgin bir değişim saptanmamıştır. (Şekil 4.47).



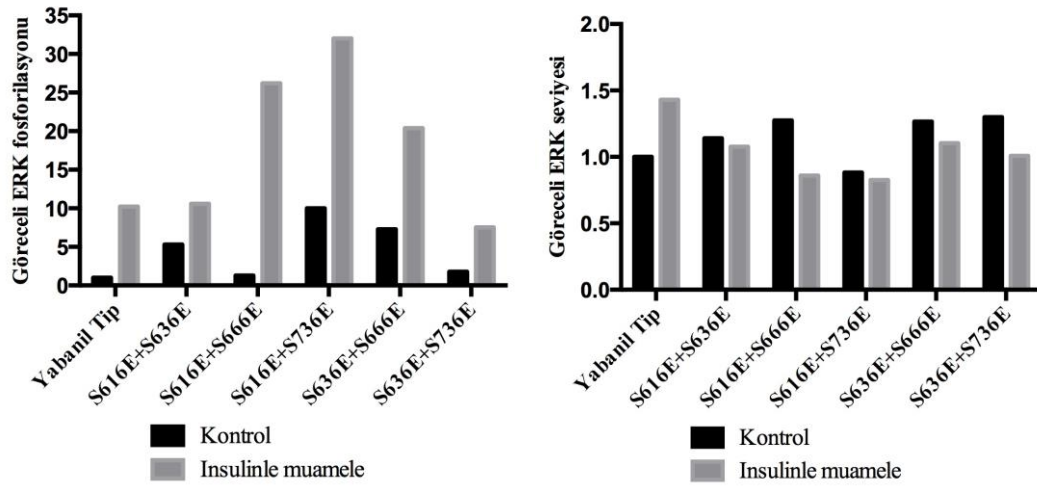
Şekil 4.44. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabanıl tip ve E mutantları eksprese eden hücreler serumsuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizati %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikoları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikoları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoru ile işaretlendi



Şekil 4.45. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.46. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

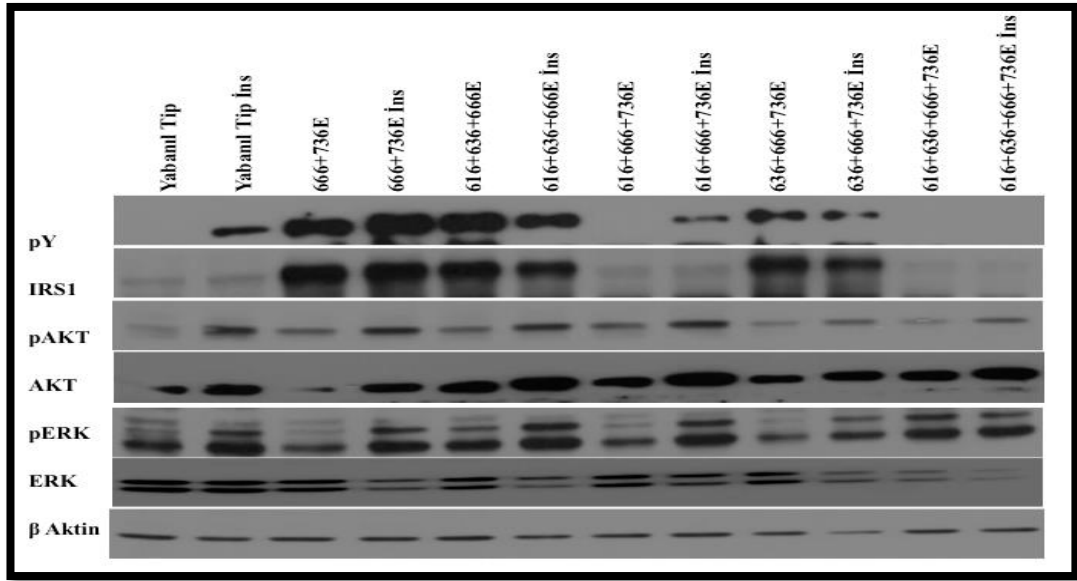


Şekil 4.47. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

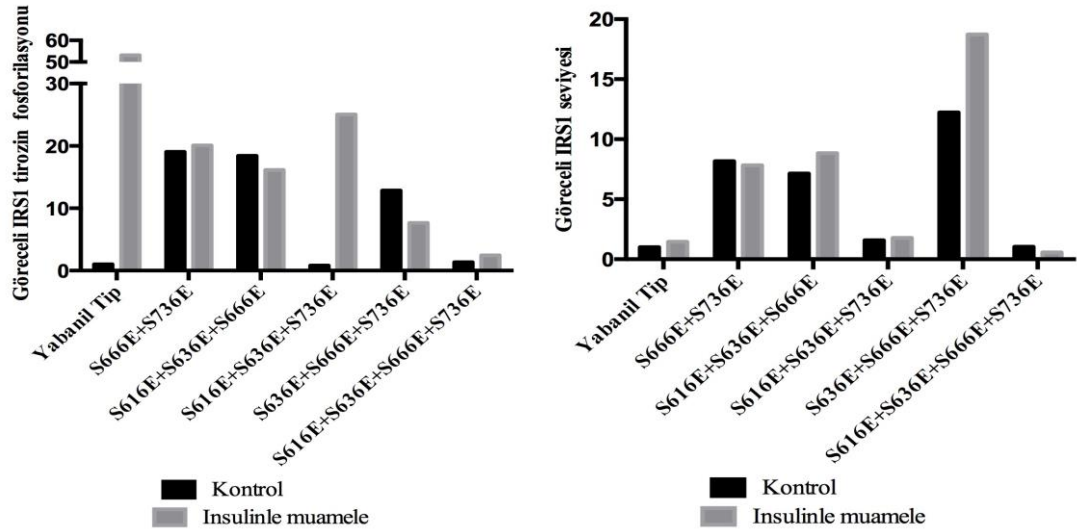
IRS1 üçlü E mutantlarının insülin sinyal yolağındaki etkilerine baktığımızda, Kontrol grubun yabancı tipe oranla IRS1 fosforilasyonları karşılaştırıldığında S616E+S636E+S666E' nin 20 kat, S636E+S666E+S736E' nin 13 kat arttığı, S616E+S636E+S736E ve dörtlü mutantın ise pIRS1 oranının değişmediği belirlenmiştir. İnsülin ile muamele edilen grubu pIRS1 miktarı yabancı tip ile karşılaştırıldığında S616E+S636E+S666E' nin 3 kat, S616E+S636E+S736E' nin 2 kat, S636E+S666E+S736E' nin 8 kat ve dörtlü mutantın ise 25 kat azaldığı belirlenmiştir. Mutantlar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında S616E+S636E+S736E ve dörtlü mutantın pIRS1 açısından insüline yanıt verdiği görülmüştür. Üçlü ve dörtlü mutant grubun IRS1 ekspresyonları karşılaştırıldığında S616E+S636E+S666E ve S636E+S666E+S736E mutantlarını eksprese eden gruplarda IRS1 ekspresyonunun yabancı tipe oranla oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Buna karşın dörtlü mutantın her iki grubunda da IRS1 ekspresyonunun belirgin bir azalma görülmektedir. (Şekil 4.49)

Kontrol mutantların AKT fosforilasyon oranları yabancı tipe göre karşılaştırıldığında, S616E+S636E+S666E ve S616E+S636E+S736E gruplarının 2 kat, S636E+S666E+S736E gruplarının ise 3 kat, dörtlü mutantın ise 10 kat azaldığı belirlenmiştir. Mutantların insülinle muamele edilmiş grubu yabancı tip ile karşılaştırıldığında , S616E+S636E+S666E ve S616E+S636E+S736E gruplarının 2 kat, S636E+S666E+S736E gruplarının ise 3 kat dörtlü mutantın ise 5 kat azaldığı saptanmıştır. Gruplar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında dörtlü mutant dışındaki gruplarda pAKT seviyesi açısından insülin muamelesinden belirgin bir değişim gözlemlenmezken dörtlü mutantın pAKT seviyesini kontrolüne göre 2 kat arttığı görülmüştür. Aynı grubun AKT ekspresyon düzeylerine bakıldığında her mutantın kontrol grubundaki AKT seviyesinin yabancı tip kontrole oranla arttığı görülmektedir. Ayrıca grupların insülinle muamele edildiğinde kendi kontrollerine oranla da AKT ekspresyonlarını arttırdığı saptanmıştır. (Şekil 4.50)

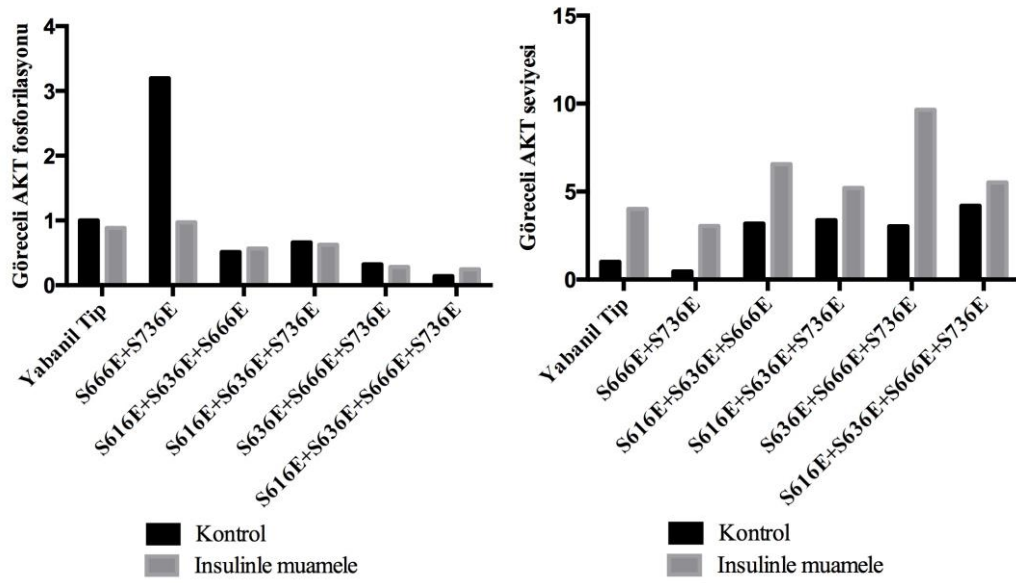
Üçlü ve dörtlü E mutantlarının kontrollerinin yabancı tipe oranla ERK fosforilasyonu açısından S616E+S636E+S666E' nin aynı, S616E+S636E+S736E ve S636E+S666E+S736E' nin 2 kat daha az, dörtlü mutantın ise 4 kat daha fazla seviyede olduğu belirlenmiştir. İnsülin muamele grup kendi içersinde karşılaştırıldığında yabancı tipe oranlar S616E+S636E+S666E' nin 2,5 kat, dörtlü mutantın ise 6 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Gruplar kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında pERK seviyesi açısından her grup insülin yanıt vermiştir. Grupların ERK ekspresyon seviyeleri incelediğinde en belirgin değişimin dörtlü mutantı eksprese eden hücrelerde olduğu görülmektedir. Bu grubun ERK ekspresyonu hem yabancı tipe oranla hem de insülinle muamele edildiğinde kendi kontrolüne oranla belirgin bir şekilde azalmaktadır. (Şekil 4.51)



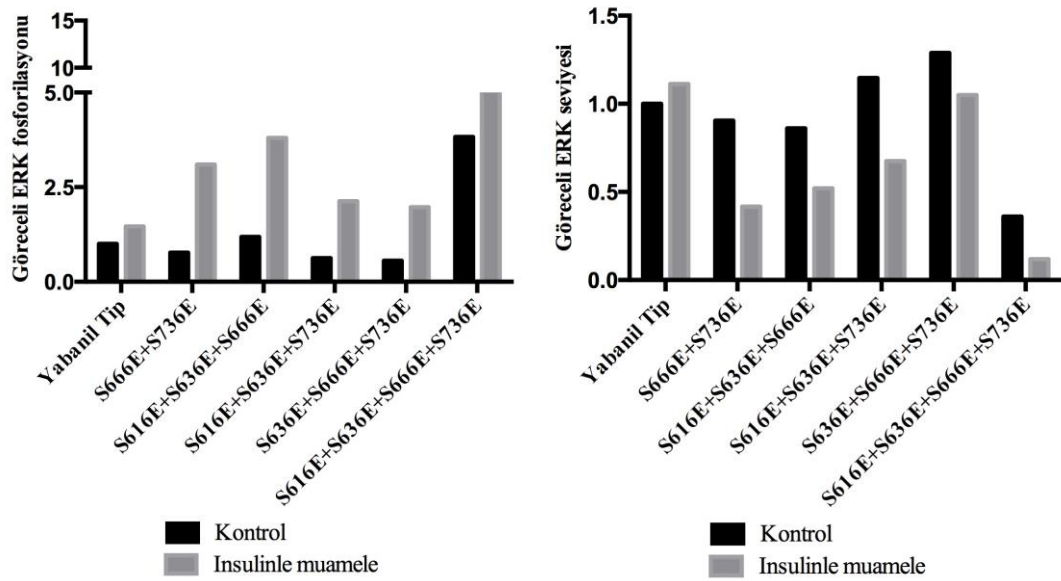
Şekil 4.48. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1, AKT ve ERK proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerini gösteren western blot sonucu. IRS1 yabanıl tip ve E mutanları eksprese eden hücreler serumuz ortamda gece boyu bekletildikten sonra bir grup 100 ng/ml insülin ile hedef proteinlerin optimum aktivasyon süreleri göz önüne alınarak inkübe edildi. Hücreler süre sonunda, TritonX 100 hücre liziz tamponunda homojenize edildi. 100 µg hücre lizatu %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membran öncelikle pY, pERK, pAKT antikorları ile strip off işleminde sonra IRS1, AKT ve ERK antikorları ile işaretlendi. En son olarak aynı membran yükleme kontrolü olarak Beta Aktin antikoruna ile işaretlendi.



Şekil 4.49. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki IRS1' in fosfotirozin ve ekspresyon seviyesi



Şekil 4.50. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki AKT' nin fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi



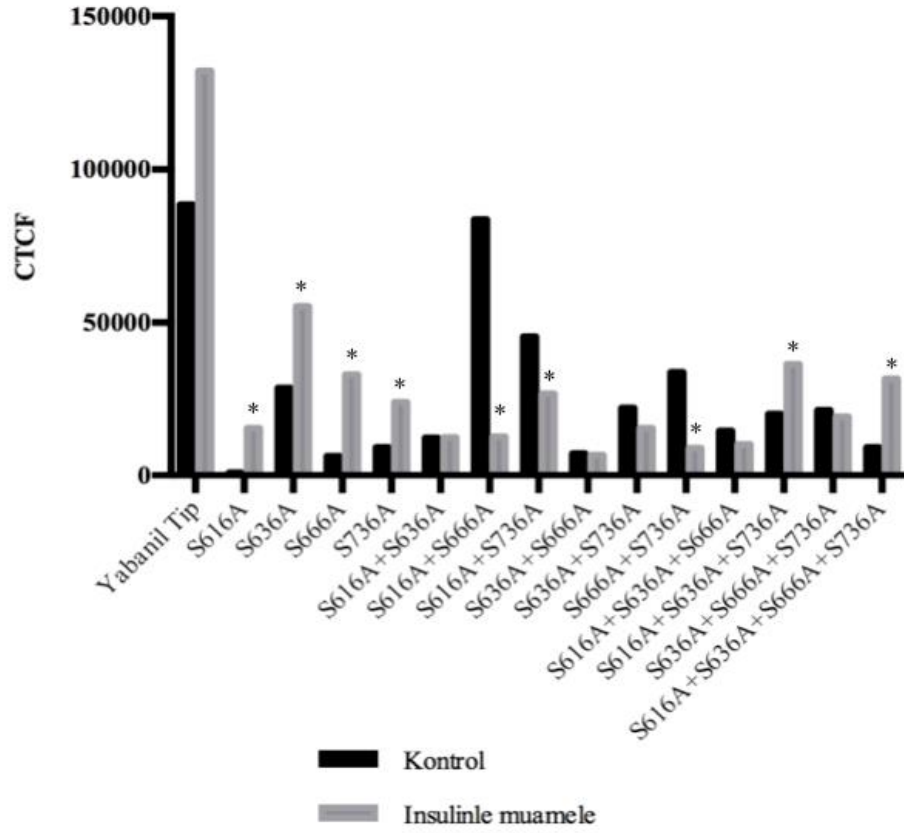
Şekil 4.51. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin ikili, üçlü ve dördlü E mutantlarını eksprese eden hücrelerdeki ERK' ün fosforilasyon ve ekspresyon seviyesi

4.13. Yabancıl Tip ve Mutant İnsan IRS1 Proteini Eksprese Eden 293T Hücrelerin Glukoz Alınım Oranları

p38 MAPK tarafından fosforile edilen IRS1' in hücrelerin glukoz alınımları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla fosforilasyonu taklit eden ve fosforile edilemeyen mutant vektörleri ektopik eksprese eden hücreler FBS' li ortamda eşit sayıda ekildi (n:3) Ertesi gün hücreler glukoz bulunmayan besiyeri ortamıyla yıkandı. Bir grup sadece floresan işaretli glukoz analogu içeren glukozsuz besiyeri ile diğer grup ise glukoz analogu ve 100 ng/mL insülin içeren glukoz bulunmayan besiyeri ile 30 dk. inkübe edildi.

Fosforile edilemeyen ilgili bölgelerin alanine mutantlarını eksprese eden hücrelerde kontrol ve insülin muamele grupların yabancıl tipe göre glukoz alım oranlarına bakıldığında, hepsinde azalmanın meydana geldiği görülmektedir.(Şekil 4.52).

Tekli mutantları eksprese eden hücrelerde, insülinle muamele edildiklerinde kontrollerine göre insüline yanıt vererek glukoz alınımlarında anlamlı bir artış görülmektedir. İkili mutantların glukoz alınımları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında ise S616A+S636A ve S636A+S66A gruplarında anlamlı bir değişim gözlemlenmezken, diğer gruplarda insülinle muamele sonucunda glukoz alınımlarında azalma olduğu görülmektedir. Üç bölgeye ait A mutantını eksprese eden hücrelerin glukoz alınımlarında sadece S616+S636A+S736A' nın insüline yanıt verdiği görülmektedir. Dörtlü A mutantını taşıyan grubun da insülinle muamele edildiğinde glukoz alımında anlamlı bir artışın olduğu görülmektedir (Şekil 4.52).

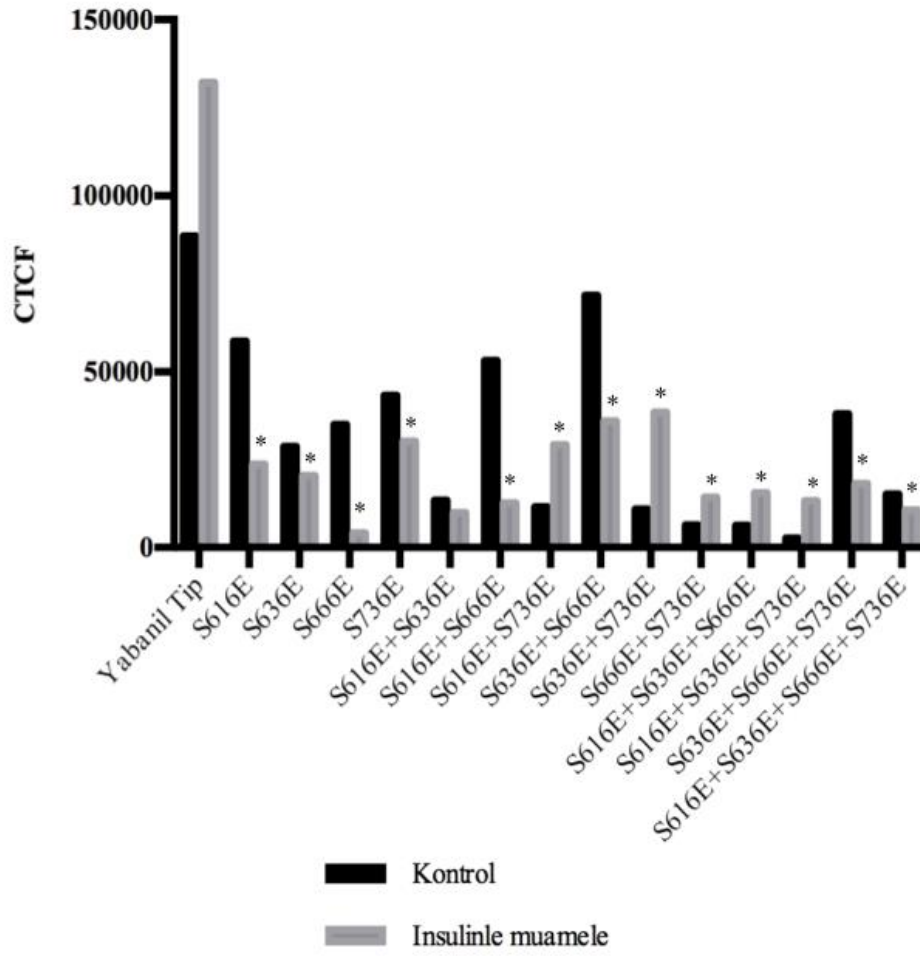


Şekil 4.52. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin A mutantlarını eksprese eden hücrelerin normal ve insülinle muamele koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi (CTCF: Corrected total cell fluorescence) Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi ve %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde gece boyu inkübe edildi. Hücreler, glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımı ve/veya 100 ng/µl insülin ile muamele edildi ve hücrelerin CTCF değerleri hesaplandı.

IRS1 proteininin p38 MAPK fosforilasyonunu taklit eden E mutantlarının ekspresyonunu gerçekleştiren hücrelerin normal ve insülinle muamele edildiği koşullarda yabancıl tipe göre glukoz alınımlarında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.53) .

Tekli mutantların insülinle muamele edildiklerinde glukoz alım miktarlarına bakıldığında kontrollerine göre azaldığı ve bu durumun ikili mutantlardan S616E+S666E, S616E+S636E, S636E+S666E gruplarında da devam ettiği görülmektedir. İkili mutantlardan S616E+S736E, S636E+S736E ve S666E+S736E değişimlerini eksprese eden hücrelerin ise insülin muamelesi ile glukoz alınımlarını arttırdığı saptanmıştır. S636E+S666E+S736E ekspresyonu yapan hücre grubu dışında diğer üçlü mutant ekspresyonu yapan hücrelerde de insülinle glukoz alınımlarında artış olduğu gözlemlenirken dörtlü E mutasyonunu eksprese eden hücrelerin glukoz alınımlarında ise azalma saptanmıştır (Şekil 4.53).

Bu veriler göz önüne alındığında A mutantlarını ve E mutantlarını eksprese eden hücre grupları kendi eşdeğer gruplarıyla karşılaştırıldığında özellikle tekli ve dörtlü A ve E mutant gruplarının glukoz alım değerlerinin birbirleri ile zıt oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.52, Şekil 4.53)



Şekil 4.53. Yabanıl tip ve IRS1 proteininin E mutantlarını eksprese eden hücrelerin normal ve insülinle muamele koşullarda glukoz alım miktarlarının belirlenmesi (CTCF: Corrected total cell fluorescence) Hücreler 5000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 3 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi ve %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde gece boyu inkübe edildi. Hücreler, glukoz bulunmayan besiyerinde sulandırılmış floresan işaretli glukoz analogu olan 2-NGBD (2-deoksi-2-((7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-yl)-D-glukoz) karışımı ve/veya 100 ng/µl insülin ile muamele edildi ve hücrelerin CTCF değerleri hesaplandı.

TARTIŞMA

İnsülin, iskelet ve kalp kası, adiposit gibi hedef dokularda glukoz alımını indükleyerek ve karaciğerde glukoz üretimini baskılayarak glukoz homeostasisini düzenlemektedir. Aynı zamanda insülin lipolizi baskılayarak karaciğerdeki glukoz üretimine neden olan FFA' ların da dolaşımında azalmasına neden olmaktadır. İnsülin direnci ise insülinin tüm bu metabolik etkilerini yerine getirememesi durumudur [52].

İnsülin sinyal sistemi oldukça kompleks olması nedeniyle akut ve kronik insülin direnci gelişiminde ortak bir mekanizmanın açıklanması oldukça zordur. Son yıllarda yapılan transgenik fare deneyleri, bir çok sinyal basamağının regülasyonunda sorun olduğunu gösterirken bunlardan bir kısmının insülin ve IGF bağımlı, diğer kısmının ise sinyal yollarının birbiri ile interaksyonu sonucu oluştuğunu göstermiştir [2, 11]. Bu duruma örnek olarak insülin reseptör mutasyonlarının insülin direncine neden olduğu bilinmekle beraber bu mutasyonların oldukça nadir olduğu ve genellikle beta hücre kaybının eşlik etmediği bilinmektedir [149]. Diğer taraftan PTP1B, SHIP2 ya da PTEN gibi protein ya da lipid fosfatazların ekspresyonlarındaki artışın insülin direnci gelişiminde klinik önemi olabileceği düşünülmekteydi. Dolayısıyla bu moleküllerin spesifik olarak baskılanmasının insülin direnci tedavisinde başarılı olabileceği öngörüldü. Ancak bu moleküllerin diğer sinyal yollarıyla olan etkileşimleri, bu durumun istenmeyen fenotiplere neden olacağından uygun bir terapötik hedef olmaktan çıkarmıştır [35].

İnsanda moleküler olarak insülin direnci mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da genel ve ortak bir mekanizma göz önüne alındığında, IRS proteinleri dikkat çekmektedir [150]. İnsülin sinyalindeki bu nokta, diğer sinyal yollarıyla da kesişmesi nedeniyle insülin direnci gelişiminin ortak hedef noktası olduğunu göstermektedir. Diğer bir önemli nedeni ise sinyalin hem fizyolojik hem de patolojik durumda regülasyon merkezi olmasıdır. Dolayısıyla bir çok fizyolojik ve genetik faktör göz önüne alındığında IRS1 regülasyonu, insülin direnci gelişiminde mekanistik olarak oldukça önemlidir.

IRS1 proteininin insülin sinyal yolağını fizyolojik ve patolojik durumlarda Ser/Thr fosforilasyonuna uğratarak regüle ettiği bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu fosforilasyonlar gerek IRS1' in alt sinyal elemanları gerekse fizyolojik ve çevresel faktörlerin uyarıları tarafından gerçekleştirilmektedir. Çevresel uyarılar göz önüne alındığında JNK, TNF gibi hücre stres faktörlerinin direkt ya da dolaylı olarak IRS1' i Ser/Thr fosforilasyonuna uğratarak insülin sinyal yolağını baskıladığı ve patolojik durumlarda bu baskılamının ön plana çıktığı görülmektedir [25, 54]. Bu açıdan bakıldığında p38 MAPK' ın da stresle aktive olan bir Serin Treonin kinaz olduğunu bilmekteyiz. Ayrıca yapılan çalışmalarda da Tip 2 diyabet ve insülin direnci gelişiminde p38 MAPK aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir [142, 143]. Bu yaklaşımlar ışığında bu çalışmamızda p38 MAPK' ın diğer stres indüklü kinazlar gibi IRS1' i Ser/Thr fosforilasyonuna uğratarak uğratmadığını, hücrelerin glukoz alımını ve proliferasyonu üzerindeki etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

Bu hedefimiz doğrultusunda transfeksiyon açısından ve kültürasyonu kolay olan aynı zamanda insülinin hedef organları arasında gösterilen embriyonik böbrek hücresi 293T hücre hattını kullandık [151]. Öncelikle, hücrelere IRS1 memeli ekspresyon vektörünü transfekte ettik ve ektopik ekspresyonunu gösterdik. Ekzojen ekspresyonu endojen ekspresyondan ayırt edebilmek için plazmidde bulunan flag seçici bölgesine yönelik antikör kullandık ve plazmidin hücrelerde başarılı bir şekilde ektopik ekspresyon gösterdiğinden emin olduk.

Bir kinazın bir proteini fosforile edebilmesi için aralarında bir interaksiyonun olması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, p38 MAPK ve IRS1 etkileşimini immünpresipitasyon tekniği aracılığıyla gösterdik. Bu veri literatürde p38 MAPK – IRS1 etkileşimini gösteren ilk sonuçtur.

Her hücre tipinin insüline verdiği yanıt ve sinyalin iletim hızı birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle kullanacağımız aktivatörlerin ve inhibitörlerin hücrelerde hedef aldığımız molekülleri aktive ya da inhibe ettikleri optimum süreyi belirlemek istedik. Bu amaçla, p38 MAPK aktivatörü olan anisomisin'in p38 MAPK'ı 15. dk.' dan itibaren aktive ettiği optimum aktivasyon süresi olarak ise 60 dk. olduğunu saptadık. İnsülinin ise IRS1' i insülin reseptörü aracılı tirozin fosforilasyonuna uğrattığı sürenin 5. dk. başlayıp 90. dk.' ya kadar devam ettiğini belirledik. Elde ettiğimiz sonuca bakıldığında 15. dk' dan sonra da IRS1 tirozin fosforilasyonunda artışlar görülmektedir. Ancak IRS1' in bazal ekspresyon düzeyine bakıldığında bir azalma söz konusudur. Bu durum bize IRS1' in Ser/Thr fosforilasyonuna ya da diğer mekanizmalara bağlı olarak parçalanmaya başladığını göstermektedir. 5. ve 15. dk' lar göz önüne alındığında ise IRS1 ekspresyonu fosforilasyona bağlı olarak artış göstermektedir. Bu noktada insülin sinyal geri bildiriminin oldukça hızlı olduğu görülmektedir. Bu durumun kronik insülin maruziyeti ile IRS1' in baskılamasına bağlı olarak insülin direnci gelişimine katkıda bulunduğu söylenebilmektedir [152]. İnsülin yolağının diğer önemli proteinleri ise AKT ve ERK proteinleridir. Bu proteinlerin insüline bağlı optimum fosforilasyon sürelerinin ise 30. ve 5. dk' lar olduğu görülmektedir. Elde ettiğimiz bu veriler Zhande ve arkadaşları tarafından 2006' da yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada insülin ile indüklenen hücrelerde belirlediğimiz sürelerden sonra sürekli aktif fosfatazlar ya da diğer hücresel mekanizmalar aracılığıyla defosforilasyonunun başladığı belirtilmektedir [153].

IRS1 Ser/Thr fosforilasyonunun sinyal üzerindeki en önemli etkisi, IRS1' in insülin indüklü tirozin fosforilasyonunu azaltmasıdır. Bu nedenle p38 MAPK' ın aktif olduğu durumlarda IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkisinin saptanması önemlidir. p38 MAPK aktivasyonu anisomisin tarafından sağlanmıştır. Anisomisin, memeli hücrelerinde stresle aktive olan proteinlerden p38 MAPK ve JNK' ın aktivatörüdür [154]. Elde ettiğimiz veriler ışığında, 293T hücreleri anisomisin ile muamele edildiğinde IRS1' in tirozin fosforilasyonunda yaklaşık 2 kat azalma olduğu görülmüştür. Bu noktadan yola çıkarak anisomisin'in insülin sinyal yolağını IRS1 tirozin fosforilasyonunu azaltarak inhibe ettiği ya da yavaşlattığı söylenebilmektedir. Ayrıca sadece anisomisin muamele gruba bakıldığında, anisomisin uygulamasının bazal IRS1' i insülininden bağımsız olarak parçalanmaya

götürdüğü görülmektedir. Ancak anisomisin, IRS1' i Ser/Thr fosforilasyonuna uğratan JNK' ı da aktive eden bir ajandır. 2001 yılında Rui ve arkadaşları tarafından CHO hücrelerinde yapılan çalışmada da anisomisin indüklü JNK aktivasyonunun IRS1 S307 (insan S312) fosforilasyonu aracılığıyla IRS1 tirozin fosforilasyonunu azalttığı saptanmıştır [155]. Bu noktada elde ettiğimiz verinin spesifik p38 MAPK etkisi olduğunu söylememiz güçtür. Bu nedenle etkinin spesifikliğini ve p38 MAPK' ın inhibisyona etkisini görebilmek için spesifik p38 MAPK inhibitörü olan SB203580' i kullandık. SB203580 kullandığımız hücrelerde ise IRS1 tirozin fosforilasyonunun insülinle muamele edilen hücreye göre 3 kat arttığını belirledik. IRS1' in p38 MAPK aracılı parçalanmaya gittiğinin bir diğer kanıtı ise sadece anisomisin ve SB203580 uyguladığımız hücrelerde bazal IRS1 ekspresyon miktarıdır. Veriler karşılaştırıldığında SB203580 uygulanan hücrelerde bazal IRS1 oranı intact haldedir ve parçalanmaya gitmemiştir (Şekil 4.7- 4.8). Ayrıca anisomisin IRS1' in hedef proteinleri üzerindeki etkileri saptamak istediğimizde anisomisin insülinin indüklü ERK fosforilasyonunu azalttığı ancak SB253080' nin herhangi bir etkisinin olmadığını saptadık. Literatürde de yapılan çalışmalarda, SB253080' nin ERK' ü hedef almadığı ancak anisomisinin insülin indüklü ERK fosforilasyonunu baskıladığı görülmüştür [156]. AKT fosforilasyonu açısından bakıldığında ise SB203580' nin PKB aktivasyonunu baskımlarken anisomisinin herhangi bir etki yapmadığını görmekteyiz [157].

Bu noktaya kadar elde ettiğimiz verilerle, p38 MAPK' ın stresle aktive olduğu koşullarda IRS1 ile interaksyona girip, IRS1 tirozin fosforilasyonunu azaltarak insülin sinyal yolağını inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Bundan sonraki sorumuz ise IRS1' e bağlanan p38 MAPK' ın IRS1' i hangi bölgelerinden fosforile ettiğine yönelik oldu. Bu noktada IRS1 protein dizisinde p38 MAPK' ın muhtemel fosforilasyon bölgelerini saptadık. İlgili bölgelerdeki kodonları tekli ve kombinasyonel olarak p38 MAPK fosforilasyonunu taklit edecek E ve fosforile edilemez A mutantlarına çevirdik ve hücreler üzerindeki fonksiyonel etkilerine baktık. Bu mutantları hücrelere transfekte ederek, p38 MAPK fosforilasyonunun hücrelerin proliferasyonları ve glukoz alınımları üzerine etkilerini gözlemledik.

p38 MAPK' ın IRS1' i fosforile edemediği durumlar göz önüne alındığında tekli mutantlardan S636A ve S666A' yı eksprese eden hücrelerde proliferasyonun arttığı, aynı bölgelerin p38 MAPK fosforilasyonunu taklit eden (E) grupların da ise azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla elde ettiğimiz bu sonuçlara göre aktif p38 MAPK' ın IRS1' i bu bölgelerden fosforile ettiği durum ya da durumlarda hücrelerde antiproliferatif etki gösterdiği söylenebilmektedir (Şekil 4-23, 4-24, 4-25). Bugüne kadar yapılan bir çok çalışmada özellikle mTOR tarafından S636 ve S666 bölgelerinin fosforilasyonunun IRS1' i parçalanmaya götürerek insülin sinyalini baskıladığı belirtilmiştir [158, 159]. Bu durum western blot analizlerinde elde ettiğimiz IRS1 ekspresyon seviyeleri ile de uyum göstermektedir. S636A ve S666A mutantlarının özellikle insülinle muamele edildiğinde IRS1 ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlemlenirken, S636E ve S666E mutantlarında ise belirgin bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.29-Şekil 4.41) . Bu iki mutantın neden olduğu proliferasyon artışı IRS1 ekspresyonu ile ilişkili olabilir [42]. IRS1' in ilgili bölgelere ait A mutantının proliferasyon üzerindeki etkileri, PI3K ile olan etkileşimi artırarak sinyalin kuvvetlenmesine ya da IRS1' in PI3K' dan bağımsız diğer proliferatif

yolakları da uyarması şeklinde açıklanabilmektedir. Aynı bölgelerin E mutantlarında ise IRS1' in parçalanmaya gitmesi bir kaç durumu karşımıza çıkarmaktadır. Bunlardan birincisi özellikle böbrek de eksprese olan IRS4 proteininin IRS1' i kompanse etmek için metabolik ve mitojenik yolların aktivasyonunu arttırabilmesidir [160]. Diğer bir olasılık IRS1 parçalanmasına bağlı olarak sinyal inhibisyonunun gerçekleşebileceğidir. IRS1 parçalanmasına bağlı olarak insülin reseptörü ve PI3K ile interaksyona giren proteinlerin IRS' in yarış dışı kalması nedeniyle proliferatif ya da metabolik yolları aktive edebilmesi ise başka bir olasılıktır [20]. Ayrıca hücrelerin sinyal kinetiklerinin değişimi de mutantların hedef proteinleri uyarım sürelerini, sinyal akım hızlarını ve etkilerinin kısa süreli ya da uzun süreli olmalarını etkilemektedir [161].

Diğer tekli kombinasyonlardan S616 ve S736 bölgelerinin p38 MAPK tarafından fosforilasyonlarının hücrelerde proliferatif bir etki yaptığı karşımıza çıkmaktadır. Benzer şekilde bu bölgelerin A ve E mutantlarının proliferasyon oranlarının birbirine anlamlı bir şekilde farklılık göstermesi bu durumu doğrulamaktadır. Bu mutantların western blot analizlerinde IRS1 seviyelerine bakıldığında ise yabancı tipe oranla belirgin bir artışın olduğu karşımıza çıkmaktadır. S636A ve S666A mutantlarında da olduğu gibi IRS1 ekspresyon artışı hücre proliferasyonu ile paralellik göstermektedir. Ancak bu mutantların parçalanmaya gitmemeleri ilginç bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum literatürde de belirtildiği gibi IRS1' in hangi pozisyonundan ve hangi uyararla fosforile olduğunun, fosforilasyonun etkisini de değiştirdiğinin göstergesidir [42].

Tekli mutantları eksprese eden hücrelerin glukoz alınımlarına bakıldığında hücrelerin beklendiği üzere A mutantlarının insüline yanıt verirken E mutantlarının insüline yanıt vermediğini görmekteyiz. Özellikle S636 bölgesinin insülin duyarlılığı konusunda en etkin bölge olduğunu söyleyebiliriz. Tüm bu sonuçlar göze alındığında IRS1 p38 MAPK fosforilasyonunun hücrelerin glukoz alınımları üzerindeki etkisinin negatif olduğunu söyleyebiliriz. Literatürde benzer bölgeler JNK ve mTOR gibi proteinler ile fosforillendiğinde de benzer etkiyi göstermektedir [162, 163]. Proliferasyonu yüksek ancak glukoz alımını azalan hücrelerin eksprese ettiği mutantlara bağlı olarak mitojenik ve/veya farklılaşma yollarını uyardığı düşünülebilmektedir [13].

Bu olasılıkları göz önüne aldığımızda tekli mutantların IRS1, AKT ve ERK ekspresyonlarının yanı sıra, fosforilasyon düzeylerini belirledik. Tekli A mutantlarının IRS1 ekspresyonlarına bakıldığında insülin muamelesi ile IRS1' in ekspresyonunda artış olması, IRS1' in parçalanmadan korunduğunu göstermektedir. Ancak bu durum fosforilasyon düzeyine, bazal IRS1 seviyesinin yüksekliğinden dolayı beklediğimiz gibi yansımamaktadır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde mutantların moleküler düzeyde IRS1 açısından insüline yanıt verdiğini söyleyebiliriz. S636A mutanti göz önüne alındığında bu grubun IRS1 tirozin fosforilasyonunun düşük glukoz alımının ise yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu noktada bu grup hücrelerin Cbl/CAP gibi farklı yollar aracılığıyla glukoz alımını arttırabileceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır [164]. S736A' nın ise moleküler düzeyde IRS1 fosforilasyonu açısından insüline direnç gösterdiği söylenebilmektedir. Buna karşın

S636A, S666A ve S736A gruplarının AKT fosforilasyon düzeylerine bakıldığında hem kontrol hem de insülin muamele hücrelerde IRS1 fosfotirozin oranları düşük olmasına karşın normal AKT fosforilasyonu gözükmektedir. Bu durum 2001 yılında Nadler ve arkadaşları tarafından yayınlanan insülin dirençli farelerdeki IRS1 fosfotirozin seviyesindeki azalma ile düşük PI3K aktivasyonuna rağmen normal AKT fosforilasyonu düzeyinin görülebildiği verisiyle paralellik göstermektedir [165]. Bu mutantları ERK fosforilasyonu açısından değerlendirdiğimizde; S736A' nın ağırlıklı olarak metabolik etkilerden sorumlu AKT yolağının indüksiyonunu sağlarken, diğer grupların ERK aktivasyonunu da insülin muamelesiyle arttırdığını görmekteyiz. Bu aktivasyonlar S636A ve S666A eksprese eden hücrelerin proliferasyonlarıyla paralellik göstermektedir. Diğer taraftan S736A' nın ağırlıklı olarak metabolik yolağı aktivasyonu da proliferasyon sonuçlarımıza yansımıştır. S616A mutantını eksprese eden hücreleri incelediğimizde IRS1 tirozin fosforilasyonlarının oldukça yüksek olmasına rağmen sadece ERK fosforilasyonunda bir belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak beklendiği üzere hücrelerin glukoz alınımlarında azalma olduğu görülmektedir. Ayrıca ERK aktivasyonu beklendiği şekilde S616A' nın proliferasyonuna yansımamaktadır. Bu durum ERK' ün bu grupta farklılaşmayla ilgili yolakları indükleyebileceğini düşündürmektedir [166, 167].

Tekli kombinasyonların E mutantlarının sonuçları değerlendirildiğinde ise IRS1 ekspresyonlarında S616E mutant dışında belirgin bir azalmanın olduğu ve IRS1' in parçalanmaya gittiği görülmektedir. Buna karşın bu hücre grubunda IRS1 fosfotirozin seviyelerinde artış olduğu görülmektedir. Bu durum insülin direncine sebep olmayacakmış gibi gözükse de kısa süreli bir etkinin (sinyal kinetiğinde artışın) söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durumda protein hızla fosforile olmakta ancak bazal seviyeden gelen IRS1 olmadığı için fosforilasyon kısa bir süre sonra geri bildirimle inhibe edilecektir [161]. Grupların ERK ve AKT aktivasyonları bu fosforilasyon ile paralellik gösterirken, bu sinyal yolağının hücrelerin fonksiyonel etkilerine yansımamaktadır. Bunun nedenlerinden bir diğeri ise fonksiyonel bir etkinin tek bir yolak üzerinden açıklanmasının güçlüğüdür. Hücrelerin insülinle muamele edildiğinde AKT fosforilasyon seviyelerinde anlamlı bir artış olmaması glukoz alınımlarına da yansımış ve azalma olduğu saptanmıştır. Grup proliferasyon açısından değerlendirildiğinde S616E mutantının S616A mutantından farklı olarak ERK aktivasyonu sonucunda proliferasyonunda artış olduğu görülmektedir. Bu durum IRS1' den bağımsız olarak proliferasyon yolaklarının indüklendiğinin göstergesidir. Bunun yanında S666E' nin de ERK fosforilasyonu artmasına rağmen proliferasyondan farklı farklılaşma gibi hücresel yolakları aktive edebileceğini düşündürmektedir. Tüm proliferasyon ve glukoz alım sonuçları birbirileri ile değerlendirildiğinde beklendiği gibi anlamlı olarak ters yönde bir orantının söz konusu olduğu görülmektedir.

IRS1' in tekli mutantların hücreler üzerindeki fonksiyonel etkilerinin belirlenmesinin daha önemli düşünsek de çoklu kombinasyonların fonksiyonel etkileri değerlendirildiğinde ikili A mutantlarında E mutantlarına kıyasla insülin muamelesi sonucunda belirgin IRS1 fosforilasyon artışı görülmektedir. IRS1 fosfotirozin oranındaki artış özellikle S616A+S636A mutantının ERK yolağını aktive etmesini, S636A+S666A mutantının ise AKT yolağını aktive etmesine neden olmaktadır. Bu mutantların bazal AKT ve ERK seviyelerine bakıldığında ise fosforilasyonla paralellik göstermektedir. Ancak mutantların uyardığı yollar ve gözlemlediğimiz fonksiyonel etkileri göz önüne alındığında hücreler üzerinde farklılaşma gibi diğer hücresel olayları indükleyebileceği düşüncesi karşımıza çıkmaktadır. Aynı mutantların E gruplarına bakıldığında da akut olarak IRS1 fosforilasyonunun arttığı, AKT ve ERK yollarını indüklediği görülmektedir. Ancak elde ettiğimiz fonksiyonel etkiler birbiri ile paralellik göstermemektedir. Örneğin ikili A mutantlarının insülin muamelesi sonucunda glukoz alınımları E mutantlarına göre azdır. Bu durum bize insülin sinyalinin oldukça kompleks olduğunu ve yollarının birbirlerinin etkilerini telafi etmek amacıyla interaksyonda olduğunu bir göstergesidir. Ayrıca hücresel fonksiyonların tek bir yolak üzerinden açıklamanın güç olduğunu göstermektedir. Üçlü ve dörtlü mutantlara ait elde ettiğimiz fonksiyonel sonuçlar göz önüne alındığında elde edilen verilerin birbirleri ile karşılık göstermesi bize p38 MAPK' ın fosforilasyon bölgesi olarak belirlediğimiz bölgelerin kombinasyonel fosforilasyonlarının hücrede farklı biyolojik etkilere neden olduğunun kanıtıdır. Bu etkilerin moleküler yolların belirlenmesi için ise daha ayrıntılı moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak bu çalışmamızda literatürde ilk kez p38 MAPK' ın IRS1 ile etkileşime girdiğini ve belirttiğimiz bölgelerden fosforile edebileceğini gösterdik. Ayrıca p38 MAPK' ın IRS1' i fosforile ettiği bölgeye göre özellikle proliferasyon üzerinde farklı etkiler gösterdiğini saptarken, p38 MAPK' ın IRS1 Ser/Thr fosforilasyonu aralığıyla da insülin direncine neden olabileceğini göstermiş olduk.

SONUÇLAR

1. Hücrede aktive olan p38 MAPK, IRS1 ile fiziksel olarak bağlanabilmektedir.
2. Aktif p38 MAPK IRS1'i S616, S636, S666 ve S736 amino asitlerinden muhtemelen fosforile edebilir.
3. p38 MAPK tarafından fosforile edilen S616 ve S736 bölgeleri proliferasyonu indükler.
4. p38 MAPK tarafından fosforile edilen S636 ve S666 bölgeleri proliferasyonu baskılar
5. p38 MAPK tarafından Ser/Thr fosforilasyonuna uğratılan IRS1 parçalanmaya gider ve uzun süreçte insülin direncine neden olur.
6. IRS1 ' in Ser/Thr fosforilasyon bölgelerinin ve uyarılarının belirlenmesi insülin direnci ve kanser gelişim yollarının aydınlatılması açısından oldukça önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Alghamdi F, Guo M, Abdulkhalek S, Crawford N, Amith SR, Szewczuk MR. A novel insulin receptor-signaling platform and its link to insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell Signal* 2014,26:1355-1368.
2. Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003,27 Suppl 3:S6-11.
3. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014,220:T1-T23.
4. Corvera S, Burkart A, Kim JY, Christianson J, Wang Z, Scherer PE. Keystone meeting summary: 'Adipogenesis, obesity, and inflammation' and 'Diabetes mellitus and the control of cellular energy metabolism, ' January 21-26, 2006, Vancouver, Canada. *Genes Dev* 2006,20:2193-2201.
5. Schmitz-Peiffer C, Whitehead JP. IRS-1 regulation in health and disease. *IUBMB Life* 2003,55:367-374.
6. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 2009,9:753-762.
7. Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 2006,55:2392-2397.
8. Hancer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2014,289:12467-12484.
9. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005,26:19-39.
10. Bevan P. Insulin signalling. *J Cell Sci* 2001,114:1429-1430.
11. Wing SS. The UPS in diabetes and obesity. *BMC Biochem* 2008,9 Suppl 1:S6.
12. Hao Y, Zhao S, Wang Z. Targeting the protein-protein interaction between IRS1 and mutant p110alpha for cancer therapy. *Toxicol Pathol* 2014,42:140-147.
13. Reuveni H, Flashner-Abramson E, Steiner L, Makedonski K, Song R, Shir A, et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. *Cancer Res* 2013,73:4383-4394.
14. Li L, Qi X, Williams M, Shi Y, Keegan AD. Overexpression of insulin receptor substrate-1, but not insulin receptor substrate-2, protects a T cell hybridoma from activation-induced cell death. *J Immunol* 2002,168:6215-6223.
15. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 1994,266:C319-334.

16. Siddle K, Urso B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, *et al.* Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2001,29:513-525.
17. Kanzaki M, Pessin JE. Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys* 2001,35:191-209.
18. Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: *Endotext*. Edited by De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, *et al.* South Dartmouth (MA); 2000.
19. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007,64:873-891.
20. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004,47:170-184.
21. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* 2008,33:376-384.
22. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007,19:117-123.
23. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991,352:73-77.
24. White MF, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985,318:183-186.
25. Lee YH, White MF. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res* 2004,27:361-370.
26. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 1998,53:119-138.
27. Porter HA, Carey GB, Keegan AD. Insulin receptor substrate 1 expression enhances the sensitivity of 32D cells to chemotherapy-induced cell death. *Exp Cell Res* 2012,318:1745-1758.
28. Smith-Hall J, Pons S, Patti ME, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ, *et al.* The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry* 1997,36:8304-8310.
29. Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE, Lavan BE. Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 1998,273:10726-10732.
30. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003,278:25323-25330.
31. Chan BT, Lee AV. Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008,13:415-422.
32. Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun Signal* 2009,7:14.
33. Nawaratne R, Gray A, Jorgensen CH, Downes CP, Siddle K, Sethi JK. Regulation of insulin receptor substrate 1 pleckstrin homology domain by protein kinase C: role of serine 24 phosphorylation. *Mol Endocrinol* 2006,20:1838-1852.

34. Reiss K, Del Valle L, Lassak A, Trojanek J. Nuclear IRS-1 and cancer. *J Cell Physiol* 2012;227:2992-3000.
35. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E413-422.
36. Prisco M, Santini F, Baffa R, Liu M, Drakas R, Wu A, *et al.* Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the simian virus 40 T antigen and the activated type 1 insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002;277:32078-32085.
37. Keller SR, Aebersold R, Garner CW, Lienhard GE. The insulin-elicited 160 kDa phosphotyrosine protein in mouse adipocytes is an insulin receptor substrate 1: identification by cloning. *Biochim Biophys Acta* 1993;1172:323-326.
38. Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 1996;85:695-705.
39. Tanaka S, Wands JR. A carboxy-terminal truncated insulin receptor substrate-1 dominant negative protein reverses the human hepatocellular carcinoma malignant phenotype. *J Clin Invest* 1996;98:2100-2108.
40. Farooq A, Zhou MM. PTB or not to be: promiscuous, tolerant and Bizarro domains come of age. *IUBMB Life* 2004;56:547-557.
41. Shaw LM. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the $\alpha 6 \beta 4$ integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol Cell Biol* 2001;21:5082-5093.
42. Gibson SL, Ma Z, Shaw LM. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. *Cell Cycle* 2007;6:631-637.
43. Porter HA, Perry A, Kingsley C, Tran NL, Keegan AD. IRS1 is highly expressed in localized breast tumors and regulates the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy, while IRS2 is highly expressed in invasive breast tumors. *Cancer Lett* 2013;338:239-248.
44. Withers DJ, White M. Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 2000;141:1917-1921.
45. Yaffe MB. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:177-186.
46. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 2001;15:2099-2111.
47. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997;40 Suppl 2:S2-17.
48. Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, *et al.* The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 1993;260:1953-1955.
49. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle* 2011;10:1750-1756.
50. Herschkovitz A, Liu YF, Ilan E, Ronen D, Boura-Halfon S, Zick Y. Common inhibitory serine sites phosphorylated by IRS-1 kinases, triggered by insulin and inducers of insulin resistance. *J Biol Chem* 2007;282:18018-18027.

51. Hanke S, Mann M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics* 2009,8:519-534.
52. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005,87:99-109.
53. Caruso M, Ma D, Msallaty Z, Lewis M, Seyoum B, Al-janabi W, *et al.* Increased interaction with insulin receptor substrate 1, a novel abnormality in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2014,63:1933-1947.
54. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009,296:E581-591.
55. Hafner C, Landthaler M, Vogt T. Activation of the PI3K/AKT signalling pathway in non-melanoma skin cancer is not mediated by oncogenic PIK3CA and AKT1 hotspot mutations. *Exp Dermatol* 2010,19:e222-227.
56. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003,3:317-330.
57. Pal I, Mandal M. PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes. *Acta Pharmacol Sin* 2012,33:1441-1458.
58. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002,2:489-501.
59. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 2005,30:35-42.
60. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 2002,45:1475-1483.
61. Lizcano JM, Alessi DR. The insulin signalling pathway. *Curr Biol* 2002,12:R236-238.
62. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005,4:988-1004.
63. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 2005,30:194-204.
64. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006,7:85-96.
65. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J* 1998,331 (Pt 1):299-308.
66. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 1996,315 (Pt 3):709-713.
67. Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 1997,272:8474-8481.

68. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 2001,276:38349-38352.
69. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 2001,15:2203-2208.
70. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, *et al.* A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 2004,304:1325-1328.
71. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummmler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, *et al.* Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 2005,132:2943-2954.
72. Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1999,68:965-1014.
73. Peterson RT, Schreiber SL. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol* 1999,9:R521-524.
74. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997,272:31515-31524.
75. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999,253:210-229.
76. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007,129:1261-1274.
77. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001,359:1-16.
78. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 2003,278:14599-14602.
79. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002,3:267-277.
80. Brozinick JT, Jr., McCoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, *et al.* GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. *Diabetes* 2001,50:593-600.
81. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006,6:729-734.
82. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007,7:847-859.
83. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 2003,423:550-555.
84. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003,2003:RE5.
85. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004,432:1027-1032.

86. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999,103:931-943.
87. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003,4:373-384.
88. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004,5:355-366.
89. Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003,4:767-776.
90. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003,3:459-465.
91. Roskoski R, Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010,399:313-317.
92. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, *et al.* Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007,1773:1196-1212.
93. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003,15:463-469.
94. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, *et al.* Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001,56:127-155.
95. Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 2005,31:151-174.
96. Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 2003,15:455-462.
97. Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* 2004,279:22404-22411.
98. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 1996,274:2100-2103.
99. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, *et al.* Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008,322:1250-1254.
100. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, *et al.* Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994,372:182-186.
101. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, *et al.* Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994,372:186-190.
102. Aspinwall CA, Qian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR, Kennedy RT. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J Biol Chem* 2000,275:22331-22338.

103. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, *et al.* Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1996,16:3074-3084
104. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, *et al.* Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* 1998,101:1784-1788.
105. Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, *et al.* Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest* 2000,105:935-943.
106. Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* 2001,11:437-441.
107. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005,2005:pe4.
108. Kim YB, Kotani K, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes* 2003,52:1935-1942.
109. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 2000,21:585-618.
110. Liu YF, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, *et al.* Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem* 2001,276:14459-14465.
111. Moeschel K, Beck A, Weigert C, Lammers R, Kalbacher H, Voelter W, *et al.* Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 2004,279:25157-25163.
112. Sommerfeld MR, Metzger S, Stosik M, Tennagels N, Eckel J. In vitro phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C-zeta: functional analysis and identification of novel phosphorylation sites. *Biochemistry* 2004,43:5888-5901.
113. Um SH, D'Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 2006,3:393-402.
114. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004,431:200-205.
115. Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M, *et al.* Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* 1999,274:28816-28822.
116. Luo M, Langlais P, Yi Z, Lefort N, De Filippis EA, Hwang H, *et al.* Phosphorylation of human insulin receptor substrate-1 at Serine 629 plays a positive role in insulin signaling. *Endocrinology* 2007,148:4895-4905.
117. Giraud J, Haas M, Feener EP, Copps KD, Dong X, Dunn SL, *et al.* Phosphorylation of Irs1 at SER-522 inhibits insulin signaling. *Mol Endocrinol* 2007,21:2294-2302.

118. Langlais P, Yi Z, Finlayson J, Luo M, Mapes R, De Filippis E, *et al.* Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance. *Diabetologia* 2011,54:2878-2889.
119. Frojdo S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 2009,1792:83-92.
120. Bard-Chapeau EA, Hevener AL, Long S, Zhang EE, Olefsky JM, Feng GS. Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med* 2005,11:567-571.
121. Matsuo K, Delibegovic M, Matsuo I, Nagata N, Liu S, Bettaieb A, *et al.* Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J Biol Chem* 2010,285:39750-39758.
122. Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, *et al.* Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003,52:1319-1325.
123. Liu X, Liu M, Zhang J, Bai X, Ramos F, Van Remmen H, *et al.* Downregulation of Grb2 contributes to the insulin-sensitizing effect of calorie restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009,296:E1067-1075.
124. Greene MW, Garofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. *Biochemistry* 2002,41:7082-7091.
125. Liberman Z, Eldar-Finkelman H. Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *J Biol Chem* 2005,280:4422-4428.
126. Fisher TL, White MF. Signaling pathways: the benefits of good communication. *Curr Biol* 2004,14:R1005-1007.
127. Shah OJ, Hunter T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol Cell Biol* 2006,26:6425-6434.
128. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, *et al.* mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008,57:945-957.
129. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes* 2005,54:2939-2945.
130. Andreozzi GM, Martini R, Cordova R, D'Eri A, Salmistraro G, Mussap M, *et al.* Circulating levels of cytokines (IL-6 and IL-1 β) in patients with intermittent claudication, at rest, after maximal exercise treadmill test and during restore phase. Could they be progression markers of the disease? *Int Angiol* 2007,26:245-252.
131. Greene MW, Morrice N, Garofalo RS, Roth RA. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase C δ . *Biochem J* 2004,378:105-116.

132. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007,48:1905-1914.
133. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006,313:1137-1140.
134. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009,9:537-549.
135. Koistinen HA, Chibalin AV, Zierath JR. Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2003,46:1324-1328.
136. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007,1773:1358-1375.
137. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994,265:808-811.
138. Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD. Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* 2005,4:1189-1192.
139. Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem* 2000,275:40641-40648.
140. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 2012,92:689-737.
141. Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003,285:E685-692.
142. Cao W, Collins QF, Becker TC, Robidoux J, Lupo EG, Jr., Xiong Y, *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 2005,280:42731-42737.
143. Collins QF, Xiong Y, Lupo EG, Jr., Liu HY, Cao W. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J Biol Chem* 2006,281:24336-24344.
144. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, *et al.* CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 2001,413:179-183.
145. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, *et al.* Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 2001,8:971-982.
146. Feifel E, Obexer P, Andratsch M, Euler S, Taylor L, Tang A, *et al.* p38 MAPK mediates acid-induced transcription of PEPCK in LLC-PK(1)-FBPase(+) cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002,283:F678-688.
147. McGee SL, Hargreaves M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006,33:395-399.
148. Xiong Y, Collins QF, An J, Lupo E, Jr., Liu HY, Liu D, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *J Biol Chem* 2007,282:4975-4982.

149. Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, *et al.* Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Hum Mol Genet* 1997,6:583-586.
150. Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 2004,32:812-816.
151. de Boer IH, Mehrotra R. Insulin resistance in chronic kidney disease: a step closer to effective evaluation and treatment. *Kidney Int* 2014,86:243-245.
152. Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol* 2002,22:1016-1026.
153. Zhande R, Zhang W, Zheng Y, Pendleton E, Li Y, Polakiewicz RD, *et al.* Dephosphorylation by default, a potential mechanism for regulation of insulin receptor substrate-1/2, Akt, and ERK1/2. *J Biol Chem* 2006,281:39071-39080.
154. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000,275:9047-9054.
155. Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, *et al.* Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 2001,107:181-189.
156. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, *et al.* SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995,364:229-233.
157. Pozuelo-Rubio M, Leslie NR, Murphy J, Mackintosh C. Mechanism of activation of PKB/Akt by the protein phosphatase inhibitor Calyculin A. *Cell Biochem Biophys* 2010,58:147-156.
158. Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, *et al.* A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001,98:4640-4645.
159. Destefano MA, Jacinto E. Regulation of insulin receptor substrate-1 by mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). *Biochem Soc Trans* 2013,41:896-901.
160. Hoxhaj G, Dissanayake K, MacKintosh C. Effect of IRS4 levels on PI 3-kinase signalling. *PLoS One* 2013,8:e73327.
161. Huang C, Wu M, Du J, Liu D, Chan C. Systematic modeling for the insulin signaling network mediated by IRS(1) and IRS(2). *J Theor Biol* 2014,355:40-52.
162. Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,103:16454-16459.

- 163. Wang T, Kusudo T, Takeuchi T, Yamashita Y, Kontani Y, Okamatsu Y, *et al.* Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice. *PLoS One* 2013,8:e83264.
- 164. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, *et al.* Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 2001,410:944-948.
- 165. Nadler ST, Stoehr JP, Rabaglia ME, Schueler KL, Birnbaum MJ, Attie AD. Normal Akt/PKB with reduced PI3K activation in insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001,281:E1249-1254.
- 166. Song X, Bishop JE, Okamura WH, Norman AW. Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in promyelocytic NB4 leukemia cells: a structure-function study. *Endocrinology* 1998,139:457-465.
- 167. Chen A, Davis BH, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Brasitus TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) stimulates activator protein-1-dependent Caco-2 cell differentiation. *J Biol Chem* 1999,274:35505-35513.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara’ da doğan Gökhan GÖRGİŞEN, ilköğrenimini 1991-1996 yılları arasında Ankara Köy Hizmetleri İlkokulu ve 1996-1999 yılları arasında Ankara Avni Akyol İlköğretim Okulunda tamamlamıştır. Ankara Gazi Anadolu Lisesinde 1999-2003 lise öğrenimi gördükten sonra lisans öğrenimini, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde, 3.’ lük derecesi ile tamamlamıştır. Aynı yıl TÜBİTAK Lisansüstü Bursu almaya hak kazanarak, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’ nda, Tıbbi Genetik Yüksek Lisansı Programına başlamış ve 2009’ da Tıbbi Genetik Yüksek Lisans derecesini almıştır.

Yüksek Lisansını takiben TÜBİTAK Doktora Bursu ile aynı bölümde doktora programına başlamıştır. Doktora döneminde diyabet ve kanserde hücre sinyalizasyonu üzerine çalışmalar gerçekleştirmiş olup, çalışmaları 2012 yılında EMBO Diabetes and Obesity sempozyumunda Travel Grant, 48. ve 50. Ulusal Diyabet Kongrelerinde İkinci ve Birinci Poster sunumu ödülleri, 21. Ulusal Kanser Kongresinde Sözel Bildiri Birincilik ödülü almaya hak kazanmıştır. Şimdiye kadar biri ulusal, üçü uluslararası toplam dört adet yayını ve yayınlanma aşamasında olan beş makalesi bulunmaktadır.

Doktora döneminde iki aylık görevlendirme ile Almanya Tübingen Üniversitesi, Fakültelerarası Biyokimya Enstitüsünde Dr. Robert Feil’ in Transgenik Fare Laboratuvarında yapılan çalışmalara katılmıştır. 2011- 2015 yılları arasında Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’ nda Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmış olup, 2015 yılında ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) kapsamında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır.